Kwartalnik
Tom 55
Zeszyt 2•2016
KWIECIEŃ – CZERWIEC

CODEN:
PMKMAV 55 (2)
2016

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Postępy Mikrobiologii

Advances in Microbiology

Index Copernicus ICV = 98,38 (2014)
Impact Factor ISI = 0,286 (2014)
Punktacja MNiSW = 15,00 (2014)

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 (Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy), 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), BOHDAN STAROŚCIAK (Warszawski Uniwersytet Medyczny), BOGUSŁAW SZEWCZYK (Uniwersytet Gdański), ELŻBIETA TRAFNY (Wojskowa Akademia Techniczna), STANISŁAWA TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA (Państwowy Zakład Higieny), GRZEGORZ WĘGRZYN (Uniwersytet Gdański), PIOTR ZIELENKIEWICZ (Uniwersytet Warszawski)

REDAKCJA

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

ADRES REDAKCJI

Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel. (22) 554 13 12; fax (22) 554 14 04
e-mail: post.mikrobiol@biol.uw.edu.pl

Redaktorzy:

Redaktor naczelny: Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel. (22) 554 13 04; fax (22) 554 14 04
e-mail: jbielecki@biol.uw.edu.pl

Zastępca: Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Oczki 3 (parter), 02-007 Warszawa; tel.: (22) 628 08 22, (22) 621 13 51
e-mail: zmf@wum.edu.pl

Sekretarz: Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel. (22) 554 13 12; fax (22) 554 14 04
e-mail: radeks@biol.uw.edu.pl

PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

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

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

STALI RECENZENCI:

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

ISBN 978 - 83 - 923731 - 3 - 1

Informacja o zdjęciu na okładce:

Komórki Neisseria gonorrhoeae, mutant szczepu FA1090.
Preparatyka: dr Agnieszka Kwiatek, Zakład Wirusologii, Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet Warszawski.
Zdjęcie: mgr Paweł Bącal, Pracownia Teorii i Zastosowań Elektrod, Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski.
Obraz SEM uzyskano przy użyciu aparatury zakupionej w ramach projektu CePT POIG.02.02.00-14-024/08-00.

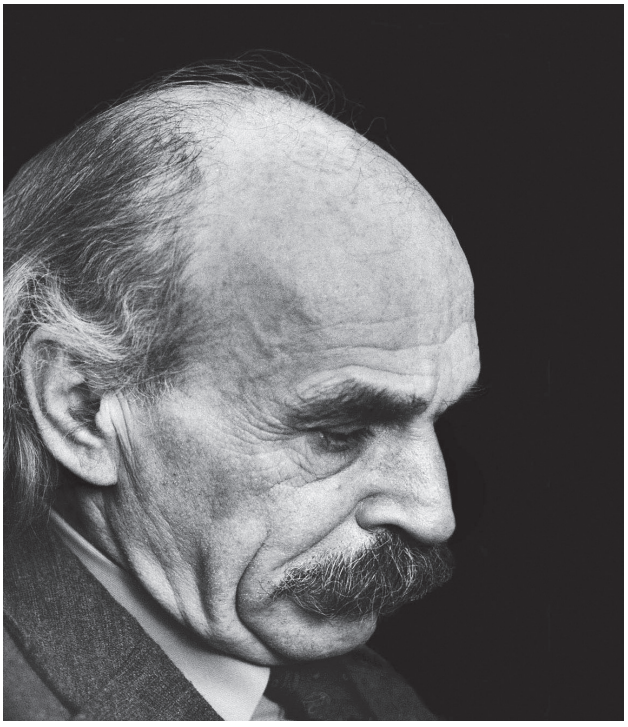
P O L S K I E T O W A R Z Y S T W O M I K R O B I O L O G Ó W

Nakład 1150, Objętość 17 ark. wyd., Papier offset 90 g

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

POST. MIKROBIOL.,
2016, 55, 2, 117–118
http://www.pm.microbiology.pl

WSPOMNIENIE
o Profesorze Władysławie J.H. Kunickim-Goldfingerze (1916–1995)



13 lutego 2016 roku minęła setna rocznica urodzin Profesora dr hab. Władysława J.H. Kunickiego-Goldfingera – wybitnego mikrobiologa, genetyka, humanisty i społecznika. Profesor był absolwentem Uniwersytetu Jagiellońskiego, gdzie jeszcze jako student podjął pracę w Zakładzie Bakteriologii Wydziału Rolniczego.

Władysław J.H. Kunicki-Goldfinger rozpoczął studia biologiczne w roku 1934 w Krakowie na Wydziale Filozoficznym Uniwersytetu Jagiellońskiego. Pracę magisterską z zakresu mikrobiologii weterynaryjnej wykonał pod kierunkiem doc. Stanisława Śnieszki, kierownika Samodzielnego Zakładu Mikrobiologii przy Wydziale Filozoficznym UJ. Po ukończonych studiach otrzymał stopień magistra filozofii w dziedzinie biologii, co znalazło odzwierciedlenie w Jego późniejszych zainteresowaniach naukowych. Jego pracę naukową w Katedrze Mikrobiologii Rolniczej przerwał wybuch II wojny światowej. Został aresztowany we Lwowie i zesłany do Guberni Archangielskiej, gdzie najpierw pracował fizycznie, a potem został bakteriologiem w łagrowym szpitalu. Po wydostaniu się z łagru zaciągnął się do tworzonej przez gen. Władysława Andersa Armii Polskiej i, służąc w kompanii sanitarnej, przemierzył z nią cały szlak bojowy. Do Polski wrócił w roku 1947. Profesor Józef Parnas zatrudnił go wówczas na Wydziale Weterynaryjnym Uniwersytetu M. Curie-Skłodowskiej w Lublinie, gdzie uzyskał stopień doktora (1948), a dwa lata później doktora habilitowanego.

W roku 1950 zorganizował na UMCS samodzielną Katedrę Mikrobiologii Ogólnej, a rok później został profesorem nadzwyczajnym. W roku 1955 przekazał kierownictwo Katedry prof. Zbigniewowi Lorkiewiczowi, a sam wraz z kilkoma swoimi współpracownikami przeniósł się do Wrocławia, gdzie na Uniwersytecie Wrocławskim przejął po prof. Helenie Krzemieniewskiej nauczanie mikrobiologii w Katedrze Fizjologii Roślin. W roku 1957 stworzył w Instytucie Botaniki UWr Katedrę Mikrobiologii Ogólnej, którą kierował w latach 1957–1961. Był też organizatorem i kierownikiem Pracowni Genetyki Bakterii Instytutu Immunologii i Terapii Eksperymentalnej im. L. Hirszfelda PAN, pierwszej placówki tej specjalności w Polsce.

W roku 1960 W.J.H. Kunicki-Goldfiger, wraz z kilkoma uczniami i współpracownikami, przeniósł się z Wrocławia do Warszawy. Rok później stworzył pierwszą na Uniwersytecie Warszawskim Katedrę Mikrobiologii Ogólnej, przekształconą następnie w Instytut Mikrobiologii. W kierowanym przez Niego Instytucie powstawały grupy specjalizujące się w badaniach podstawowych z zakresu genetyki mikroorganizmów, wirusologii, fizjologii bakterii, immunologii, a także mikrobiologii stosowanej. Niektóre z nich dały następnie początek samodzielnym pracowniom i zakładom.

Prof. W.J.H. Kunicki-Goldfinger jest autorem lub współautorem około 200 publikacji z dziedziny szeroko pojętej mikrobiologii, biologii ogólnej, historii nauki i filozofii przyrody. Na szczególną uwagę zasługuje cykl 23 publikacji dotyczących genetyki bakterii, które ukazały się pod wspólnym tytułem „*Mechanisms of bacterial conjugation and recombination*".

Profesor był również autorem dwunastu książek, w tym doskonałego podręcznika akademickiego „Życie bakterii", który doczekał się aż siedmiu wydań.

Napisany błyskotliwym językiem i ilustrowany świetnymi, dowcipnymi rycinami Szymona Kobylińskiego, służył wielu pokoleniom studentów.

Nie mniej ważne są książki Profesora dotyczące filozofii przyrody. Do najbardziej znanych należą: „*Dziedzictwo i przyszłość – rozważania nad biologią molekularną, ewolucją i człowiekiem*", „*Szukanie możliwości*" i ostatnia – „*Znikąd donikąd*", w których Autor przekazał trudne treści w przystępnej dla czytelnika formie. Swoje głębokie zainteresowania filozofią przyrody realizował w latach 70. i 80. ub. wieku, organizując w Instytucie Mikrobiologii UW seminaria Konwersatorium Biologii Ewolucyjnej i Teoretycznej, umożliwiające wymianę myśli uczestnikom o różnych poglądach. Był także aktywnym członkiem Sekcji Filozofii Nauki Polskiego Towarzystwa Filozoficznego oraz Komitetu Biologii Ewolucyjnej i Teoretycznej Polskiej Akademii Nauk. W 1965 roku Profesor został członkiem korespondentem PAN, a w 1980 jej członkiem rzeczywistym.

Prof. W.J.H. Kunicki-Goldfinger był, wraz z prof. Jadwigą Marszewską-Ziemięcką, założycielem (w 1952) pierwszego polskiego czasopisma naukowego o profilu *stricte* mikrobiologicznym – *Acta Microbiologica Polonica* – i długo pełnił funkcję jego redaktora naczelnego. Czasopismo to istnieje do dziś pod nazwą *Polish Journal of Microbiology*.

Obok pracy naukowej i dydaktycznej, Profesor poświęcał wiele czasu działalności społecznej. Brał udział w działaniach tzw. Latającego Uniwersytetu, przekształconego w Towarzystwo Kursów Naukowych. W 1979 TKN powołało Kasę Pomocy Naukowej, kierowaną przez Profesora, której celem była pomoc dla represjonowanych naukowców i studentów, umożliwiająca im kontynuowanie prac badawczych lub studiów. Profesor był też jednym z organizatorów Towarzystwa Popierania i Krzewienia Nauki, a także współpracował z Komitetem Obrony Robotników. Za tę działalność i aktywność w podziemiu „solidarnościowym" został internowany 13 grudnia 1981 roku, jako jedyny członek rzeczywisty Polskiej Akademii Nauk. W późniejszym okresie Profesor był także członkiem Komitetu Obywatelskiego przy Lechu Wałęsie, a w 1989 roku uczestniczył w obradach „okrągłego stołu" w zespole ds. nauki i oświaty.

W dowód uznania, za stworzenie prężnie rozwijających się mikrobiologicznych jednostek akademickich w różnych miastach Polski, Profesor W.J.H. Kunicki-Goldfinger został uhonorowany doktoratami honoris causa Uniwersytetu Wrocławskiego i Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. My, najstarsi wychowankowie Profesora z Uniwersytetu Warszawskiego, mamy wciąż w pamięci naszego Nauczyciela i Mistrza – wzór uprawiania dobrej nauki i wzór godnego życia.

Uczniowie Profesora
z Instytutu Mikrobiologii na Wydziale Biologii
Uniwersytetu Warszawskiego

POST. MIKROBIOL.,
2016, 55, 2, 119–131
http://www.pm.microbiology.pl

MODEL PATOGENEZY ENTEROPATOGENNYCH SZCZEPÓW *ESCHERICHIA COLI* – KLUCZOWA ROLA ADHEZJI

Barbara Katarzyna Pawłowska[1]*, Beata Magdalena Sobieszczańska[1]

[1] Katedra i Zakład Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Wpłynęło w marcu 2014 r.
Zaakceptowano w styczniu 2016 r.

1. Wprowadzenie. 2. Wyspa patogenności LEE. 2.1. Adhezja EPEC. 2.1.1. Fimbrie BFP. 2.1.2. Fimbrie typu 1. 2.1.3. Fimbrie powszechne *E. coli.* 2.1.4. Rzęski. 3. System sekrecji typu III. 3.1. Białka efektorowe EPEC. 3.2. Intimina. 3.3. Tir. 3.4. Destrukcja połączeń międzykomórkowych. 3.5. Zdolność inwazji i unikanie fagocytozy. 4. Wpływ EPEC na apoptozę komórek gospodarza. 5. Inne systemy sekrecji. 6. Typowe i atypowe EPEC. 7. Podsumowanie

Model of enteropathogenic *Escherichia coli* pathogenesis – a key role of adherence

Abstract: *Escherichia coli* is a highly diverse and one of the best characterized bacterial genus. The species comprises many commensal strains, colonizing human and animal intestines, as well as pathogenic strains, which can cause gastrointestinal infections. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) group strains is the pathotype of diarrheagenic *E. coli,* which is associated with infant diarrhea. The hallmark of EPEC infections is their ability to produce attaching and effacing (A/E) lesions as a result of intimate bacterial adherence to enterocytes and the translocation of bacterial proteins through type III secretion system. The multifunctional and interdependent properties of the effectors contribute to the host cell disruption. The consequences of EPEC infection are: the reorganization of the host cell cytoskeleton underneath adherent bacteria, inhibition of nutrient and water transport, mitochondrial dysfunctions, weak intestinal inflammation, epithelial barrier function disruption and severe watery diarrhea. Despite the recent knowledge development, the mechanism of EPEC diarrhea is still ambiguous. Due to the absence of a proper animal model, further studies should be conducted in volunteers or at least in primates to determine the underlying mechanisms.

1. Introduction. 2. Pathogenicity island LEE. 2.1. Adherence. 2.1.1. BFP pili. 2.1.2. Type 1 pili. 2.1.3. *E. coli* common pili. 2.1.4. Flagella. 3. Type III system of secretion. 3.1. Effector proteins of EPEC. 3.2. Intimin. 3.3. Tir. 3.4. Disruption of tight junctions. 3.5. Invasion ability and avoidance of phagocytosis. 4. Impact of EPEC on host cell apoptosis. 5. Other secretion systems. 6. Typical and atypical EPEC. 7. Summary

Słowa kluczowe: typowe, atypowe EPEC, systemy sekrecji, adhezja
Key words: typical, atypical EPEC, secretion systems, adherence

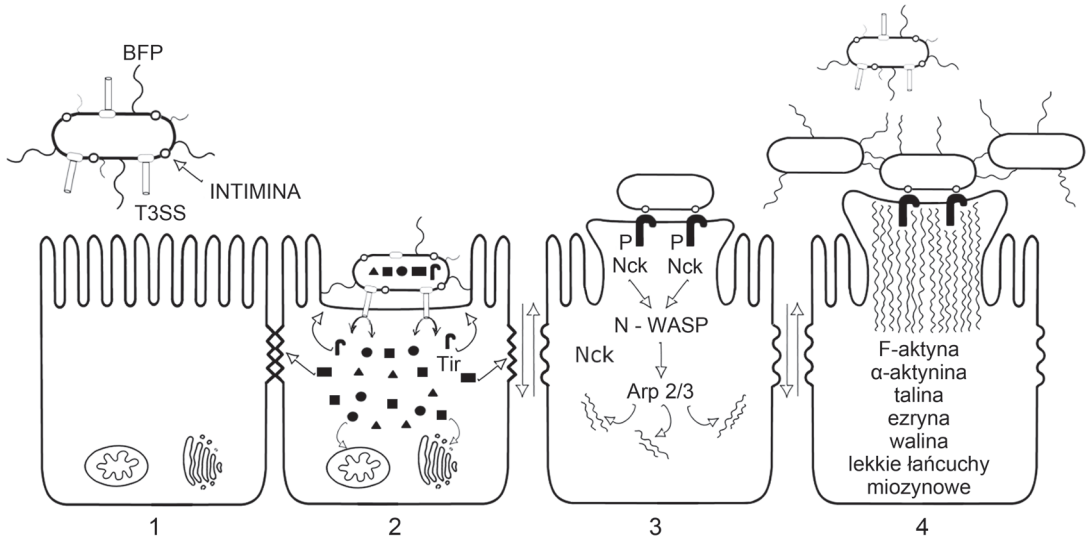
1. Wprowadzenie

Escherichia coli (*E. coli*) jest jednym z najlepiej poznanych gatunków bakterii. Należąca do rodziny *Enterobacteriaceae* pałeczka okrężnicy zalicza się do drobnoustrojów Gram-ujemnych, względnie beztlenowych, fermentujących i oksydazo-ujemnych. Gatunek *E. coli* obejmuje szczepy niepatogenne, które stanowią składnik fizjologicznej flory jelit ludzi i zwierząt oraz szereg zróżnicowanych pod względem potencjału chorobotwórczego szczepów patogennych. Dotychczas opisano 6 grup chorobotwórczych odpowiedzialnych za zakażenia jelitowe: enterotoksynogenne *E. coli* (ETEC), enteropatogenne *E. coli* (EPEC), enteroinwazyjne *E. coli* (EIEC), enteroagregacyjne *E. coli* (EAEC), enterokrwotoczne *E. coli* (EHEC) lub shigatoksyczne *E. coli* (STEC) oraz *E. coli* o rozsianym typie adhezji (DAEC) [40].

W ramach niniejszego opracowania omówione zostały szczepy EPEC, które stanowią ważny czynnik etiologiczny biegunek u dzieci na całym świecie, choć w krajach rozwiniętych zakażenia te występują rzadziej niż w krajach rozwijających się. Zakażenia szczepami EPEC dotyczą zarówno środowiska szpitalnego jak i pozaszpitalnego i charakteryzują się wodnistą biegunką, której towarzyszyć może wysoka gorączka oraz wymioty.

Szczepy EPEC indukują w enterocytach jelita rozwój charakterystycznych zmian histopatologicznych określanych akronimem A/E (attaching and effacing), polegających na zacieraniu struktury mikrokosmków poprzez reorganizację aktynowego cytoszkieletu (Rys. 1). Poza EPEC zdolność wywoływania w nabłonku jelita zmian typu A/E posiadają m.in.: EHEC, *E. albertii* oraz patogeny zwierzęce takie jak *Citrobacter rodentium,* czy enteropatogenne *E. coli* chorobotwórcze dla królików (REPEC) [93]. Szczepy EHEC różnią się od EPEC zdolnością produkcji toksyny Shiga odpowiedzialnej za uszkodzenie nerek i rozwój zespołu hemolityczno-mocznicowego (HUS). *E. albertii* została opisana w 2003 roku wśród szczepów wykrytych w próbkach kału dzieci z biegunką zamieszkujących

* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, ul. T. Chałubińskiego 4, 50-368 Wrocław; tel. 71 7841278; e-mail: pawlowska.barba@gmail.com



Rys. 1. Model patogenezy EPEC: 1–2. Adhezja EPEC do komórek nabłonka dystalnego odcinka jelita cienkiego połączona z translokacją białek efektorowych (oznaczonych na schemacie symbolami geometrycznymi wewnątrz komórki) poprzez T3SS. 3. Reorganizacja cytoszkieletu komórki nabłonka pod wpływem ścisłej adhezji EPEC. 4. Powstanie aktynowego piedestału bezpośrednio pod przylegającymi bakteriami.

Bangladesz [41]. REPEC jest przyczyną biegunki o ciężkim przebiegu u królików, ale cechy kliniczne typowe dla zakażenia tą grupą bakterii są podobne do zakażeń EPEC u ludzi. *C. rodentium* powoduje hiperplazję śluzówki jelita u myszy, a w przypadku ciężkiego przebiegu zakażenia może prowadzić do wypadnięcia odbytu. Cechą wspólną wszystkich patogenów A/E jest obecność w ich genomie chromosomalnej wyspy patogenności LEE (the locus of enterocyte effacement), która niesie geny konieczne do indukowania w zakażonych enterocytach zmian typu A/E.

2. Wyspa patogenności LEE

LEE występująca u EPEC posiada 35 624 bp, ale jej wielkość może się różnić u szczepów EPEC i EHEC w zależności od wielkości regionów flankujących. W skład regionów flankujących mogą wchodzić sekwencje insercyjne IS (insertion sequence), profagi i geny kodujące białka efektorowe. Obecny w regionie flankującym 3' LEE gen *lifA*/*efa* koduje limfostatynę, czyli białko odgrywające ważną rolę w patogenezie zakażeń ze względu na właściwości immunomodulujące. LEE zawiera w swoim składzie 38,36% glicyny i cytozyny, czyli mniej niż wynosi odsetek tych aminokwasów w reszcie genomu *E. coli* (50,8%) oraz w regionie flankującym zawierającym gen *lifA*/*efa* (44,4%). Różnica w zawartości glicyny i cytozyny pomiędzy wyspą patogenności, a regionem flankującym uniemożliwia potraktowanie tych elementów jako jedności [78]. Zróżnicowanie w zawartości glicyny i cytozyny pomiędzy wyspą patogenności, a resztą genomu jest typowe dla różnych gatunków bakterii, co sugeruje nabycie tego ruchomego elementu genetycznego od innego gatunku na drodze horyzontalnego przekazu genów. W przypadku większości szczepów EPEC wyspa patogenności LEE jest zlokalizowana na chromosomie blisko genów kodujących tRNA selenocysteiny (*selC*) lub fenyloalaniny (*pheU*, *pheV*). Wyspy LEE u różnych gatunków bakterii są wysoce konserwatywne pod względem wielkości i organizacji genów. W składzie LEE wyróżnia się 41 konserwatywnych, otwartych ramek odczytu ORF (open reading frame), które zawierają zwykle więcej niż 50 nukleotydów [27]. Większość genów LEE jest zlokalizowana w obrębie 5 operonów policistronowych (LEE 1–5) i koduje m.in.: białko adhezyjne (intiminę), system sekrecji typu III T3SS (type three secretion system) w tym białka sekrecyjne Sep (secretion of *E. coli* proteins) i Esc (*Escherichia* secretion component), chaperony Ces (chaperone of *E. coli* secretion), translokatory EspA, EspB, EspD i białka efektorowe EspF, EspG, EspH, EspZ (*E. coli* secretion protein), Map (methionine aminopeptidase) oraz receptor dla intiminy Tir (translocated intimin receptor). Dodatkowo, LEE zawiera również geny kodujące regulatory takie jak: Ler (LEE-encoded regulator), GlrR (global regulator of LEE proteins, repressor) i GlrA (global regulator of LEE proteins, activator). Regulacja LEE jest złożonym procesem, na który składa się wiele czynników regulacyjnych kodowanych przez LEE, ale również czynników środowiskowych i globalnych systemów regulacji *E. coli* (H+NS, IHF, FIS, Quorum sensing, odpowiedź SOS). Ler jest głównym regulatorem transkrypcyjnym, który działa jako represor dla LEE-1 i aktywator LEE2-5, tworząc ujemne sprzężenie zwrotne [25, 64]. Ze względu na różnorodność kodowanych białek, pełna sekwencja LEE jest zwykle dzielona na trzy regiony. Na jednym końcu

kodowane są wszystkie białka związane z T3SS, na drugim białka sekrecyjne, a gen kodujący intiminę znajduje się pośrodku i rozdziela oba skrajne regiony [22].

2.1. Adhezja EPEC

Spożyte wraz z pokarmem EPEC kolonizują dystalny odcinek jelita cienkiego za pośrednictwem adhezyn, tj. fimbrii, czynnika Efa1/LifA oraz intiminy. Wśród fimbrii adhezyjnych EPEC wyróżnia się: fimbrie typu 1, fimbrie BFP (bundle forming pilus), fimbrie ECP (*E. coli* common pilus) oraz obecne u szczepów pozbawionych genu *ler* trzy rodzaje fimbrii: a) długie, cienkie b) sztywne, wygięte oraz c) krótkie, cienkie [5, 26, 34, 35, 73].

2.1.1. Fimbrie BFP

Należące do rodziny fimbrii typu IV, fimbrie BFP przypominają długie, giętkie wypustki, które mają skłonność do splatania się na kształt sznurów. Do innych patogenów wykazujących ekspresję fimbrii typu IV zalicza się m.in. *Neisseria gonorrhea*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Clostridium perfringens*. Synteza fimbrii BFP kodowana jest przez 14 genów operonu zlokalizowanego na plazmidzie EAF (EPEC adherence factor) o masie 50–70 kDa. Produktem genów plazmidu EAF jest również regulator Per (plasmid encoded regulator), który należy do rodziny białek AraC. Obecność plazmidu EAF jest podstawą podziału EPEC na typowe i atypowe szczepy [85]. Regulator Per odpowiada za prawidłową transkrypcję genu *bfp* oraz aktywację transkrypcji genów zarówno na jak i poza LEE [86]. Analiza sekwencji aminokwasów pierwszego genu operonu *bfp*, tj. genu *bfpA,* u różnych szczepów EPEC wykazała istnienie 9 alleli tego genu, które na podstawie stopnia podobieństwa sekwencji podzielono na dwie grupy: α lub β [51]. Gen *bfpA* koduje białko prekursorowe, z którego po odcięciu przez peptydazę BfpP hydrofilowego odcinka sygnałowego powstaje główna strukturalna podjednostka fimbrii BFP (bundlina) o masie 19 kDa. W przestrzeni periplazmatycznej oksydoreduktaza (DsbA) stabilizuje główną globularną domenę poprzez katalizowanie reakcji, prowadzących do powstania wysoce konserwatywnego wiązania dwusiarczkowego w C-końcowym odcinku białka budującego BFP. Obecność konserwatywnego wiązania dwusiarczkowego jest charakterystyczną cechą fimbrii typu IV. Pozostałe geny operonu *bfp*, tj. *bfpB bfpL*, *bfpP*, *bfpU* odpowiadają za prawidłową biosyntezę fimbrii i ich funkcje. Rolę dostarczającej energię ATPazy podczas syntezy fimbrii BFP odgrywa białko BfpD [72]. Mutacje w wyżej wymienionych genach (oprócz *bfpH* i *bfgF*) uniemożliwiają biosyntezę fimbrii BFP, a nieprawidłowości w sekwencji genu *bfpF* prowadzą do zaburzeń ich funkcji. Dodatkowo, brak fimbrii BFP wiąże się z utratą zlokalizowanego typu adhezji i właściwości autoagregacyjnych szczepów EPEC. Białko BfpH prawdopodobnie jest liticzną transglikozylazą, która przypuszczalnie hydrolizuje warstwę peptydoglikanu umożliwiając podjednostkom strukturalnym BFP osiąganie błony zewnętrznej. Adhezja szczepów EPEC do nabłonka jelita jest możliwa dzięki obecności na powierzchni komórek gospodarza odpowiednich receptorów wiążących adhezyny. Fimbrie BFP zbudowane z głównej podjednostki α wiążą się z N-acetylolaktozaminą (LacNAc). Niewielkie powinowactwo do LacNAc jest kompensowane obecnością co najmniej dwóch miejsc wiążących na każdym monomerze białka budującego BFP. Podjednostka główna kodowana przez allel β genu *bfpA* wykazuje brak aktywności wiążącej LacNAc, co sugeruje obecność innych receptorów wiążących BFP na powierzchni komórek gospodarza [42].

Fimbrie BFP są istotnym czynnikiem wirulencji EPEC. Pełnią one zasadniczą rolę podczas zakażenia, gdyż biorąc udział we wstępnej adhezji EPEC do enterocytów, odpowiadają za zlokalizowany typ adhezji (tzw. fenotyp LA) oraz przyczyniają się do rozwoju biofilmu. Rola w procesie tworzenia biofilmu przez EPEC polega na promowaniu interakcji pomiędzy komórkami bakteryjnymi, co prowadzi do ich autoagregacji, a następnie powstania trójwymiarowych mikrokolonii. [59] Retrakcja fimbrii BFP umożliwia natomiast rozprzestrzenianie się komórek bakteryjnych poza strukturę biofilmu na etapie dyspersji [13]. Proces retrakcji, który prowadzi do degradacji głównej podjednostki białkowej fimbrii BFP odgrywa również ważną rolę w ścisłej adhezji EPEC do komórek nabłonka, a dzięki temu w indukowaniu zmian histopatologicznych A/E poprzez translokację białek efektorowych T3SS. Za degradację białka BfpA budującego fimbrie BFP odpowiada podjednostka BfpF będąca ATPazą dostarczającą niezbędną energię podczas dysocjacji fimbrii [96]. Badania przeprowadzone na ochotnikach wykazały, że fimbrie BFP pełnią kluczową rolę w patogenezie zakażeń EPEC. Szczepy pozbawione genu *bfp* choć kolonizują jelito są około 200 razy mniej wirulentne niż szczepy posiadające *bfp* i powodują znacznie łagodniejszą biegunkę [7].

2.1.2. Fimbrie typu 1

Na powierzchni komórki bakteryjnej występuje od kilku do kilkuset fimbrii, które mogą należeć do różnych rodzajów. Większości bakterii z rodziny *Enterobacteriacea* wykazuje ekspresję fimbrii typu 1, które są kodowane przez chromosomalne geny operonu *fim*. Fimbrie typu 1 są zbudowane z wielu powtarzających się podjednostek białka strukturalnego (piliny) sztywne wypustki w kształcie helis. Fimbrie typu 1 mają długość ok. 1 μm i średnicę ok. 7 nm. Na dystalnym końcu każdej wypustki znajduje się białko adhezyjne (FimH), które wiąże się z glikoproteinowym receptorem na

powierzchni komórki gospodarza. Bakterie posiadające fimbrie typu 1 są zdolne do adhezji do komórek nabłonka oraz hemaglutynacji erytrocytów. Proces aglutynacji jest hamowany przez mannozę lub jej analogi, dlatego fimbrie typu 1 są określane mianem fimbrii mannozo-wrażliwych MS (mannose-sensitive) [83, 92]. Badania przeprowadzone na grupie ochotników wykazały, że fimbrie MS typu 1 są immunogenne [24, 47].

2.1.3. Fimbrie powszechne *E. coli*

Odrębnie morfologicznie od fimbrii typu 1 oraz BFP są fimbrie powszechne *E. coli* ECP (*E. coli* common pilus), które występują zarówno u komensalnych jak i patogennych szczepów [71, 73]. Ekspresja ECP jest indukowana w odpowiednich warunkach hodowli, tj. w podłożach do hodowli linii komórkowych, w temperaturze 37°C oraz w obecności komórek nabłonka. Czas, po którym szczepy EPEC zaczynają produkować ECP zależy od rodzaju hodowli: bakterie hodowane w DMEM wykazują ekspresję ECP już po 1,5 godziny od zakażenia komórek, podczas gdy te hodowane w LB produkują tego rodzaju fimbrie dopiero po 4,5 godzinach. Analiza ultrastrukturalna wykazała, że równomiernie rozmieszczone na powierzchni bakterii, fimbrie ECP są cienkie (3 nm średnicy) oraz półgiętkie. Główna podjednostka strukturalna ECP jest kodowana przez wysoce konserwatywny gen *ecpA* (*yagZ* w przypadku szczepu K-12, *matB* u szczepów związanych z zapaleniem opon mózgowych). Badania przeprowadzone przez Saldana i wsp. [76] wykazały, że fimbrie ECP, rozpoznając receptory na powierzchni komórek nabłonka, odgrywają rolę podczas wstępnej adhezji. Sugeruje się również, że ECP są konieczne do stabilizacji adherujących bakterii, co sprzyja ich kolonizacji. Dodatkowo, wewnątrz mikrokolonii fimbrie ECP występują tylko wokół komórek EPEC, podczas gdy dłuższe wypustki fimbrialne BFP posiadają większy zasięg, wykraczają poza obszar pojedynczych bakterii i tworzą strukturę podobną do sieci [76].

2.1.4. Rzęski

Oprócz fimbrii udział w adhezji EPEC biorą rzęski. Są to długie (ok. 10 μm) wypustki białkowe zbudowane z trzech charakterystycznych części: ciałka podstawowego, haka oraz włókna. Synteza rzęsek jest złożonym procesem, wymagającym obecności około 50 różnorodnych białek, które wchodzą w skład pojedynczych wypustek lub odpowiadają za ich prawidłowe funkcjonowanie. Ciałko podstawowe jest odpowiedzialne za ruch rzęski i składa się z czterech pierścieni zakotwiczonych w błonie cytoplazmatycznej i zewnętrznej. Hak pełni funkcję elastycznego łącznika ciałka podstawowego z włóknem i jest zbudowany z białka FlgE. Włókno składa się z lekko spiralnych rzędów osiowo ułożonych monomerów flageliny, czyli białka FliC. Dystalny koniec włókna jest opłaszczony czapeczką z białka FliD [54, 79]. Obecność rzęsek na powierzchni bakterii umożliwia jej ruch, który jest niezbędny do rozprzestrzeniania się wielu patogenów wewnątrz organizmu gospodarza. Rzęski są kluczowym czynnikiem wirulencji m.in. *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, i *Helicobacter pylori.* Właściwości adhezyjne rzęsek zostały potwierdzone na podstawie wyników badań przeprowadzonych na szczepach należących do gatunków *Pseudomonas aeruginosa* i *Clostridium difficile*, które adherują do śluzu poprzez wiązanie mucyn. Rzęski biorą również udział w tworzeniu biofilmu przez *Stenotrophomonas maltophilia*, *E. coli* i *Aeromonas* spp. [28]. Dodatkowo, Zhou i wsp. [98] wykazali, że rzęski pełnią funkcję immunomodulującą, ponieważ indukują syntezę interleukiny 8 (IL-8) w komórkach nabłonka jelita. Bardziej szczegółowe badania przeprowadzili Khan i wsp. [50], którzy dowiedli, że rzęski silnie aktywują receptory TLR5 (toll-like receptor 5). FliC jest prawdopodobnie pierwszym i dominującym bodźcem prozapalnym podczas zakażenia *E. coli.*

Z badań Giron i wsp. [35] nad zdolnością adhezji szczepów EPEC wynika, że kontakt z powierzchnią nabłonka gospodarza oraz wydzielane przez komórki eukariotyczne cząsteczki sygnałowe prowadzą do indukcji syntezy rzęsek. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń badacze sugerują, że rzęski są u EPEC ważnym czynnikiem adhezji do komórek linii HeLa. Cząsteczki pobudzające ekspresję rzęsek, które są produkowane przez komórki eukariotyczne pozostają jak do tej pory nieznane. Podobne wyniki otrzymali Erdem i wsp. [28], którzy wykazali zdolność wiązania szczepów EPEC do mucyn, czyli glikoprotein wchodzących w skład śluzu. Komórki nabłonka jelita wytwarzają śluz, który stanowi pierwszą linię obrony przed bakteriami chorobotwórczymi poprzez ograniczanie ich ruchliwości, wiązanie i usuwanie z przewodu pokarmowego wraz z ruchami perystaltycznymi. W związku z powyższym istnieje pogląd, że mucyny ograniczają adhezję szczepów EPEC do komórek nabłonka. Antagonistyczną hipotezę stawiają Erdem i wsp. [28], których doświadczenia przeprowadzone na tkankach bydlęcych wykazały, że obecność rzęsek jest kluczowa podczas adhezji do komórek. Mutacje w genie *fliC* powodowały znaczący spadek adhezji badanych szczepów, co podkreśla istotność wiązania rzęsek z mucynami. Na tej podstawie Erdem i wsp. [28] sugerują, że wiązanie śluzu jest dla szczepów EPEC korzystne. Inni badacze, Cleary i wsp. [13], choć potwierdzili obecność rzęsek u adherentnych szczepów EPEC, nie stwierdzili ich wpływu na zdolność adhezji: pomimo, że badane szczepy UMD883 ($bfpA^-$ $espA^-$ eae^+) i UMD888 ($bfpA^-$ $espA^-$ eae^-) były urzęsione, nie posiadały zdolności adhezji do komórek linii Caco-2.

3. System sekrecji typu III

Bezpośrednia adhezja do komórek gospodarza umożliwia patogenom translokację różnorodnych cząsteczek efektorowych. Odpowiedzialny za wydzielanie białek efektorowych, aparat sekrecji typu III, występuje u EPEC oraz u *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp., *Pseudomonas* spp., *Chlamydia* spp. oraz *Vibrio* spp. Ze względu na budowę T3SS porównywany jest do „molekularnej strzykawki". Kompleks ten posiada masę ~3,5 MDa i składa się z zakotwiczonej w ścianie komórkowej podstawy oraz struktury podobnej do igły, która rozciąga się do przestrzeni zewnątrzkomórkowej bakterii. „Tłok strzykawki" przechodzi przez błonę wewnętrzną, przestrzeń periplazmatyczną oraz błonę zewnętrzną bakterii. W przypadku EPEC w obrębie podstawy wyróżnia się pierścień wewnętrzny (EscJ, EscD) i zewnętrzny (EscC) oraz cylindryczny kanał (EscI), który łączy oba pierścienie [65]. Dodatkowym elementem systemu sekrecji na poziomie części podstawnej jest aparat eksportu. Jest to wysoce konserwatywna grupa białek błony wewnętrznej (EscR, EscS, EscT, EscU, EscV), która nadzoruje transport cząsteczek efektorowych poprzez kontrolę swoistości substratów [1]. W skład kompleksu „igły" wchodzi wiele kopii białka EscF, tworzących cienką rurkę, która na dystalnym końcu przechodzi w osłonę zbudowaną z białka EspA [91]. Długość „igły" zależy od ilości włókien EspA. Zadaniem tego elementu systemu sekrecji jest połączenie bakterii z komórką gospodarza, czyli utworzenie mostu, przez który transportowane są cząsteczki efektorowe [65, 81]. Końcówka „igły" służy jako platforma, na której mocuje się translokon, czyli struktura odpowiedzialna za przenoszenie cząsteczek efektorowych przez membranę. Translokon jest zbudowany z białek przezbłonowych (EspB, EspD) tworzących kanał wewnątrz błony komórki nabłonka jelita [53]. W celu uniknięcia przedwczesnych interakcji pomiędzy transportowanymi cząsteczkami a czynnikami degradującymi, powstają kompleksy efektorów z białkami opiekuńczymi. Są to znajdujące się w bakteryjnej cytoplazmie proteiny o małej masie molekularnej (< 15 kDa) i kwaśnym odczynie, które chronią i stabilizują cząsteczki efektorowe oraz regulują ich wydzielanie [15]. Na podstawie homologii w sekwencji aminokwasów oraz pełnionej funkcji wewnątrz rodziny białek opiekuńczych T3SS wyróżniono 4 klasy (IA, IB, II, III) [67]. Efektywny transport cząsteczek bezpośrednio do komórki gospodarza jest możliwy dzięki obecności wysoce konserwatywnej ATPazy, która hydrolizuje ATP. Ze względu na dynamiczne interakcje z wieloma białkami (np. EscL i EscQ), Tir oraz ze składnikami błonowymi aparatu sekrecji typu III proces hydrolizy ATP przebiega jednocześnie z wydzielaniem białek efektorowych. Szczepy EPEC pozyskują energię za pomocą wykazującego homologię z F_0F_1ATP-azą białka EscN. Efektywność hydrolizy ATP zależy od obecności jonów Mg^{2+} oraz stężenia i struktury oligometrycznej EscN [3]. Pozyskiwanie energii jest głównym zadaniem EscN, ale ATP-aza jest również odpowiedzialna za uwalnianie cząstek efektorowych z wiązań z białkami opiekuńczymi przed wejściem do „igły". Po rozpadzie kompleksów, białka opiekuńcze wracają do cytoplazmy komórki bakteryjnej i ulegają ponownemu wiązaniu z kolejnymi wydzielanymi cząsteczkami [90].

3.1. Białka efektorowe EPEC

T3SS transportuje wiele bakteryjnych czynników wirulencji wprost do cytozolu komórki gospodarza, co umożliwia bakterii skuteczne zakłócanie procesów fizjologicznych przebiegających w atakowanej komórce [17]. Geny kodujące białka efektorowe znajdują się zarówno w obrębie jak i poza LEE. Rodzina cząsteczek efektorowych jest zróżnicowana i wykazuje wielokierunkowe działanie nakierowane na większość struktur w komórce gospodarza. Dodatkowo, cząsteczki efektorowe są wielofunkcyjnymi białkami, które mogą ze sobą współpracować w sposób synergiczny lub osiągając redundancję [18]. System sekrecji typu III rozpoznaje efektory na podstawie sekwencji składającej się z około 15–20 reszt aminokwasowych znajdujących się w obrębie regionu N-końcowego. W tym regionie znajduje się również sekwencja (między 50 a 150 resztą aminokwasową), którą rozpoznają swoiste białka opiekuńcze. W przypadku niektórych cząsteczek efektorowych (np. Tir) duże znaczenie w przebiegu prawidłowej sekrecji i translokacji ma dodatkowo region C-końcowy [17]. W celu osiągnięcia zamierzonego efektu hierarchia transportowanych cząsteczek jest ściśle zdefiniowana. Geny kodujące cząsteczki efektorowe ulegają ekspresji w określonym czasie i z odpowiednim nasileniem, ale na efektywną translokację cząsteczek mają również wpływ czynniki takie jak: stężenie białka efektorowego wewnątrz komórki bakteryjnej, prawidłowe połączenie z białkiem opiekuńczym oraz trwała i właściwa adhezja bakterii do komórki gospodarza [57].

Pełen zestaw cząsteczek efektorowych EPEC jest prawdopodobnie kodowany przez 21 genów oraz co najmniej 5 pseudogenów (zawierających błędy w obszarze kodującym). Do białek efektorowych kodowanych na LEE zalicza się białka: Tir, Map, EspB, EspF, EspG, EspH, oraz EspZ. Wszystkie odkryte tzw. LEE-efektory posiadają destrukcyjne działanie, które w znacznym stopniu zmienia prawidłową budowę i funkcje komórek nabłonka jelita człowieka [18]. W skład drugiej grupy cząsteczek efektorowych T3SS wchodzą białka kodowane poza obszarem LEE (tzw. non-LEE effectors), a ich geny znajdują się na rozproszonych wewnątrz genomu sześciu wyspach patogenności. Niski odsetek

glicyny i cytozyny w sekwencji aminokwasów tych fragmentów DNA oraz sąsiedztwo genów pochodzących od profagów świadczą o pozyskaniu wysp kodujących białka efektorowe na drodze horyzontalnego przekazu genów. Cząsteczki efektorowe pochodzące spoza LEE są bardziej konserwatywne wśród patogenów A/E w porównaniu z cząsteczkami kodowanymi na LEE, które wykazują dużą zmienność [43]. Większość białek efektorowych kodowanych poza LEE ma niewyjaśniony mechanizm działania wewnątrz komórki gospodarza, ale sugeruje się, że są one wymagane do osiągnięcia pełnej zjadliwości EPEC. Dotychczas poznano rolę m.in. białka NleA, hamującego transport cząsteczek pomiędzy retikulum endoplazmatycznym a aparatem Golgiego w komórce gospodarza, cząsteczek efektorowych NleE i NleH, które aktywują wrodzoną odpowiedź immunologiczną oraz białka EspJ odpowiedzialnego za hamowanie fagocytozy. Podczas zakażenia szczepy EPEC hamują aktywność układu immunologicznego jelita, co kontrastuje z niedawno poznaną rolą NleE oraz NleH. Poznane cząstki efektorowe T3SS działają przeciwzapalnie, natomiast NleE oraz NleH indukują reakcje prozapalne. Ze względu na przeciwstawny efekt działania cząsteczek efektorowych na układ odpornościowy gospodarza istnieje hipoteza, że szczepy EPEC przejściowo wzbudzają, a następnie hamują odpowiedź prozapalną przed destrukcją ciasnych połączeń międzykomórkowych [18].

3.2. Intimina

Rozwój zmian w cytoszkielecie gospodarza jest poprzedzony ścisłą adhezją EPEC do błony enterocytów. Za przyleganie bakterii do komórek gospodarza odpowiada intimina, czyli obecne u wszystkich wirulentnych szczepów EPEC powierzchowne białko adhezyjne. Intimina ma masę 94 kDa i jest kodowana przez gen *eae*, który wchodzi w skład LEE. Produkt genu *eae* składa się ze ściśle konserwatywnego regionu zawierającego około 700 aminokwasów, wewnątrz którego znajduje się domena w kształcie beta cylindra o właściwościach autotransportera oraz z karboksykońcowego regionu złożonego z 280 aminokwasów (Int_{280}). Wewnątrz Int_{280} cysteina w położeniu 937 (Cys_{937}) posiada właściwości wiążące receptor [31]. Region Int_{280} składa się z dwóch domen immunoglobulinopodobnych oraz z łatwo dostępnej domeny przypominającej lektynę typu C [52]. Dotychczas opisano 27 typów intiminy, ponieważ domena Int_{280} wykazuje wysoki stopień zróżnicowania. Najczęściej występujące typy intiminy to: α, β, γ, δ oraz ε [30, 94]. Intimina α jest charakterystyczna dla szczepów należących do klonu 1 (posiadających antygen rzęskowy H6), intimina β występuje u szczepów klonu 2 (posiadających antygen rzęskowy H2), intimina γ ulega ekspresji u szczepów serotypu O55:H7. Dodatkowo przypuszcza się, że różne warianty intiminy są odpowiedzialne za zróżnicowany tropizm tkankowy prezentujących je szczepów *E. coli* [32 ,69, 97]. Co więcej istnieją dowody na to, że intimina wiąże również receptory inne niż Tir, obecne na powierzchni komórek gospodarza, w tym β_1-integryny oraz nukleolinę [36, 82].

3.3. Tir

Receptor Tir dla intiminy (niefimbrialnej adhezyjny błony zewnętrznej EPEC) jest białkiem o masie 78 kDa kodowanym na LEE przez gen *tir*. Był to pierwszy odkryty receptor bakteryjny, który jest wbudowany w błonę plazmatyczną komórki eukariotycznej na skutek „wstrzyknięcia" przez T3SS. Przed właściwą translokacją dochodzi do powstania przejściowego kompleksu Tir z jego białkiem opiekuńczym CesT, który następnie rozpada się i umożliwia wbudowanie receptora w błonę komórkową gospodarza. Tir zawiera dwie domeny transbłonowe oraz centralną domenę wystającą poza komórkę i tworzy tzw. „spinkę do włosów". Domeny amino- i karboksykońcowe Tir są zakotwiczone w cytoplazmie i ulegają interakcji z białkami gospodarza. Odcinek C-końcowy zawiera wiele reszt tyrozynowych, treoninowych i serynowych, które potencjalnie mogą ulegać fosforylacji. Po fosforylacji treoniny i seryny dochodzi do zwiększenia masy cząsteczkowej Tir do 90 kDa [49]. Intimina wiąże się z wysoce konserwatywną częścią centralną Tir, czyli z pozakomórkową pętlą „spinki" [16, 38, 87]. Przyłączenie intiminy indukuje oligomeryzację Tir w błonie plazmatycznej komórki gospodarza bezpośrednio pod przylegającą bakterią, co jest sygnałem do fosforylacji tyrozyny w domenie C-końcowej. Za proces fosforylacji tyrozyny w położeniu 474 (Y474) oraz 454 (Y454) odpowiedzialna jest kinaza c-Fyn z rodziny Src oraz kinazy należące do rodziny Abl, które przejściowo wiążą się z Tir [70]. Fosforylacja tyrozyny jest sygnałem do rekrutacji białek adaptorowych Nck1 i Nck2, które pełnią rolę aktywatorów procesu polimeryzacji aktyny. Proces ten zależy od białka N-WASP, należącego do rodziny białek syndromu Wiskott-Aldrich (Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP) [10]. Czynnik N-WASP jest odpowiedzialny za aktywację białek Arp2/3 spokrewnionych z aktyną (actin related proteins 2/3), które są niezwykle istotne w nukleacji *de novo* monomerów F-aktyny [11]. Opisana powyżej kaskada reakcji prowadzi ostatecznie do powstania struktur podobnych do piedestału, czyli nagromadzenia się, tuż pod przylegającymi bakteriami, włókien spolimeryzowanej F-aktyny, α-aktyniny, taliny, ezryny, waliny oraz lekkich łańcuchów miozynowych [22]. Nasilenie procesu tworzenia piedestału zależy od warunków, w jakich znajdują się zakażone komórki nabłonka. Badania *in vivo* i *ex vivo* wykazują mniejszą zdolność EPEC do tworzenia tych struktur w porów-

naniu z komórkami hodowanymi *in vitro* [29]. Dodatkowo, badania *ex vivo* dowiodły, że fosforylacja Tir jest nieistotna podczas kolonizacji ludzkiego nabłonka jelita, a aktywacja kompleksu N-WASP jest niezależna od Nck. Powstawanie zmian A/E *ex vivo* wydaje się być bardziej złożone niż w przypadku badań prowadzonych na liniach komórkowych, ponieważ w komórkach jelita występuje więcej różnorodnych białek, które przypuszczalnie mogą uczestniczyć w tym procesie [80].

Intimina i Tir są kluczowymi czynnikami wirulencji EPEC, ponieważ biorą aktywny udział w procesie kolonizacji i rozwoju zakażenia, choć rola polimeryzacji aktyny nie została do końca wyjaśniona. Kaskady reakcji prowadzące do polimeryzacji aktyny są nieistotne podczas tworzenia zmian A/E, tym nie mniej znacznie wpływają na dopasowanie się patogenu i skuteczną kolonizację. Bakterie wykorzystują ruchliwość piedestałów aktynowych (wydłużanie się i skracanie) do poruszania się po powierzchni nabłonka oraz rozprzestrzeniania komórek potomnych [77]. Współpraca Tir z innymi białkami efektorowymi może mieć dodatkowy wpływ m.in. na połączenia międzykomórkowe oraz na zdolność inwazji EPEC.

3.4. Destrukcja połączeń międzykomórkowych

Komórki nabłonka połączone są za pomocą ciasnych połączeń, które składają się z kilku rodzajów białek (głównie klaudyny i okludyny). Połączenia międzykomórkowe zapewniają integralność nabłonka i zapobiegają przypadkowym odkształceniom lub rozluźnieniu się przestrzeni pomiędzy pojedynczymi komórkami. Tkanka nabłonkowa stanowi przede wszystkim barierę ochronną, w której ciasne połączenia blokują przepływ molekuł przez przestrzeń pomiędzy sąsiadującymi ze sobą komórkami. Zaburzenia w tym obszarze nabłonka prowadzą do zmian przepuszczalności i prawdopodobnie przyczyniają do rozwoju biegunki [19, 52]. Kluczowa w procesie destrukcji ciasnych połączeń jest intimina oraz dwa białka efektorowe: EspF i Map. Wpływ intiminy polega na kontrolowaniu efektorów i efekt ten jest niezależny od Tir, co sugeruje jej zdolność wiązania z receptorami komórek gospodarza. Sugeruje się, że bakterie mogą regulować działanie cząsteczek efektorowych wewnątrz komórek gospodarza w sposób zależny i niezależny od Tir. EspF oraz Map działają zdecydowanie skuteczniej jeśli działają synergicznie, choć dominującą rolę odgrywa Map [19].

3.5. Zdolność inwazji i unikanie fagocytozy

Szczepy EPEC, które wykazują ekspresję EspT indukują przebudowę powierzchni nabłonka i wykazują zdolność inwazji [8]. Tworzenie charakterystycznych marszczeń błony cytoplazmatycznej komórek nabłonka i lamellipodiów jest procesem wykorzystywanym przy inwazji takich patogennych bakterii jak *Salmonella* spp. czy *Shigella* spp. [66, 68]. Białko EspT należy do grupy efektorów WxxxE, czyli do białek wykazujących funkcje GTPaz. Modulowanie cytoszkieletu komórki gospodarza przez EspT jest możliwe dzięki aktywacji białek Rac1, Cdn42 (należących do rodziny białek Rho) oraz Wawe2 (z rodziny WASP). Główną rolą białek Rho jest regulowanie organizacji specyficznych filamentów F-aktyny, a Wawe2 posiada zdolność aktywacji Arp2/3. Szereg reakcji przebiegających na skutek działania EspT prowadzi ostatecznie do powstania w błonie plazmatycznej komórki gospodarza pęcherzyków makropinocytarnych, które umożliwiają patogenom inwazję. Bakterie, które wnikają do wnętrza komórek gospodarza lokalizują się wewnątrz wakuoli ECV (*E. coli* – containing vacuoles). Na tym etapie rola Tir polega na polimeryzacji aktyny i tworzeniu piedestałów dookoła wakuoli, co jest wymagane do wewnątrzkomórkowego przeżycia (uniknięcia fagocytozy) i replikacji bakterii [8]. Zatem, w przypadku szczepów posiadających zdolność inwazji, polimeryzacja aktyny zależna od Tir jest niezbędna do rozwoju zakażenia. Szczepy EPEC, które nie posiadają wyżej wymienionych determinant inwazji pozostają poza komórką gospodarza. Wewnątrzkomórkowa degradacja patogenu jest skuteczną metodą walki z patogenami i służy, jako pierwsza linia obrony organizmu gospodarza. Działanie białka EspH obniża skuteczność fagocytozy przez makrofagi podczas zakażenia EPEC, ponieważ białko to zakłóca działanie białek Rho, hamując ich czynnik regulatorowy GEF (guanine nucleotide exchange factor). Hamowanie GEF zapobiega aktywacji GTPazy oraz istotnej podczas fagocytozy polimeryzacji aktyny. Badania przeprowadzone na linii komórkowej HeLa wykazały, że EspH powoduje zaokrąglenie komórek na skutek znacznych zniszczeń wewnątrz struktury cytoszkieletu aktynowego i prowadzi do ich odrywania od powierzchni naczynia hodowlanego [22]. Inne działanie wykazuje białko przezbłonowe wchodzące w skład translokonu (EspB), które zapobiega interakcji miozyny z aktyną. Zaburzenia w budowie aktomiozyny również prowadzą do zahamowania fagocytozy [44]. Dodatkowo, komórki bakteryjne, które nie uległy wcześniejszej opsonizacji mogą przy pomocy EspF bronić się przed makropinocytozą oraz transcytozą przez komórki M w nabłonku jelita. Jest to możliwe, ponieważ EspF hamuje kinazę fosfoinozytydu (PI3K) w komórce gospodarza, co skutkuje defosforylacją wielu białek i reorganizacją F aktyny [12, 56]. W przypadku immunofagocytozy (opsonofagocytozy) w pierwszym etapie dochodzi do opsonizacji bakterii przez IgG lub składnik dopełniacza C3b. Wykorzystanie EspJ umożliwia szczepom EPEC blokowanie receptorów (FcγR i CR3), czyli elementów wiążących opsoniny [55]. Ten szeroki wachlarz

wykorzystywanych strategii umożliwia bakteriom zarówno unikanie pochłaniania przez komórki żerne, jak i skuteczne rozwijanie zakażenia poza lub wewnątrz komórek gospodarza.

4. Wpływ EPEC na apoptozę komórek gospodarza

Zdolność dynamicznego modulowania przeżywania zakażonych enterocytów jest unikalną cechą EPEC. Jest to możliwe dzięki aktywności różnych cząsteczek efektorowych na poszczególnych, postępujących po sobie etapach zakażenia [74]. W początkowej fazie zakażenia EPEC hamują apoptozę komórek nabłonka, zapobiegając w ten sposób złuszczaniu komórek na szczycie kosmków, a tym samym usunięcie przylegających do nich bakterii. [89]. EspZ jest białkiem złożonym z 98–100 aminokwasów, które jest wydzielane przez T3SS we wczesnym etapie zakażenia. Jego działanie polega na hamowaniu wewnętrznej drogi apoptotycznej komórek nabłonka jelita, co umożliwia pałeczkom *E. coli* adhezję do powierzchni komórki gospodarza i wstrzykiwanie cząstek efektorowych [74]. Innym białkiem efektorowym odpowiedzialnym za hamowanie śmierci komórek gospodarza jest NleH, białko należące do grupy efektorów kodowanych poza LEE. Białko NleH jest homologiem OspG *Shigella* spp. i blokuje apoptozę stymulowaną przez staurosporynę, brefeldynę A i tunikamycynę. Śmierć komórek gospodarza jest jednak pożądana w późnym stadium zakażenia EPEC, gdyż prowadzi do zaburzenia funkcji bariery jelita i zwiększenia jej przepuszczalności na skutek uszkodzenia ciasnych połączeń międzykomórkowych. Jednym z czynników indukujących apoptozę jest białko EspF złożone z 206 aminokwasów, które w swoim składzie zawiera trzy, prawie identyczne sekwencje bogate w prolinę. Działanie EspF dotyczy głównie mitochondrialnej drogi apotozy, czyli prowadzi do zmiany kształtu i zaburzenia przepuszczalności błony mitochondrialnej, uruchomienia kaspazy 9 oraz 3, a następnie uwolnienia cytochromu c z mitochondriów [62]. EspF jest typową wielofunkcyjną cząsteczką efektorową aparatu sekrecji typu III, co oznacza, że poza wpływem na mitochondria wykazuje również aktywność wobec innych struktur komórkowych. Interakcje EspF z różnymi białkami gospodarza powodują m.in.: zacieranie mikrokosmków, rozluźnienie ciasnych połączeń międzykomórkowych oraz zahamowanie transportu jonów przez błonę [19, 20, 37]. Poza EspF za indukowanie apoptozy jest odpowiedzialny również czynnik Cif (cycle inhibiting factor), kodowany przez profaga λ, a następnie wbudowywany do DNA bakterii w pobliżu operonu *Bio* i wstrzykiwany do komórki gospodarza za pośrednictwem T3SS. Cif hamuje cykl komórkowy, ponieważ pod wpływem indukcji nieodwracalnego efektu cytopatycznego w komórce eukariotycznej gromadzi się nieaktywna forma kinazy zależnej od cykliny 1 (Cyclin-dependent kinase 1, Cdk1), która uniemożliwia postęp cyklu komórkowego [45].

5. Inne systemy sekrecji EPEC

Bakterie Gram-ujemne, w tym *E. coli*, wykorzystują tzw. systemy sekrecji do translokacji różnorodnych białek z cytoplazmy mikroorganizmu do wnętrza komórki gospodarza. Wiedza na temat wykorzystywania systemów sekrecji typu II (T2SS) oraz V (T5SS) przez szczepy EPEC jest jak dotychczas ograniczona w porównaniu do najlepiej poznanego systemu wydzielania T3SS.

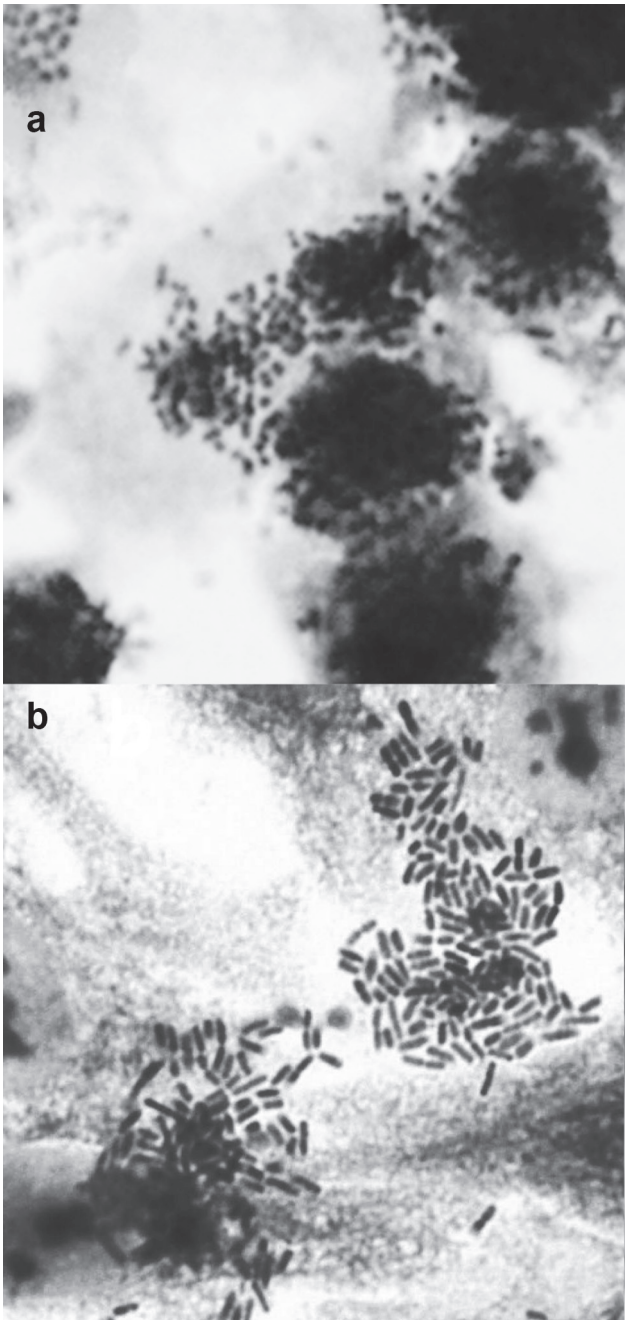
T2SS składa się z co najmniej 12 białkowych podjednostek budujących aparat sekrecji, który na powierzchni błony zewnętrznej bakterii tworzy strukturę podobną do pseudofimbrii. Mechanizm działania tego typu sekrecji zależy od białek Sec lub Tat, biorących aktywny udział w transporcie wydzielanego białka efektorowego do przestrzeni periplazmatycznej. W następnym etapie kompleksy białka z cząsteczkami Sec lub Tat rozpadają się i białko efektorowe w formie pofałdowanej transportowane jest przez T2SS do wnętrza komórki gospodarza. Szczepy EPEC wykazują ekspresję $T2SS_{H10407}$, który jest wysoce konserwatywny i występuje również u innych patogrup *E. coli* t.j.: EAEC, ETEC, EIEC oraz EHEC. Badania Baldi i wsp. [6] wykazały, że T2SS jest istotnym czynnikiem wirulencji zaangażowanym w proces dojrzewania biofilmu EPEC, ponieważ mutanty pozbawione T2SS w przeciwieństwie do szczepów dzikich rozwijają biofilm tylko do etapu związanego z powstaniem mikrokolonii. Głównym substratem T2SS jest lipoproteina SslE (secreted and surface-associated lipoprotein from *E. coli*), która w wyniku sekrecji zostaje zakotwiczona w błonie gospodarza. SslE prawdopodobnie wpływa na tworzenie biofilmu, gdyż moduluje interakcje pomiędzy komórkami oraz komórkami a powierzchnią, na której powstaje biofim. Dodatkowo, Baldi i wsp. [6] udowodnili, że wpływ T2SS oraz SslE na patogenezę zakażeń wywoływanych przez szczepy EPEC jest niezależny od obecności LEE.

Inny mechanizm działania, w odróżnieniu od T2SS, jest wykorzystywany w przypadku systemu autotransporterowego T5SS. Białka efektorowe T5SS są nazywane autotransporterami, ponieważ wydzielane białka nie wymagają dodatkowego aparatu wspomagającego ich sekrecję do peryplazmy przez błonę zewnętrzną. Cząsteczka będąca autotransporterem jest syntezowana jako białko prekursorowe, w którym domena C-terminalna tworzy w błonie zewnętrznej kanał służący do transportu domeny wewnętrznej, czyli „pasażerskiej". W kolejnym etapie na powierzchni komórki dochodzi

do uwolnienia przetransportowanej domeny N-końcowej do środowiska zewnątrzkomórkowego na drodze proteolizy [39]. Szczepy EPEC wykorzystują T5SS do translokacji cytotoksyny EspC, która jest białkiem o masie 110 kDa kodowanym przez drugą wyspę patogenności EPEC. Regulacja ekspresji genu *espC* kodującego toksynę EspC zależy od regulatora Ler, który kontroluje ekspresję cząsteczek efektorowych T3SS. Dodatkowo, Vidal i Navarro-Garcia [88] zaobserwowali kooperację systemów wydzielania. T5SS uczestniczy w sekrecji EspC do środowiska zewnątrzkomórkowego, a jej translokacja do wnętrza komórki gospodarza zachodzi przy pomocy T3SS. Reasumując, mechanizmy sekrecji białek odgrywają kluczową rolę w patogenezie EPEC, gdyż umożliwiają licznym białkom efektorowym częściowe uszkodzenie komórki gospodarza lub prowadzenie do ich apoptozy.

6. Typowe i atypowe EPEC

W 1995 roku szczepy EPEC zostały podzielone na dwie grupy: typowe (tEPEC) i atypowe (aEPEC). Podział ten opiera się na obecności plazmidu EAF u tEPEC oraz jego braku w przypadku aEPEC [46]. Bardziej szczegółowa definicja aEPEC określa, że szczepy należące do tej grupy nie posiadają fimbrii BFP oraz nie produkują toksyny Shiga, ale powodują charakterystyczne zmiany histopatologiczne A/E i należą do klasycznych lub innych serotypów nietypowych dla EPEC. Ekspresja fimbrii BFP u tEPEC wiąże się ze zlokalizowanym typem adhezji LA (localised adherence), który charakteryzuje się obecnością skupisk mikrokolonii bakterii przy jednym lub obu biegunach komórki. Obecność mannozy nie hamuje autoagregacji oraz fenotypu LA, co jednocześnie wyklucza udział fimbrii typu 1 w procesie adhezji. Fenotyp LA można obserwować zarówno *in vitro* w teście adhezji do komórek linii HEp-2 lub HeLa jak i *in vivo* w bioptatach błony śluzowej jelita osób zakażonych EPEC (Rys. 2). Ze względu na dużą heterogenność aEPEC ich typy adhezji mogą być różne w zależności od szczepu, tj.: zlokalizowany, podobny do zlokalizowanego LAL (localised adherence like), rozsiany DA (diffuse adherence), agregacyjny AA (aggregative adherence) lub szczepy te mogą nie wykazywać mannozo-opornej adhezji do komórek NA (non adherent) [83]. Fenotyp LAL występuje najczęściej wśród aEPEC i jest rozpoznawany na podstawie obecności nielicznych mikrokolonii bakteryjnych o luźnej strukturze, które powstają po wydłużonej inkubacji aEPEC z komórkami nabłonka (Rys. 2). Sugeruje się, że szczepy prezentujące LAL mogą wywoływać biegunkę. Zróżnicowanie szczepów aEPEC dotyczy również profilu genetycznego, obejmującego odmienne kombinacje genów kodujących czynniki chorobotwórczości. Biorąc pod uwagę występowanie



Rys. 2. Typy adhezji enteropatogennych szczepów *Escherichia coli* do komórek linii HEp-2: a) zlokalizowany (AA), b) podobny do zlokalizowanego (LAL)

wielu genów wirulencji na ruchomych elementach genetycznych, w tym plazmidach, wyspach patogenności i transpozonach, obecność w genomie aEPEC genów pochodzących od innych patogenów jelitowych prawdopodobnie nastąpiła w wyniku horyzontalnego transportu genów. Co więcej, część szczepów aEPEC może powstawać na skutek utraty genów, np. rodzicielski szczep tEPEC po utracie plazmidu EAF lub EHEC, który zgubił geny odpowiedzialne za kodowanie toksyny Shiga staje się szczepem aEPEC [40]. Podsumowanie charakterystycznych cech typowych i atypowych szczepów EPEC przedstawiono w tabeli I.

Tabela I
Różnicowanie typowych i atypowych szczepów EPEC

Cecha	Typowe EPEC	Atypowe EPEC
Najczęściej izolowane serotypy	O55:H6, O55:NH, O86:H34, O119:H6, 127:H6, O127:H40, O142:H6, O14:H34	O26:H11, O55:H7, O55:H34, O86:H8, O111:H25, O119:H2
Zmiany A/E	+	+
Plazmid EAF	+	–
Toksyna Shiga	–	–
Wyspa patogenności LEE	+	+
Typ adhezji (do komórek Hep-2/ HeLa)	LA	LA/LAL/DA/AA/NA
Regulacja ekspresji genów	Per, Ler, *Quorum sensing*	Ler, *Quorum sensing*
Rezerwuar	ludzie	ludzie, zwierzęta

Legenda: A/E – attaching and effacing tj. przyleganie i zacieranie struktury mikrokosmków; EAF – EPEC adherence factor tj. plazmid, który niesie geny kodujące fimbrie BFP i regulator Per; LEE – the locus of enterocyte effacement tj. wyspa patogenności kodująca czynniki niezbędne w indukowaniu zmian A/E; LA – zlokalizowany typ adhezji (localized adherence), LAL – adhezja podobna do zlokalizowanej (localised adherence like), DA – rozsiany typ adhezji (diffuse adherence); AA – agregacyjny typ adhezji (aggregative adherence); NA – brak zdolności mannozo-opornej adhezji (non adherent); Per – Plasmid encoded regulator tj. regulator transkrypcyjny kodowany na plazmidzie EAF; Ler – LEE-encoded regulator tj. główny regulator transkrypcyjny LEE

Przez wiele lat, tEPEC uważano za główny patogen niemowląt w krajach rozwijających się, ale badania epidemiologiczne przeprowadzane w ostatnim czasie sugerują wzrost liczby izolowanych szczepów aEPEC zarówno w krajach rozwijających się jak i rozwiniętych [63]. Udział aEPEC w biegunce jest nierozstrzygnięty, gdyż niektóre badania wykazują jednakową częstość izolacji aEPEC od osób zdrowych jak i chorych [84, 95]. Badania, które ujawniają związek aEPEC z występowaniem biegunki różnią się pod względem sugerowanego przebiegu zakażenia, który określany jest jako ostry lub przewlekły [2, 4, 33, 61]. Rozwój przewlekłej biegunki po zakażeniu aEPEC jest przypuszczalnie spowodowany hamowaniem apoptozy enterocytów i zdolnością tych szczepów do długotrwałej kolonizacji nabłonka jelita. Przewlekła biegunka u dzieci może prowadzić do zaburzeń w prawidłowym rozwoju, co szczególnie dotyczy niemowląt w krajach rozwijających się [61].

Człowiek jest jedynym rezerwuarem dla szczepów tEPEC, natomiast aEPEC występują również u zwierząt dzikich oraz domowych. Patogenne szczepy izolowane od zwierząt mogą należeć do serotypów (m.in. O26, O103, O119, O128, O142), które charakteryzują szczepy chorobotwórcze dla ludzi. Dodatkowo, przy pomocy nowoczesnych metod molekularnych (MLST, PFGE) wykazano bliskie pokrewieństwo szczepów aEPEC izolowanych od ludzi i zwierząt, co sugeruje, że zwierzęta mogą stanowić źródło zakażenia dla ludzi [14, 60].

7. Podsumowanie

Największą przeszkodą w kompleksowym zrozumieniu patomechanizmów działania szczepów EPEC jest brak odpowiedniego modelu zwierzęcego. Badania przeprowadzone w ostatnich latach znacznie pogłębiły naszą wiedzę na temat interakcji pomiędzy EPEC a komórkami gospodarza. Niemniej jednak, zakażenia te nie ograniczają się do jednego typu komórek i powinny być rozważane bardziej kompleksowo, tzn. w odniesieniu do całego organizmu gospodarza. Dodatkowym ograniczeniem jest brak zdolności wywoływania biegunki przez szczepy EPEC patogenne dla ludzi u zwierząt laboratoryjnych (z wyjątkiem noworodków makaków) [48]. Stąd, nierzadko w badaniach patogenezy zakażeń szczepami EPEC wykorzystywane są inne, chorobotwórcze patogeny indukujące w nabłonku jelita zmiany typu A/E. *Citrobacter rodentium* (patogen mysi) wywołuje zmiany A/E i wykazuje wiele cech wspólnych ze szczepami EPEC, ale istnieje zbyt duża różnica pomiędzy organizmem człowieka oraz myszy, by móc uznać ten model za właściwy. Dodatkowo, *C. rodentium* kolonizuje jelito grube, podczas gdy EPEC jelito cienkie, a skutkiem zakażenia zdecydowanie częściej jest przerost nabłonka jelita niż biegunka [23]. Szczepy REPEC wywołują u królików zakażenie obejmujące jelito cienkie, podczas którego występuje biegunka. W tym przypadku różnica pomiędzy oboma patogenami dotyczy głównie charakterystycznego typu adhezji, gdyż szczepy tEPEC posiadają zlokalizowany, natomiast REPEC rozsiany typ adhezji [58]. Szczepy aEPEC są izolowane od różnych gatunków zwierzęcych, ale w przypadku tEPEC liczba organizmów, która może być potencjalnym źródłem izolatów jest ograniczona. W związku z tym, badania na ochotnikach lub ssakach naczelnych powinny być prowadzone na szerszą skalę w celu dokładnego poznania patogenezy zakażeń EPEC. Metodologia badań powinna skupiać się na szczegółowym poznaniu odpowiedzi immunogicznej organizmu człowieka na antygeny EPEC, co w przyszłości umożliwi stworzenie odpowiedniej szczepionki, która mogłoby zminimalizować wysoką śmiertelność wśród dzieci spowodowaną zakażeniami EPEC [23].

Piśmiennictwo

1. Abrusci P., Lea S.M. i wsp.: Architecture of the major component of the type III secretion system export apparatus. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 99–104 (2013)
2. Afset J.E., Bevanger L., Romundstad P., Bergh K.: Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* **53**, 1137–1144 (2004)
3. Andrade A., Pardo J.P., Espinosa N., Pérez-Hernández G., González-Pedrajo B.: Enzymatic characterization of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion ATPase EscN. *Arch. Biochem. Biophys.* **468**, 121–127 (2007)
4. Araujo J.M., Tabarelli G.F., Aranda K.R., Fabbricotti S.H., Fagundes-Neto U., Mendes C.M., Scaletsky I.C.: Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 3396–3399 (2007)
5. Badea L., Doughty S., Nicholls L., Sloan J., Robins-Browne R.M., Hartland E.L.: Contribution of Efa1/LifA to the adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Microb. Pathog.* **34**, 205–215 (2003)
6. Baldi D.L., Tauschek M. i wsp. The type II secretion system and its ubiquitous lipoprotein substrate, SslE, are required for biofilm formation and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **80**, 2042–2052 (2012)
7. Bieber D., Ramer S. W., Wu Ch.-Y., Murray W.J., Tobe T., Fernandez R., Gary K. Schoolnik G.K.: Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli. Science*, **280**, 2114–2118 (1998)
8. Bulgin R., Arbeloa A., Chung J.C., Frankel G.: EspT triggers formation of lamellipodia and membrane ruffles through activation of Rac-1 and Cdc42. *Cell Microbiol.* **11**, 217–229 (2009)
9. Bulgin R., Arbeloa A., Goulding D., Dougan G., Crepin V.F., Raymond B., Frankel G.: The T3SS effector EspT defines a new category of invasive enteropathogenic *E. coli* (EPEC) which form intracellular actin pedestals. *PLOS Pathog.* **5**, e1000683 (2009)
10. Campellone K.G., Giese A., Tipper D.J., Leong J.M.: A tyrosine-phosphorylated 12-amino-acid sequence of enteropathogenic *Escherichia coli* Tir binds the host adaptor protein Nck and is required for Nck localization to actin pedestals. *Mol. Microbiol.* **43**, 1227–1241 (2002)
11. Campellone K.G., Welch M.D.: A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **11**, 237–251 (2010)
12. Celli J., Olivier M., Finlay B.B.: Enteropathogenic *Escherichia coli* mediates antiphagocytosis through the inhibition of PI 3-kinase-dependent pathways. *EMBO J.* **20**: 1245–1258 (2001)
13. Cleary J., Lai L.C., Shaw R.K., Stratman-Iwanowska A., Donnenberg M.S., Frankel G., Knutton S.: Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology*, **150**, 527–538 (2004)
14. Clermont O., Olier M., Hoede C., Diancourt L., Brisse S., Keroudean M., Glodt J., Picard B., Oswald E., Denamur E.: Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. *Infect. Genet. Evol.* **11**, 654–662 (2011)
15. Creasey E.A., Friedberg D., Shaw R.K., Umanski T., Knutton S., Rosenshine I., Frankel G.: CesAB is an enteropathogenic *Escherichia coli* chaperone for the type-III translocator proteins EspA and EspB. *Microbiology*, **149**, 3639–3647 (2003)
16. de Grado M., Abe A., Gauthier A., Steele-Mortimer O., DeVinney R., Finlay B.B.: Identification of the intimin binding domain of Tir of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* **1**, 7–18 (1999)
17. Dean F.: Functional domains and motifs of bacterial type III efector proteins and their roles in infection. *FEMS Microbiol. Rev*. **35**, 1100–1125 (2011)
18. Dean F., Kenny B.: The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. *Curr. Opin. Microbiol*. **12**, 101–109 (2009)
19. Dean P., Kenny B.: Intestinal barrier dysfunction by enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by two effector molecules and a bacterial surface protein. *Mol. Microbiol.* **54**, 665–675 (2004)
20. Dean P., Maresca M., Schüller S., Phillips A. D., Kenny B.: Potent diarrheagenic mechanism mediated by the cooperative action of three enteropathogenic *Escherichia coli*-injected effector proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **103**, 1876–1881 (2006)
21. Dong N., Liu L., Shao F.: A bacterial effector targets host DH-PH domain RhoGEFs and antagonizes macrophage phagocytosis. *EMBO J*. **29**, 1363–1376 (2010)
22. Donnenberg M.S.: Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and epithelial cells. *Clin. Infect. Dis.* **28**, 451–455 (1999)
23. Donnenberg M.S., Finlay B.B.: Combating enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infections: the way forward. *Trends Microbiol.* **21**, 317–319 (2013)
24. Elliott S.J., Kaper J.B.: Role of type 1 fimbriae in EPEC infections. *Microb. Pathog.* **23**, 113–118 (1997)
25. Elliott S.J., O'Connell C.B , Koutsouris A., Brinkley C., Donnenberg M.S., Hecht G., Kaper J.B.: A Gene from the Locus of Enterocyte Effacement that is required for enteropathogenic *Escherichia coli* to increase tight-junction permeability encodes a chaperone for EspF. *Infect. Immun*. **70**, 2271–2277 (2002)
26. Elliott S.J., Sperandio V., Girón J.A., Shin S., Mellies J.L., Wainwright L., Hutcheson S.W., McDaniel T.K., Kaper J.B.: The Locus of Enterocyte Effacement (LEE)-Encoded Regulator Controls Expression of Both LEE- and Non-LEE-Encoded Virulence Factors in Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli. Infect Immun*. **68**, 6115–6126 (2000)
27. Elliott S.J., Wainwright L.A., McDaniel T.K., Jarvis K.G., Deng Y.K., Lai L.C., McNamara B.P., Donnenberg M.S., Kaper J.B.: The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol. Microbiol*. **28**, 1–4 (1998)
28. Erdem A.L., Avelino F., Xicohtencatl-Cortes J., Girón J.A.: Host protein binding and adhesive properties of H6 and H7 flagella of attaching and effacing *Escherichia coli. J. Bacteriol.* **189**, 7426–7435 (2007)
29. Fitzhenry R.J., Stevens M.P., Jenkins C., Wallis T.S., Heuschkel R., Murch S., Thomson M., Frankel G., Phillips A.D.: Human intestinal tissue tropism of intimin epsilon O103 *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **218**, 311–316 (2003)
30. Frankel G., Candy D.C., Everest P., Dougan G.: Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli, Citrobacter freundii,* and *Hafnia alvei. Infect. Immun.* **62**, 1835–1842 (1994)
31. Frankel G., Philips A.D., Novakova M., Batchelor M., Hicks S., Dougan G.: Generation of *Escherichia coli* intimin derivatives with differing biological activities using site-directed mutagenesis of the intimin C-terminus domain. *Mol. Microbiol*. **29**, 559–570 (1998)
32. Frankel G., Phillips A.D., Trabulsi L.R., Knutton S., Dougan G., Matthews S.: Intimin and the host cell – is it bound to end in Tir(s)? *Trends Microbiol*. **9**, 214–218 (2001)
33. Franzolin M.R., Alves R.C., Keller R., Gomes T.A. T., Beutin L., Barreto M.L., Milroy C., Strina A., Ribeiro H., Trabulsi L.R.:

Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem. I. Oswaldo. Cruz.* **100**, 359–363 (2005)
34. Giron J.A., Ho A.S., Schoolnik G.K.: An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science,* **254**, 710–713 (1991)
35. Girón J.A., Torres A.G., Freer E., Kaper J.B.: The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **44**, 361–379 (2002)
36. Gonçalves N.S, Hale C., Dougan G., Frankel G., MacDonald T.T.: Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to lymphocytes and its functional consequences. *Infect. Immun.* **71**, 2960–2965 (2003)
37. Guttman J.A., Li Y., Wickham M.E., Deng W., Vogl A.W., Finlay B.B. Attaching and effacing pathogen-induced tight junction disruption *in vivo. Cell. Microbiol.* **8**, 634–645 (2006)
38. Hartland E. L., Batchelor M., Delahay R.M., Hale C., Matthews S., Dougan G., Knutton S., Connerton I., Frankel G.: Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to Tir and to host cells. *Mol. Microbiol.* **32**, 151–158 (1999)
39. Henderson I.R., Navarro-Garcia F., Desvaux M., Fernandez R.C., Ala'Aldeen D.: Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. **68**, 692–744 (2004)
40. Hernandes R.T., Elias W.P., Vieira M.A., Gomes T.A.: An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microliol. Lett*. **297**, 137–149 (2009)
41. Huys G., Cnockaert M., Janda J.M., Swings J.: *Escherichia albertii* sp. nov., a diarrhoeagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 807–810 (2003)
42. Hyland R.M., Sun J., Griener T.P., Mulvey G.L., Klassen J.S., Donnenberg M.S., Armstrong G.D.: The bundlin pilin protein of enteropathogenic *Escherichia coli* is an N-acetyllactosamine--specific lectin. *Cell Microbiol.* **10**, 177–187 (2008)
43. Iguchi A., Thomson N.R., Ogura Y., Saunders D., Ooka T., Henderson I.R., Harris D., Asadulghani M., Kurokawa K., Dean P.: The complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *E. coli* O127:H6 strain E2348/69. *J. Bacteriol.* **191**, 347–354 (2009)
44. Iizumi Y., Sagara H., Kabe Y., Azuma M., Kume K., Ogawa M., Nagai T., Gillespie P. G., Sasakawa C., Handa H.: The enteropathogenic *E. coli* effector EspB facilitates microvillus effacing and antiphagocytosis by inhibiting myosin function. *Cell Host Microbe*. **2**, 383–392 (2007)
45. Jubelin G., Oswald E. i wsp.: Cycle inhibiting factors (CIFs) are a growing family of functional cyclomodulins present in invertebrate and mammal bacterial pathogens *PLOS ONE,* **4**, 1–13 (2009)
46. Kaper J.B.: Defining EPEC. *Rev. Microbiol.* **27**, 130–133 (1996)
47. Karch H., Heesemann J., Laufs R., Kroll H.P., Kaper J.B., Levine M.M.: Serological response to type 1-like somatic fimbriae in diarrheal infection due to classical enteropathogenic *Escherichia coli. Microb. Pathog.* **2**, 425–434 (1987)
48. Kelleher S.L., Casas I., Carbajal N., Lönnerdal B.: Supplementation of infant formula with the probiotic *Lactobacillus reuteri* and zinc: impact on enteric infection and nutrition in infant rhesus monkeys. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr*. **35**, 162–168 (2002)
49. Kenny B., DeVinney R., Stein M., Reinscheid D.J., Frey E.A., Finlay B.B.: Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell*, **91**, 511–520 (1997)
50. Khan M.A., Bouzari S., Ma C., Rosenberger C.M., Bergstrom K.S.B., Gibson D., Steiner T.S., Vallance B.A.: Flagellin--dependent and -independent inflammatory responses following infection by enteropathogenic *Escherichia coli* and *Citrobacter rodentium.* Infect. Immun. **76**, 1410–1422 (2008)
51. Lacher D.W., Steinsland H., Blank T.E., Donnenberg M.S., Whittam T.S.: Molecular evolution of typical enteropathogenic *Escherichia coli*: clonal analysis by multilocus sequence typing and virulence gene allelic profiling. *J. Bacteriol*. **189**, 342–350 (2007)
52. Lai Y., Rosenshine I., Leong J.M., Frankel G.: Intimate host attachment: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli. Cell. Microbiol.* **15** 1796–1808 (2013)
53. Luo W., Donnenberg M.S.: Interactions and predicted host membrane topology of the enteropathogenic *Escherichia coli* translocator protein EspB. *J. Bacteriol*. **193**, 2972–2980 (2011)
54. Macnab R.M.: How bacteria assemble flagella. *Annu Rev. Microbiol*. **57**, 77–100 (2003)
55. Marchès O., Covarelli V., Dahan S., Cougoule C., Bhatta P., Frankel G., Caron E.: EspJ of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* inhibits opsono-phagocytosis. *Cell Microbiol*. **10**, 1104–1115 (2008)
56. Martinez-Argudo I., Sands C., Jepson M.A.: Translocation of enteropathogenic *Escherichia coli* across an *in vitro* M cell model is regulated by its type III secretion system. *Cell Microbiol.* **9**, 1538–1546 (2007)
57. Mills E., Baruch K., Charpentier X., Kobi S., Rosenshine I.: Real--time analysis of effector translocation by the type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell. Host Microbe*. **143**, 104–113 (2008)
58. Milon A., Oswald E., De Rycke J.: Rabbit EPEC: a model for the study of enteropathogenic *Escherichia coli. Vet Res*. **30**, 203–219 (1999)
59. Moreira C. G., Palmer K., Whiteley M., Sircili M P., Trabulsi L.R., Castro A.F., Sperandio V.: Bundle-forming pili and EspA are involved in biofilm formation by enteropathogenic *Escherichia coli. J. Bacteriol*. **188**, 3952–3961 (2006)
60. Moura R.A., Sircili M.P., Leomil L., Matté M.H., Trabulsi L.R., Elias W.P., Irino K., Pestana de Castro A.F.: Clonal relationship among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. *Appl. Environ. Microbiol*. **75**, 7399–7408 (2009)
61. Nguyen R.N., Taylor L.S., Tauschek M., Robins-Browne R.M.: A typical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 597–603 (2006)
62. Nougayrède J.P., Donnenberg M.S.: Enteropathogenic *Escherichia coli* EspF is targeted to mitochondria and is required to initiate the mitochondrial death pathway. *Cell. Microbiol.* **6**, 1097–1111 (2004)
63. Ochoa T.J., Barletta F., Contreras C., Mercado E.: New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. **102**, 852–856 (2008)
64. Ochoa T.J., Contreras C.A.: Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **24**, 478–483 (2011)
65. Ogino T., Ohno R., Sekiya K., Kuwae A., Matsuzawa T., Nonaka T., Fukuda H., Imajoh-Ohmi S., Abe A. Assembly of the Type III Secretion Apparatus of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. **188**, 2801–2811 (2006)
66. Ohya K., Handa Y., Ogawa M., Suzuki M., Sasakawa C.: IpgB1 is a novel Shigella effector protein involved in bacterial invasion of host cells. Its activity to promote membrane ruffling via Rac1 and Cdc42 activation. *J. Biol. Chem*. 280, 24022–24034 (2005)
67. Parsot C., Hamiaux C., Page A.L.: The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 7–14 (2003)
68. Patel J.C., Galan J.E.: Differential activation and function of Rho GTPases during Salmonella-host cell interactions. *J. Cell. Biol.* **175**, 453–463 (2006)

69. Phillips A.D., Frankel G.: Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. *J. Infect. Dis*. **181**, 1496–1500 (2000)
70. Phillips N., Hayward R.D., Koronakis V.: Phosphorylation of the enteropathogenic *E. coli* receptor by the Src-family kinase c-Fyn triggers actin pedestal formation. *Nat. Cell. Biol*. **6**, 618–625 (2004)
71. Pouttu R., Westerlund-Wikstrom B., Lang H., Alsti K., Virkola R., Saarela U., Siitonen A., Kalkkinen N., Korhonen T.K.: *matB*, a common fimbrillin gene of *Escherichia coli*, expressed in a genetically conserved, virulent clonal group. *J. Bacteriol.* **183**, 4727–4736 (2001)
72. Ramboarina S., Fernandes P.J. Daniell S., Islam S., Simpson P., Frankel G., Booy F., Donnenberg M.S., Matthews S.: Structure of the bundle-forming pilus from enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem*. **280**, 40252–40260 (2005)
73. Rendon M.A., Saldana Z., Erdem A.L., Monteiro-Neto V., Vazquez A., Kaper J.B., Puente J.L., Giron J.A. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 10637–10642 (2007)
74. Roxas J.L., Wilbur J.S., Zhang X., Martinez G., Vedantam G., Viswanathan V.K.: The Enteropathogenic *Escherichia coli*-secreted protein EspZ inhibits host cell apoptosis. *Infect Immun*. **80**, 3850–3857 (2012)
75. Ruchaud-Sparagano M.H., Maresca M., Kenny B.: Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) inactivate innate immune responses prior to compromising epithelial barrier function. *Cell. Microbiol*. **9**, 1909–1921 (2007)
76. Saldana Z., Erdem A.L., Schüller S., Okeke I.N., Lucas M., Sivananthan A., Phillips A.D., Kaper J.B., Puente J.L., Giron J.A.: The *Escherichia coli* common pilus and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli*. *J. Bacteriol*. **191**, 3451–3461 (2009)
77. Sanger J.M., Chang R., Ashton F., Kaper J.B., Sanger J.W.: Novel form of actin-based motility transports bacteria on the surfaces of infected cells. *Cell. Motil. Cytoskeleton.* **34**, 279–287 (1996)
78. Schmidt M**.**A.: LEE ways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. *Cell. Microbiol.* **12**, 1544–1552 (2010)
79. Schoenhals G., Whitfield C.: Comparative analysis of flagellin sequences from *Escherichia coli* strains possessing serologically distinct flagellar filaments with shared complex surface pattern. *Journal of Bacteriology*, **175**, 5395–5402 (1993)
80. Schuller S., Chong Y., Lewin J., Kenny B., Frankel G., Phillips A.D.: Tir phosphorylation and Nck/N-WASP recruitment by enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* during *ex vivo* colonization of human intestinal mucosa is different to cell culture models. *Cell. Microbiol.* **9**, 1352–1364 (2007)
81. Sekiya K., Ohishi M., Ogino T., Tamano K., Sasakawa C., Abe A.: Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **98**, 11638–11643 (2001)
82. Sinclair J.F., O'Brien A.D.: Cell surface-localized nucleolin is a eukaryotic receptor for the adhesin intimin-γ of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Biol. Chem.* **277**, 2876–2885 (2002)
83. Sobieszczańska B.M.: Wpływ adherencji enteropatogennych szczepów *Escherichia coli* na organizację cytoszkieletu enterocytów. *Post. Mikrobiol*. **41**, 111–131 (2002)
84. Spano L.C., Sadovsky A.D., Segui P.N., Saick K.W., Kitagawa S.M., Pereira F.E., Fagundes-Neto U., Scaletsky I.C.: Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhoea. *J. Med. Microbiol*. **57**, 359–363 (2008)
85. Stone K.D., Zhang H.-Z., Carlson L.K., Donnenberg M.S.: A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. *Mol. Microbiol.* **20**, 325–337 (1996)
86. Tobe T., Hayashi T., Han C.G., Schoolnik G.K., Ohtsubo E., Sasakawa C.: Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid. *Infect. Immun*. **67**, 5455–5462 (1999)
87. Touze T., Hayward R.D., Eswaran J., Leong J.M., Koronakis V.: Self-association of EPEC intimin mediated by the beta-barrel-containing anchor domain: a role in clustering of the Tir receptor. *Mol. Microbiol*. **51**, 73–87 (2004)
88. Vidal J.E., Navarro-García F.: EspC translocation into epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli* requires a concerted participation of type V and III secretion systems. *Cell. Microbiol.* **10**, 1975–1986 (2008)
89. Vossenkämper A., Macdonald T.T., Marchès O.: Always one step ahead: How pathogenic bacteria use the type III secretion system to manipulate the intestinal mucosal immune system. *J. Inflamm*. **8**, 11 (2011)
90. Wilharm G., Dittmann S., Schmid A., Heesemann J.: On the role of specific chaperones, the specific ATPase, and the proton motive force in type III secretion. *Int. J. Med. Microbiol.* **297**, 27–36 (2007)
91. Wilson R.K., Shaw R.K., Daniell S., Knutton S., Frankel G.: Role of EscF, a putative needle complex protein, in the type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol*. **3**, 753–762 (2001)
92. Witkowska D., Bartyś A., Gamian A.: Białka osłony komórkowej pałeczek jelitowych i ich udział w patogenności oraz odporności przeciwbakteryjnej. *Postepy Hig. Med. Dośw.* **63**, 176–199 (2009)
93. Wong A.R., Pearson J.S., Bright M.D., Munera D., Robinson K.S., Lee S.F., Frankel G., Hartland E.L.: Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli:* even more subversive elements. *Mol. Mikrobiol*. **80**, 1420–1438 (2011)
94. Xue-Han Z., Qing Y., Ya-Dong L., Bin L., Renata I., Kong-Wang H.: Development of a LAMP assay for rapid detection of different intimin variants of attaching and effacing microbial pathogens. *J. Med. Microbiol*. **62**, 1665–1672 (2013)
95. Yatsuyanagi, J., Saito S., Sato H., Miyajima Y., Amano K., Enomoto K.: Characterization of enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from diarrheal outbreaks. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 294–297 (2002)
96. Zahavi E.E., Aroeti B. i wsp. Bundle-forming pilus retraction enhances enteropathogenic *Escherichia coli* infectivity. *Mol. Biol. Cell*. **22**, 2436–2447 (2011)
97. Zhang W.L., Köhler B., Oswald E., Beutin L., Karch H., Morabito S., Caprioli A., Suerbaum S., Schmidt H.: Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol*. **40**, 4486–4492 (2002)
98. Zhou X., Giron J.A., Torres A.G., Crawford J.A., Negrete E., Vogel S.N., Kaper J.B.: Flagellin of enteropathogenic *Escherichia coli* stimulates interleukin-8 production in T84 cells. *Infect. Immun.* **71**, 2120–2129 (2003)

POST. MIKROBIOL.,
2016, 55, 2, 132–146
http://www.pm.microbiology.pl

MIKROBIOLOGICZNA UTYLIZACJA CELULOZY

Krzysztof Poszytek[1]*
[1] Pracownia Analizy Skażeń Środowiska, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Wpłynęło w maju 2015 r.
Zaakceptowano w grudniu 2015 r.

1. Wprowadzenie. 2. Charakterystyka celulozy. 3. Mikroorganizmy celulolityczne. 4. Enzymy celulolityczne. 4.1. Podział systemów celulolitycznych. 4.2. Zasady funkcjonowania wolnych i skompleksowanych enzymów celulolitycznych. 4.3. Biologia molekularna oraz inżynieria genetyczna celulaz. 5. Ekologiczny i praktyczny aspekt utylizacji celulozy. 6. Podsumowanie

Microbial cellulose utilization

Abstract: Lignocellulosic biomass, consisting of lignin, cellulose and hemicellulose, can be utilized as a substrate in the production of biofuels. Before application, lignocellulosic material requires preliminary treatment. Biological pretreatment, which can be an alternative to the physical and chemical methods, is based on the activity of microorganisms, mainly bacteria and fungi. They produce cellulolytic enzymes, cellulases, which can effectively degrade lignocellulosic biomass and other materials containing cellulose. At least three major groups of cellulases are involved in the hydrolysis process: endoglucanases, exoglucanases and β-glucosidases. Various types of cellulases exist in a free form or as complexes, known as cellulosomes. In order to increase the activity, cellulolytic enzymes can be modified by means of genetic engineering. The final results are intended to increase the efficiency of hydrolysis of lignocellulosic biomass and thus the process of biochemical changes in the context of biofuel production.

1. Introduction. 2. Characteristics of cellulose. 3. Cellulolytic microorganisms. 4. Cellulolytic enzymes. 4.1. Classification of cellulolytic enzymes. 4.2. Operating principles of free and complexed cellulolytic enzymes. 4.3. Molecular biology and genetic engineering of cellulases. 5. Ecological and practical aspects of cellulose utilization. 6. Summary

Słowa kluczowe: biomasa ligninocelulozowa, mikroorganizmy celulolityczne, enzymy celulolityczne, celulosomy
Key words: lignocellulosic biomass, cellulolytic microorganisms, cellulolytic enzymes, cellulosomes

1. Wprowadzenie

W ostatnich latach zaobserwowano wzrost zainteresowania pozyskiwaniem przyjaznej dla środowiska energii otrzymywanej z biopaliw uzyskanych z biodegradowalnych materiałów. Uwzględniając aspekty ekonomiczne, substraty takie mają być przede wszystkim tanie i przyjazne dla środowiska a uzyskane biopaliwa takie jak biogaz czy bioetanol, zapobiegać rozwojowi problemów związanych z ochroną środowiska [78].

Jednym z najważniejszych substratów wykorzystywanych do produkcji biopaliw jest biomasa „ligninocelulozowa", która jest szeroko rozpowszechniona i łatwo dostępna. Ligninoceluloza jest głównym składnikiem ściany komórkowej roślin i składa się z trzech polimerów: celulozy, hemicelulozy i ligniny, powiązanych ze sobą za pomocą wiązań kowalencyjnych i innych [8]. W roślinach masa ligninocelulozowa występuje głównie w liściach, łodygach i pędach. Źródłem ligninocelulozy w procesie produkcji biopaliw są nie tylko rośliny energetyczne takie jak: kukurydza, ryż, rzepak, sorgo, trawy, ale także różnego rodzaju odpady przemysłowe i rolnicze [27]. Przykładowe zawartości celulozy, hemicelulozy i lignin w różnych odpadach i źródłach biomasy przedstawione są w tabeli I [85].

Wysoka wartość ligninocelulozy, jako substratu w procesach pozyskiwania biopaliw związana jest z jej powszechnym występowaniem wśród roślin, niską ceną uzyskiwania energii, kosztem pozyskiwania substratu, niewielką toksycznością oraz możliwości użycia surowców odpadowych [34].

Wykorzystując szerokie i różnorodne grupy mikroorganizmów mające zdolności do rozkładu ligninocelulozy w procesach m.in. fermentacji alkoholowej, metanowej oraz procesach kompostowania nastąpił znaczący postęp badań, oraz rozwój gospodarki, związany z pozyskiwaniem biopaliw na drodze degradacji, a dokładnie na etapie hydrolizy, biomasy ligniocelulozowej.

Celuloza, jako główne źródło węgla stanowi blisko 50% wartości substancji, wytworzonej w procesie fotosyntezy [3]. Dla mikroorganizmów wykorzystujących biomasę ligninocelulozową, celuloza jest składnikiem odżywczym, natomiast dla człowieka mikroorganizmy celulolityczne mogą stanowić istotny środek do pozyskiwania biopaliw i w następstwie energii, na drodze przemian biochemicznych.

W niniejszej pracy dokonano przeglądu dotychczasowej wiedzy na temat rozkładu celulozy przez mikroorganizmy celulolityczne, umożliwiające degradację biomasy ligninocelulozowej. W pracy opisano aspekty

* Autor korespondencyjny: Pracownia Analizy Skażeń Środowiska, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: kposzytek@biol.uw.edu.pl

Tabela I
Przykładowe procentowe zawartości celulozy, hemicelulozy i ligniny w różnych odpadach i źródłach biomasy

Materiał ligninocelulozowy	Procentowa zawartość węglowodanów w suchej masie		
	Celuloza	Hemiceluloza	Lignina
Liściaste łodygi	45–50	25–35	25–35
Drewniane łodygi	40–55	24–40	18–25
Liście	15–20	80–85	0
Trawy	25–40	35–50	10–30
Rzepak	27,30	20,50	14,20
Kolby kukurydzy	32,3–45,6	39,8	6,7–13,9
Słoma kukurydziana	35,1–39	20,7–24,6	11–19,1
Słoma pszenna	35–39	22–30	12–16
Słoma jęczmienna	36–43	24–33	6,3–9,8
Słoma sorgo	32–35	24–27	15–21
Słoma ryżowa	29,2–34,7	23–25,9	17–19
Słoma owsiana	31–35	20–26	10–15
Bambus	49–50	18–20	23
Łupiny orzechów	25–30	25–30	30–40
Włosy nasion bawełny	80–95	5–20	0
Odpady z hodowli trzody chlewnej	6	28	0
Obornik bydlęcy	1,6–4,7	1,4–3,3	2,7–5,7
Pierwotne odpady ściekowe	8–15	0	24–29
Papier celulozowy	85–99	0	0–15
Gazeta	40–55	24–39	18–30

taksonomii drobnoustrojów celulolitycznych, enzymatyki (w tym biologii molekularnej oraz inżynierii genetycznej enzymów celulolitycznych), mikrobiologii przemysłowej oraz biotechnologii procesu hydrolizy materiału roślinnego.

2. Charakterystyka celulozy

Głównym składnikiem biomasy ligninocelulozowej jest celuloza, w mniejszym stopniu hemiceluloza oraz lignina [3]. Hemiceluloza to heteropolimer składający się głównie z pentoz (D-ksylozy, D-arabinozy) oraz heksoz (D-mannozy, D-glukozy, D-galaktozy). Lignina, to polimer, którego monomerami są związki organiczne będące pochodnymi alkoholi fenolowych (alkohol koniferylowy, synapinowy i kumarylowy). Ligniny, ze względu na ich strukturę, cechuje wysoka oporność na rozkład, tym samym stanowią barierę fizycznochemiczną dla degradacji celulozy.

Celuloza jest nierozgałęzionym polisacharydem, którego łańcuchy zawierają od 3000 do 14000 reszt D-glukozy połączonych wiązaniami β-1,4 glikozydowymi [3]. Cząsteczki celulozy (ok. 30 fragmentów) montowane są w duże jednostki – włókna elementarne (protofibryle), które są pakowane w większe struktury zwane mikrofibrylami, te z kolei są składane do znanych powszechnie włókien celulozowych. Ułożone równolegle włókna celulozowe stabilizowane są poprzez liczne wiązania wodorowe występujące pomiędzy sąsiednimi grupami hydroksylowymi, co prowadzi do powstania obszarów krystalicznej struktury celulozy. Ponadto wpływ na tak solidną konstrukcję włókien celulozy mają odziaływania Van der Waalsa, które wynikają ze specyfiki geometrii krótkich wiązań wodorowych węgiel-wodór. Ze względu na łączny efekt wspomnianych wiązań, umożliwiają odpowiednią konformację i dużą stabilność cząsteczkom polimeru. Liczba wiązań zmniejsza się podczas hydrolizy celulozy prowadzonej przez mikroorganizmy celulolityczne, co powoduje zwiększenie się odstępów między jej cząsteczkami, zmiany konformacji i tworzenie amorficznych regionów cząsteczki celulozy. Poszczególne składowe mikrofibryl krystalicznej formy celulozy, pakowane są wystarczająco ściśle, aby zapobiec penetracji nie tylko przez różnorodne enzymy, ale nawet małe cząsteczki, takie jak woda [68]. Oprócz regionów krystalicznych i amorficznych, włókna celulozowe zawierają różne nieprawidłowości np. załamania, skręty mikrofibryl lub puste przestrzenie, czyli mikropory. Całkowita powierzchnia włókna celulozy jest znacznie większa, niż powierzchnia idealnie gładkiego włókna o takich samych wymiarach [17].

W badaniach nad hydrolizą celulozy oraz mikroorganizmami celulolitycznymi, wykorzystuje się oczyszczone celulozy, różniące się pewnymi cechami strukturalnymi od celulozy naturalnej. Komercyjnie dostępna holoceluloza Solka Floc, wytwarzana jest w procesie delignifikacji z drewna lub innych materiałów biomasy ligninocelulozowej i charakteryzuje się podwyższoną zawartością hemicelulozy. Celuloza mikrokrystaliczna (np. Aviceli Sigmacell) jest prawie czystą celulozą. Ze względu na trudności związane ze zmiennością struktury czystej celulozy oraz problemami rozpuszczalności tych substratów, doszło do szerokiego stosowania wysoce rozpuszczalnej karboksymetylocelulozy – eteru stosowanego w badaniach nad produkcją i aktywnością endoglukanaz [20].

Wykorzystanie biomasy roślinnej jest bardziej skomplikowane niż użycie czystej celulozy, nie tylko z powodu kompozycji (np. obecności hemicelulozy i ligniny), ale przede wszystkim ze względu na różnorodność struktury, rozmiaru i organizacji komórek oraz tkanek roślinnych. Oprócz ograniczeń związanych z występowaniem różnych struktur celulozy, dodatkowym problemem może być dyfuzja i transport enzymów celulolitycznych do miejsca ich działania [53].

3. Mikroorganizmy celulolityczne

Taksonomia drobnoustrojów celulolitycznych opiera się na filogenetyce, a pokrewieństwa poszczególnych grup mikroorganizmów klasyfikowane są na podstawie sekwencji genów kodujących rRNA (u prokariotów 16S rRNA i 18S rRNA u eukariotów).

Przykładowe drzewo filogenetyczne dla bakterii celulolitycznych zostało przedstawione na Rys. 1.

U bakterii, najszerszą grupą zdolną do degradacji celulozy są tlenowe *Actinobacteria* oraz beztlenowe *Firmicutes*, głównie *Clostridia*. Na podstawie cech fizjologicznych mikroorganizmów celulolitycznych, wyróżnić można następujące grupy, zróżnicowane pod względem prowadzonego metabolizmu:

(i) fermentacyjne beztlenowce – zazwyczaj bakterie Gram-dodatnie takie jak *Clostridium, Ruminococcus* i *Caldicellulosiruptor*, a także przedstawiciele bakterii gramujemnych, z których większość spokrewniona jest z *Clostridium* np. *Butyvibrio* i *Acetovibrio*

(ii) tlenowe bakterie gramdodatnie – najważniejsi przedstawiciele to *Cellulomonas* i *Thermobifida*

(iii) tlenowe bakterie śluzowe takie jak *Cytophaga* i *Sporocytophaga*.

Powszechnie występująca celuloza może być, degradowana przez bakterie w różnych warunkach środowiska, uwzględniając m.in. zapotrzebowanie na tlen, szeroki zakres tolerancji na temperaturę i zasolenie [53]. Poszczególne grupy bakterii tlenowych i beztlenowych mają odmienne strategie rozkładu celulozy. Beztlenowce degradują celulozę przez system skompleksowanych enzymów występujący w celulosomach, dobrze scharakteryzowanych u termofilnych: *Clostridium thermocellum* [80]. Natomiast w przypadku bakterii tlenowych enzymy występują najczęściej w formie wolnych enzymów wytwarzanych zewnątrzkomórkowo, które można łatwo odzyskać z hodowli. Czasem mogą występować w różnych kompleksach na powierzchni komórek. Poszczególne enzymy często wykazują synergistyczne działanie podczas hydrolizy celulozy. W trakcie rozkładu celulozy przez bakterie tlenowe kontakt komórek z celulozą nie jest konieczny, mimo to większość mikroorganizmów przylega do degradowanego materiału [53].

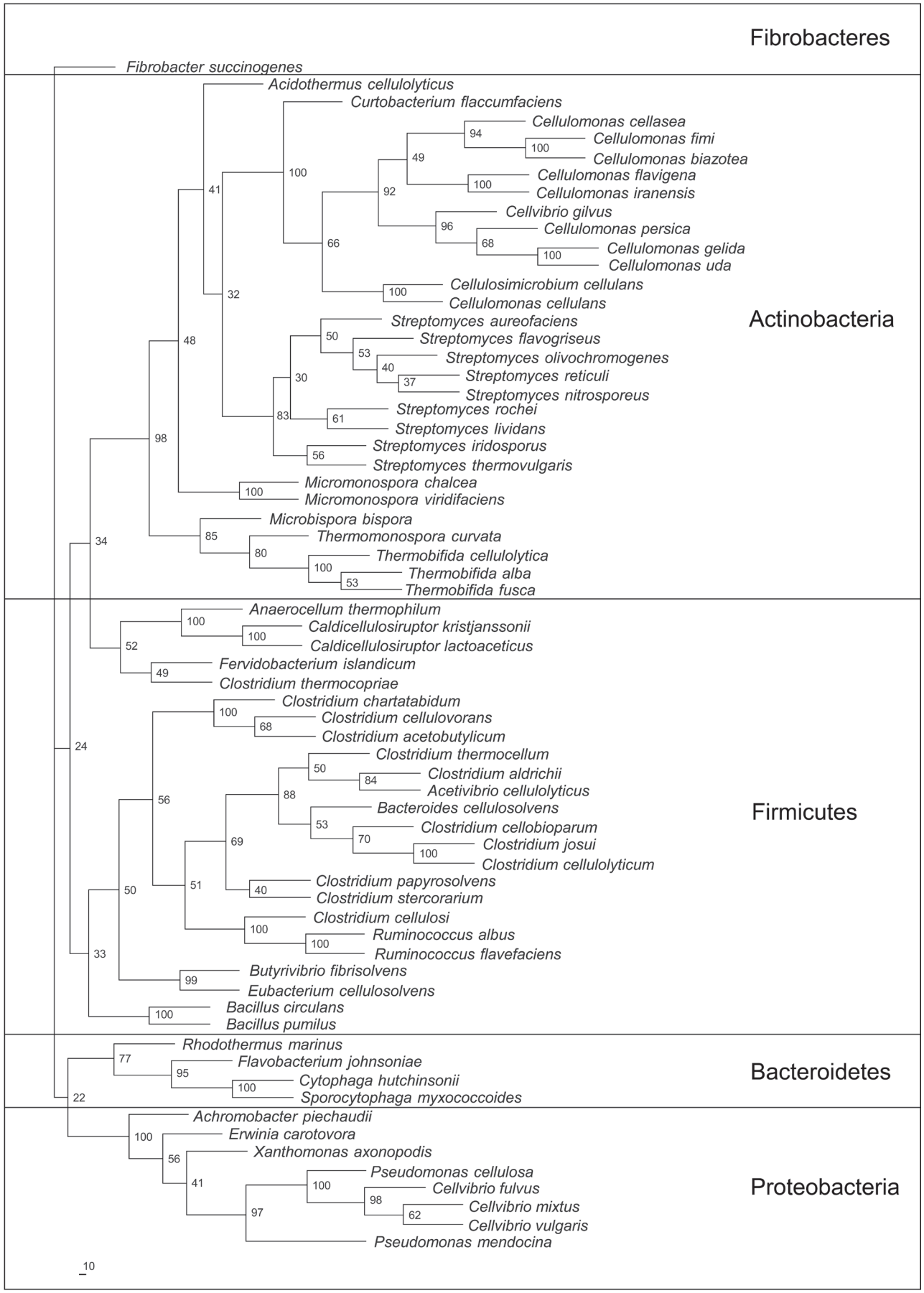
Część z tlenowych bakterii celulolitycznych to typowe gatunki glebowe, znane przede wszystkim z produkcji wtórnych metabolitów (*Streptomyces*, *Bacillus* i *Micromonospora*) lub tworzenia odrębnych form przetrwalnych np. endospor i egzospor (*Bacillus, Micromonospora, Thermobifida*) [53].

Istnieją także bakterie zawierające w genomie sekwencje kodujące enzymy celulolityczne, które nie ulegają ekspresji z powodu niesprawnej sekwencji genu promotora. Przykładem jest bakteria *Clostridium acetobutylicum* [80].

W przypadku grzybów, wykorzystanie celulozy jest powszechne w całym królestwie – od prymitywnych protista, jak *Chytridomycetes* – do zaawansowanych podstawczaków [53]. Grzyby charakteryzujące się zdolnością hydrolizy celulozy zostały wymienione w tabeli II.

Systematyka grzybów opiera się głównie na morfologii grzybni i struktur rozrodczych podczas różnych etapów grzybiczego cyklu życia. Wyróżnić można grzyby brązowej, białej i miękkiej zgnilizny. Grzyby brązowej zgnilizny atakują głównie celulozę, a białej i miękkiej, degradują zarówno celulozę jak i ligniny. Grzyby białej zgnilizny, do której należą *Basidiomycetes,* to najskuteczniejsza grupa hydrolizująca materiał ligninocelulozowy [18, 79].

Zarówno grzyby jak i bakterie są intensywnie eksploatowane w procesach rozkładu biomasy ligninocelulozowej. Grzyby mają zdolność do przenikania w materiale ligninocelulozowym dzięki występowaniu nitkowatych filamentów grzybni (strzępek). Bakterie natomiast często mają szybsze tempo wzrostu, co umożliwia uzyskanie większej ilości enzymów. Dodatkowo, bakteryjne hydrolazy często występują w formie enzymatycznych kompleksów, zapewniając wyższą skuteczność hydrolizy. Izolacja drobnoustrojów celulolitycznych z różnorodnych środowisk (w tym ekstremalnych) umożliwia selekcję mikroorganizmów wyjątkowo opornych na stresy środowiskowe, produkujących stabilne enzymy w trudnych warunkach jakie



Rys. 1. Drzewo filogenetyczne bakterii celulolitycznych.

Tabela II
Systematyka grzybów posiadających właściwości celulolityczne

Nazwa gatunku grzyba	Pod-królestwo	Typ	Klasa	Rząd	Rodzina
Trichoderma reesei (*Hypocrea jecorina*)	Dikarya	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae
Trichoderma viride					
Acremonium cellulolyticus					
Fusarium oxysporum					Nectriaceae
Neurospora crassa				Sordariales	Sordariaceae
Chaetomium globosum					Chaetomiaceae
Aspergillus japonicus			Eurotiomycetes	Eurotiales	Aspergillaceae
Penicillium verruculosum					Trichocomaceae
Penicillium funiculosum					
Penicillium janthinellum					
Penicillium occitanis					
Phanerochaete chrysosporium		Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	Phanerochaetaceae
Ceriporia lacerata					
Ceriporiopsis subvermispora					
Pycnoporus sp.					Polyporaceae
Trametes versicolor					
Pleurotus ostreatus				Agaricales	Pleurotaceae
Neocallimastix patriciarum		Neocallimastigomycota	Neocallimastigomycetes	Neocallimastigales	Neocallimastigaceae
Orpinomyces sp.					
Piromyces sp.					

mogą wystąpić podczas biokonwersji materiału lignocelulozowego. Obecnie prowadzonych jest wiele badań dotyczących wykorzystywania, poprawy wydajności i aktywności enzymów oraz mikroorganizmów celulolitycznych znajdujących zastosowanie w przemyśle (m.in. produkcji biopaliw) [55].

4. Enzymy celulolityczne

Celulazy to klasa enzymów celulolitycznych warunkujących hydrolizę wiązań β-1,4 glikozydowych we włóknach celulozy. Mimo, iż rozkład celulozy wymaga rozszczepienia jednego typu wiązania, to w praktyce mikroorganizmy celulolityczne wytwarzają wiele różnorodnych i komplementarnych enzymów [3].

Celulazy zbudowane są z niezależnie powstałych, składanych i funkcjonalnie odrębnych jednostek zwanych domenami lub modułami. Typowe bakteryjne wolne celulazy składają się z domeny wiążącej węglowodany (CBM, Cellulose Binding Module) zlokalizowanej na C-termialnej części enzymu, połączonej za pomocą krótkiego łącznika z domeną katalityczną na N-terminalnym końcu [55]. Domena CBM warunkuje wiązanie z powierzchnią celulozy, w celu ułatwienia hydrolizy poprzez domenę katalityczną położoną w bliskim sąsiedztwie. Wiązanie domeny CBM z celulozą jest bardzo stabilne, lecz mimo to pozwala dyfundować enzymowi w poprzek powierzchni celulozy. Obecność CBM jest szczególnie istotna w przypadku rozpoczęcia hydrolizy przez egzoglukanazy [53].

Zbadane są dwa sposoby przeprowadzania hydrolizy celulozy przez enzymy. Pierwszy z nich polega na inwersji lub utrzymaniu konfiguracji atomu węgla (C1) na końcu redukującym celulozy. Drugi oparty na typowej reakcji katalizy kwasowo-zasadowej [55].

4.1. Podział systemów celulolitycznych

Uwzględniając strukturę celulaz oraz ich aktywność enzymatyczną można wyróżnić [53]:

(i) Endoglukanazy, endo-1,4-β-D-glukanzy (EC 3.2.1.4). Działają w wewnętrznej, amorficznej części celulozy rozkładając długie łańcuchy celulozy i generując nowe łańcuchy oligosacharydów o różnej długości.

(ii) Egzoglukanazy, glukan-1,4-β-glukozydazy (EC 3.2.1.74) oraz egzo-1,4-β-celobiozydazy (celobiohydrolazy) (EC 3.2.1.91). Działają na zewnętrznych częściach cząsteczki celulozy krystalicznej. Mogą odczepiać pojedyncze jednostki glukozy lub celobiozę (podwójne

jednostki glukozy połączone wiązaniem 1,4-β glikozydowym). Wyróżnia się dwa rodzaje celobiohydrolaz. Celobiohydrolaza I (CBI) działa na nieredukującym końcu, natomiast celobiohydrolaza II (CBII) na redukującym końcu łańcucha.

(iii) β-glukozydazy, β-glukozydowe glukohydrolazy (EC 3.2.1.21). Degradują jednostki celobiozy oraz oligodekstryn do glukozy.

Między enzymami endo- i egzo- obserwuje się różnice pod kątem architektury i budowy miejsca aktywnego enzymu. Endoglukanazy charakteryzują się głęboką szczeliną, zdolną do pomieszczenia łańcucha celulozy w dowolnym jej punkcie. Natomiast miejsce aktywne egzoglukanaz ma postać rozszerzonej pętli, która stanowi rodzaj tunelu dla jednego z hydrolizowanych końców celulozy [3, 12].

System enzymów celulolitycznych działa w ściśle skoordynowany sposób. Endoglukanazy hydrolizują długie łańcuchy celulozy a wolne końce krótszych łańcuchów polisacharydów są trawione przez egzoglukanazy na redukującym i nieredukującym końcu oligosacharydu. W efekcie powstaje coraz krótszy łańcuch celulozy oraz pojedyncze jednostki celobiozy i glukozy. W wyniku działalności β-glukozydazy, następuje rozszczepienie jednostki celobiozy. Często β-glukozydazy związane z powierzchnią komórek mikroorganizmów celulolitycznych hydrolizują celobiozę do glukozy, przed lub w trakcie transportu do wnętrza komórki. Efektem końcowym złożonego procesu degradacji cząsteczki celulozy jest powstanie jednostek glukozy, wykorzystywanej w dalszych procesach biochemicznych [13, 87].

Mimo, iż podział celulaz na podstawie rodzaju aktywności enzymatycznej jest dosyć czytelny to coraz częściej okazuje się niewystarczający. Niektóre enzymy zdolne są do działania zarówno, jako endo- i egzoglukanazy, co wskazuje, że sposób degradacji może być niezależny od homologii sekwencji i struktury [3, 75].

Systematyka enzymów celulolitycznych jest dość problematyczna. Początkowo podstawowym kryterium klasyfikacji enzymów celulolitycznych, przyjętym przez Komisję Enzymatyczną (EC) i Komitet Nazewnictwa Międzynarodowej Unii Biochemii i Biologii Molekularnej (IUB), był typ substratu i sposób, w jaki dany enzym oddziałuje z podłożem. Enzymy te pogrupowano zgodnie z reakcjami, jakie one katalizowały np. celulazy, ksylanazy, chitynazy. Klasyfikacja taka była niewystarczająca [3]. Innym, sposobem na uporządkowanie celulaz, jest podział na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasowej. Zazwyczaj istnieje zależność między sekwencją aminokwasową, pofałdowaniem enzymu i strukturą trzeciorzędową białka. Klasyfikacja ta jest aktualizowana, jednak ze względu na dużą liczbę badanych i odkrywanych hydrolaz są problemy z bieżącą aktualizacją [11, 32]. W bieżącej aktualizacji z 2001 roku hydrolazy glikozydowe są pogrupowane w 86 rodzin. Taki system klasyfikacji zapewnia cenne informacje i uzupełnia dane zgromadzone przez IUB. Henrissat i wsp. w 1998 opracowali i zaproponowali inną systematykę dla hydrolaz, w którym pierwsze trzy litery oznaczają pożądany i najbardziej korzystny substrat, kolejne cyfry mają wyznaczać rodzinę hydrolaz i kolejne litery oznaczają kolejność, w której celulazy po raz pierwszy opisano [33]. Przykładem mogą być enzymy występujące u *Trichoderma reesei*: CBHI, CBHII i EGI, które są odpowiednio oznaczone Cel7A (CBHI), Cel6A (CBHII) i Cel6B (EGI). W przypadku, gdy występuje więcej niż jedna domena katalityczna w enzymie, to również przekłada się na nazwy, takie jak Cel9A – Cel48A dla dwóch domen katalitycznych celulazy CelA z *Caldocellulosiruptor saccharolyticus*. System ten jednak zawiera pewne wady np: brak stabilności i wahania, co do zaproponowanej nomenklatury oraz brak specyficzności substratowej dla egzo- i endoglukanaz, w związku, z czym system ten nie jest jeszcze w pełni akceptowany [53].

4.2. Zasady funkcjonowania wolnych i skompleksowanych enzymów celulolitycznych

Pierwszą strategią hydrolizy celulozy jest produkcja różnorodnych wolnych enzymów, które nie tworzą stabilnych kompleksów o wysokiej masie cząsteczkowej. Ten sposób wykorzystują najczęściej grzyby nitkowate oraz promieniowce. Strzępki i komórki drobnoustrojów przenikają przez kapilary i pory materiału celulozowego, penetrując podłoże udostępniając cząsteczkę celulozy, bezpośrednio produkowanym i dostarczanym enzymom [15].

Przykładem produkcji systemu wolnych enzymów jest *T. reesei* (forma telomorficzna: *Hypocrea jecorina*), która była przedmiotem badań przez około 50 lat [71, 56]. Grzyb ten wytwarza, co najmniej pięć endoglukanaz, dwie egzoglukanazy (celobiohydrolazy) oraz dwie β-glukozydazy. Wytwarzane celobiohydrolazy stanowią 80% całkowitej ilości białek systemu enzymów celulolitycznych [98]. Niektóre endoglukanazy mają szeroką specyficzność substratową np. aktywność dla ksylanazy [44]. W przypadku endoglukanaz, w odróżnieniu od egzoglukanaz, obecność CBM nie jest niezbędna dla aktywności tych enzymów. Istotnym czynnikiem dotyczącym zasady działania wszystkich wolnych enzymów jest obecność celobiozy, która hamuje działanie endoglukanaz i egzoglukanaz [35]. Dlatego tak ważna jest obecność, co najmniej dwóch *β*-glukozydaz, które warunkują rozkład celobiozy oraz innych krótkich oligosacharydów do glukozy. Część *β*-glukozydaz, która została wyizolowana z hodowli *T. reesei* pozostawała związana ze ścianą komórkową grzyba, co prawdopodobnie ograniczała straty w transporcie glukozy do

wnętrza komórki [58, 90]. *β*-glukozydazy są produkowane przez *T. reesei* na stosunkowo niskim poziomie w porównaniu do innego grzyba *Aspergillus* sp. Działalność ich jest hamowana przez glukozę, podczas gdy te z gatunku *Aspergillus* są bardziej tolerancyjne na obecność monocukru [72, 95]. Celulazy z *T. ressei* oraz z *Aspergillus* są najczęściej stosowanymi preparatami używanymi do rozkładu i utylizacji celulozy [72]. U innego przedstawiciela grzybów – *Phanerochaete chrysosporium* zaobserwowano, że oprócz produkcji wielu wolnych enzymów, które mogą być wzajemnymi homologami bądź homologami białek pochodzących z innych gatunków, produkuje on dehydrogenazę celobiozy. Enzym ten redukuje chinony w obecności celobiozy lub laktozy, ale nie wykazuje tej zdolności w obecności glukozy [31, 91]. Biologiczna funkcja tego enzymu nie została wyjaśniona, lecz jego wiązanie do celulozy krystalicznej oraz zdolność enzymu do wytwarzania wolnych rodników, zwiększa proces jej degradacji. Ponadto może pomóc w depolimeryzacji celulozy i ligniny [31].

W przypadku celulolitycznych bakterii tlenowych produkujących wolne enzymy, najbardziej poznanymi są *Cellulomonas* i *Thermobifida. Cellulomonas* wytwarza, co najmniej sześć endoglukanaz oraz jedną egzoglukanazę [9]. Natomiast z ciepłolubnej nitkowatej bakterii *Thermobifida* występującej w glebie, wyizolowano sześć celulaz: trzy endoglukanazy, dwie egzoglukanazy oraz nietypową celulazę mającą właściwości zarówno endoglukanazy i egzoglukanazy [39].

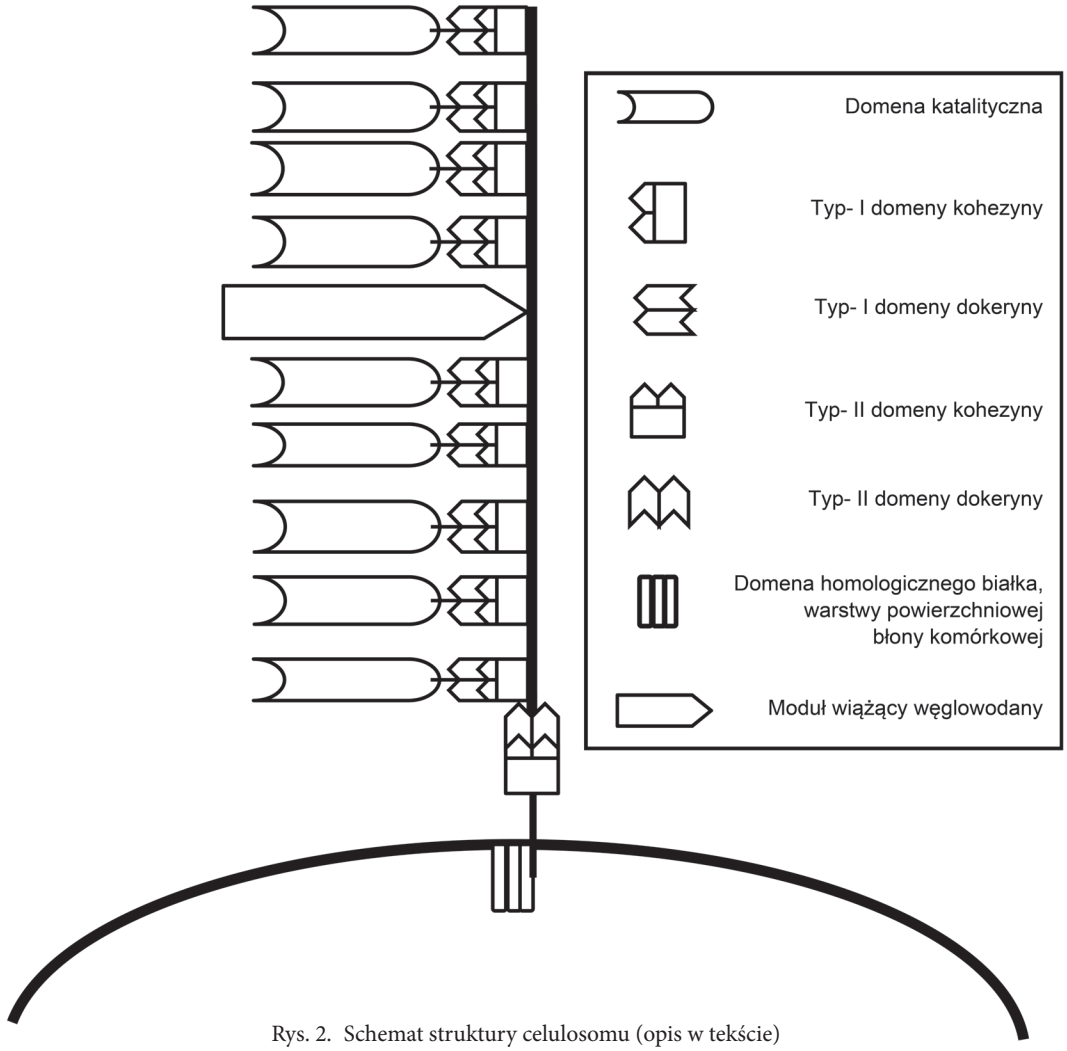
Drugim sposobem rozkładu celulozy, wykorzystywanym najczęściej przez bakterie beztlenowe, jest budowa kompleksu enzymów tzw. celulosomów. Prawdoodobnie spowodowane jest to brakiem zdolności przenikania bakterii do materiału celulozowego, wysoką konkurencyjnością ze strony innych mikroorganizmów oraz ograniczoną dostępnością energii w postaci ATP. Zaletą tej strategii jest silny synergizm pomiędzy celulazami zawartymi w celulosomach oraz kontakt komórki bakteryjnej z degradowaną cząsteczką celulozy, a w konsekwencji ułatwiony transport produktów hydrolizy do wnętrza komórki [3, 53, 80].

Wielkość celulosomów może wahać się od 2 do 16 MDa. Wysoka zawartość grup glikozylowych na powierzchni celulosomów (od 6 do 13% zawartości węglowodanów), chroni przed szkodliwym działaniem innych enzymów takich jak proteazy, a także ma wpływ na wiązania kohezyny-dokeryny [53].

Dzięki połączeniom technik biochemicznych, immunochemicznych, badań ultrastrukturalnych i genetycznych możliwym stało się poznanie ich struktury. Wykazano, że struktura celulosomu przypomina pięść, która otwiera się w kontakcie z celulozą. Celulosomy tworzą wypukłości ściany bakteryjnej. Są one stosunkowo silnie z nią związane, ale na tyle elastycznie, aby równie silnie przylegać do celulozy mikrokrystalicznej [53]. Pomiędzy celulosomem, a ścianą komórkową jest przestrzeń zapewniająca kontakt z wnętrzem komórki. Dzięki temu możliwy jest transport powstałych produktów do wnętrza komórki ograniczając tym samym dyfuzję do środowiska zewnętrznego [3, 80]. Struktura celulosomów jest podobna u większości bakterii, choć w zależności od gatunku mogą występować drobne różnice. Po raz pierwszy budowa tych kompleksów została opisana w 1983 roku u beztlenowca *C. thermocellum* [46]. Celulosomy występują także u innych laseczek z rodzaju *Clostridium* (np. *C. cellulolyticum*, *C. cellulovorans*, *C. perfringens, C. josui*) oraz bytujących w żwaczu bydła – *Ruminococcus albus*, *Fibrobacter succinogenes.* Termofilne *Thermotoga* i *Caldicellulosiruptor,* produkują termostabilne kompleksy enzymów hydrolitycznych o budowie domenowej i charakterze multikatalitycznym. Tak zwane „megazymy" mogą zawierać różnorodne celulazy i hemiceluazy, różniące się rozmieszczeniem i budową domen katalitycznych [14, 53]. Ponadto, występowanie celulosomów zaobserwowano również u niektórych gatunków grzybów beztlenowych: *Neocallimastix* i *Piromyces* [19, 48].

Przykładowa budowa celulosomu została opisana na podstawie kompleksów wyizolowanych z *C. thermocellum*. Celulosomy składają się z dużego niekatalitycznego białka (197 kDa) – skafoldyny (CipA), które jest zbudowane z wielu domen i obejmuje dziewięć kohezyn, cztery moduły hydrofilowe oraz moduł wiążący węglowodany (CBM). Skafoldyna jest przymocowana do ściany komórkowej przy pomocy domeny kohezyny typu II. Kompleksy enzymatyczne mogą zawierać nawet 22 rodzaje enzymów z czego co najmniej dziewięć wykazuje aktywność endoglukanazy (CelA, CelB, CelD, CelE, CelF, CelG, CelH, CelN i CelP), cztery aktywność egzoglukanazy (CbhA, CelK, Celo, CelS), 5 aktywność hemicelulaz (XynA, XynB, XynV, XynY, XynZ), jeden aktywność chitynaz (ManA), oraz jeden o aktywności lichenazy (LicB). Wszystkie moduły zawierają dokeryny umożliwiające wiązanie się z kohezyną białka skafoldyny tworząc w ten sposób jednolitą strukturę celulosomu. Schemat organizacji celulosomu przedstawiono na Rys. 2.

Układ modułów katalitycznych w skafoldynie, ich skład, synergiczne działanie są wciąż słabo poznane. Zakłada się, że skład celulosomu może się zmieniać, a domeny katalityczne nie wiążą się ze specyficznymi kohezynami. Można jedynie domniemywać o ich korzystnych relacjach zbliżeniowych [53, 4]. Główną endoglukanazą w celulosomie jest CelA, natomiast główną egzoglukanazą zawsze występującą w celulosomie jest CelS. Białko CelS jest aktywne wobec mikrokrystalicznej i amorficznej celulozy z wykluczeniem karboksymetylocelulozy. Produktem funkcjonowania CelS jest celobioza, która na zasadzie sprzężenia zwrot-



Rys. 2. Schemat struktury celulosomu (opis w tekście)

nego działa hamująco na jej aktywność [43]. Wyjątkowość i efektywność celulosomu wynika między innymi: (i) ze zdolności jednoczesnego działania endoglukanaz wewnątrz łańcucha celulozy, (ii) aktywności egzoglukanaz działających w przeciwnych kierunkach na ich końcach, przymocowanych do białka skafoldyny, (iii) odpowiednim stosunku pomiędzy katalitycznymi domenami, które optymalizują synergizm między nimi, (iv) odpowiednimi odstępami między poszczególnymi składnikami celulosomu, oraz (v) obecności wielu różnych enzymów w tym chitynaz i hemicelulaz, które umożliwiają rozkład innych składników ścian komórkowych roślin [53].

Niektóre elementy i właściwości celulosomów, poszczególnych gatunków bakterii są zadziwiająco podobne, co może świadczyć, że geny kodujące te kompleksy mogą być przenoszone za pomocą horyzontalnego transferu genów i mogą pochodzić od wspólnego przodka. Wykazano, że niecelulolityczny *C. acetobutylicum* zawiera geny kodujące składniki celulosomu i ich odpowiednia aktywacja umożliwia hydrolizę karboksymetylocelulozy [86].

4.3. Biologia molekularna oraz inżynieria genetyczna celulaz

Dotychczasowe badania molekularne nad enzymami celulolitycznymi mikroorganizmów pozwoliły na ustalenie pewnych informacji dotyczących organizacji genów, regulacji produkcji oraz duplikacji i horyzontalnego transferu genów.

Zarówno w przypadku grzybów jak i bakterii geny kodujące celulazy znajdują się na chromosomie [88]. Geny te są rozłożone losowo jak w przypadku np. *C. thermocellum* lub skupione w genomie (np. u *C. cellolyticum*, *C. cellulovorans*, *C. acetobutylicum*) [6, 28].

Duża liczba homologicznych genów kodujących celulazy, u mikroorganizmów celulolitycznych, powiązanych ze sobą lub występujących w tym samym środowisku (np. żwacz), sugeruje, że rearanżacje genów chromosomowych oraz horyzontalny transfer genów, przyczynił się do obecnego bogatego spektrum systemów celulaz [53]. Przykładem mogą być geny kodujące celobiohydrolazy (Cel7D) w genomie *P. chrysosporium* oraz wysoce homologiczne geny kodujące celulazy CelK i CbhA w genomie

C. thermocellum [10, 101]. Ponadto wykazano, że powstawanie celulaz z tej samej rodziny w obrębie gatunku, lecz o różnej aktywności, takich jak endoglukanaza – Cel6B i celobiohydrolaza – Cel6A w genomie *T. reesei,* może być spowodowane duplikacją genów i następczym różnicowaniu ich specyficzności w zależności od podłoża, na którym występował gatunek [53].

Na podstawie badań genomów stwierdzono, że grzyby beztlenowe nabyły geny kodujące enzymy celulolityczne od bakterii. Potwierdza to brak intronów w genach hydrolaz glikozydowych grzybów beztlenowych oraz bakterii. Zjawisko to tłumaczy się wysokim zagęszczeniem komórek oraz bliskością między komórkami bakterii i grzybów występujących w żwaczu. Grzyby tlenowe w sekwencjach kodujących geny hydrolaz glikozydowych zawierają już takie introny [24, 63].

Regulacja ekspresji genów oraz produkcja celulaz zależy od podłoża, na jakim występują drobnoustroje. Enzymy celulolityczne produkowane są tylko w obecności substratu (celuloza), a hamowane, gdy dostępne są monosacharydy łatwo nadające się do wykorzystania np. glukoza [81]. Celobioza, δ-celobiozo-1,5-lakton i inne utlenione produkty hydrolizy celulozy (nawet ksylobioza w wyniku hydrolizy ksylanu) nie zostały wykluczone, jako naturalne induktory. Celobioza może funkcjonować zarówno, jako induktor jak i inhibitor przy jej wysokim stężeniu [44]. Ekspresja genów celulaz *T. fusca* regulowane są na poziomie transkrypcji i ulegają indukcji w obecności celobiozy oraz represji katabolicznej w obecności glukozy. Represorem jest białko CelR, które hamuje produkcję celulaz w przypadku braku celulozy lub celobiozy. Celobioza działa, jako induktor, a także unieszkodliwia CelR, co ułatwia jego oddysocjowanie od promotora, pozwalając na transkrypcję genów enzymów z tych promotorów. W przypadku braku celobiozy i obecności w podłożu glukozy, białko CelR blokuje promotor, co uniemożliwia transkrypcję tych genów [84].

Rozwój badań genetycznych oraz postęp technik molekularnych, skłonił naukowców do modyfikacji istniejących enzymów, wykorzystując narzędzia inżynierii genetycznej. Głównym celem i założeniem, była poprawa efektywności, wydajności i aktywności istniejących enzymów. Pomimo szerokiego spektrum izolowanych celulaz bądź mikroorgaznimów celulolitycznych, dotychczas żadne nie spełniają wszystkich wymagań procesu przemysłowego. Jednakże enzymy te, są dobrym punktem wyjścia do poprawy ich aktywności oraz zastosowaniu w mikrobiologii przemysłowej. Istnieją dwie główne metody umożliwiające modyfikacje enzymów: (i) świadome i ukierunkowane projektowanie enzymów dzięki mutagenezie oraz (ii) ukierunkowana ewolucja celulaz.

Racjonalne projektowanie enzymów oparte jest na odpowiednim wyborze modyfikowanego enzymu, wskazania miejsc aminokwasów, które mają podlegać zmianom oraz charakterystyce mutantów. Użycie tej metody wymaga dokładnej znajomości sekwencji aminokwasów w miejscu aktywnym białka oraz zależności struktury białka od funkcji. Wiedza ta pozwala na zmiany w sekwencji genów kodujących aminokwasy, będące częścią miejsca aktywnego i ostatecznie na zmianę struktury białka, a nawet wymianę całych domen takiego białka [69]. Zmiany w sekwencji można uzyskać poprzez ukierunkowaną mutagenezę typu nonsens, insercje, bądź obcinanie fragmentów genów.

W przeciwieństwie do ukierunkowanego projektowania i konstrukcji enzymów, drugi sposób oparty jest na ewolucji enzymów, selekcji naturalnych białek i rozwoju pożądanych cech celulaz. Najczęściej stosowanymi technikami są podatne na błędy epPCR (Error-prone Polymerase Chain Reaction) i tasowanie fragmentów DNA (DNA shuffling). Metody te powodują powstanie różnych mutacji punktowych, w losowych miejscach (epPCR), generowanie dużej biblioteki wariantów wielu kopii genów kodujących jedno białko, ale nieznacznie różniących się pomiędzy sobą. Metoda wykorzystująca „ukierunkowaną ewolucję" ma tą przewagę, że jest niezależna od struktury enzymów i interakcji między enzymem i substratem. Głównym wyzwaniem jest jednak opracowanie technik do oznaczania wydajności i selekcji mutantów. Przykłady niektórych enzymów celulolitycznych poddanych modyfikacjom zostały przedstawione w tabeli III.

5. Ekologiczny i praktyczny aspekt utylizacji celulozy

Różnorodne środowiska, w których celuloza jest powszechnie dostępna, sprzyjały rozwojowi wielu sposobów utylizacji celulozy przez mikroorganizmy. Dostępność wody, tlenu, potencjał redoks, zmiany temperatury i składników odżywczych to główne czynniki, które wpływały na zróżnicowanie oraz istotną ewolucję tych strategii [53].

W glebach, celuloza jest dostępna przede wszystkim w postaci ściółki, która jest stosunkowo oporna na rozkład, ze względu na wysoki stopień polimeryzacji lignin. Braki azotu w postaci dostępnych aminokwasów, białek i innych składników odżywczych stymulujących wzrost mikroorganizmów, pozwoliły na dominację grzybów w tych środowiskach [52]. Grzyby opracowały strategię degradacji materiału ligninocelulozowego opartą na wytwarzaniu zewnątrzkomórkowych enzymów celulolitycznych i ligninowych produkowanych w obecności aktywnych cząsteczek tlenu. Podobną strategię odnotowuje się również u niektórych bakterii z rodzaju *Cytophyga, Bacillus* i *Cellulomonas* [92].

W środowisku wodnym, dominującą grupą mikroorganizmów celulolitycznych są bakterie. W warstwach

Tabela III
Przykłady modyfikacji genetycznych niektórych enzymów celulolitycznych

Gatunek bakterii	Modyfikowany enzym	Zmiany właściwości	Metoda	Literatura
Ukierunkowana mutanogeneza				
Acidothermus cellulolyticus	Endoglukanaza	rodzaj uwolninego produktu	ukierunkowana mutacja	[73]
Acidothermus cellulolyticus	Endoglukanaza	redukcja inhibicji enzymu przez produkt	ukierunkowana mutacja	[2]
Pectobacterium chrysanthami	Endoglukanaza	aktywność	mutacja nonsens	[51]
Pectobacterium chrysanthami	Endoglukanaza	aktywność	obcięcie insercji	[67]
Thermobifida fusca	Procesualna endoglukanaza	aktywność	ukierunkowana mutacja	[16]
Thermotoga maritima	Endoglukanaza	aktywność	ukierunkowana mutacja, inżynieria CBD	[54]
Ukierunkowana ewolucja				
Agrobacterium sp.	zmutowana α-glukozydaza	aktywność	epPCR	[42]
Bacillus subtilis	Endoglukanaza	aktywność	tasowanie DNA	[41]
Clostridium cellulovorans	Endoglukanaza	termiczna stabilność	tasowanie rodzin	[64]
Paenibacillus polymyxa	α-D-glukozydaza	termiczna stabilność	epPCR	[26]
Paenibacillus polymyxa	α-D-glukozydaza	termiczna stabilność	epPCR + tasowanie rodzin	[1]
Pyrococcus furiousus	α-glukozydaza	aktywność	tasowanie rodzin	[40]
Termotoga neapolitana	α-D-glukozydaza	aktywność	epPCR	[57]

osadu detrytusu panują głównie warunki z ograniczonym dostępem tlenu, dlatego bakterie beztlenowe wykształciły ekonomiczną strategię wychwytywania produktów hydrolizy celulozy a ich enzymy celulolityczne występują w formie kompleksów (celulosomów) [53]. Podobnym środowiskiem jest przewód pokarmowy zwierząt roślinożernych, gdzie panują trudne warunki beztlenowe z wysoką konkurencją innych mikroorganizmów oraz enzymów gospodarza. Dodatkowym ograniczeniem jest czas przejścia materiału przez układ pokarmowy żywiciela. Mikroorganizmy musiały, więc zoptymalizować swój czas regeneracji oraz wyspecjalizować czynniki ochronne przed enzymami gospodarza.

Przeprowadza się wiele badań oraz izolacji drobnoustrojów celulolitycznych i ich enzymów, ze środowisk ekstremalnych (temperatura, zasolenie itp.). Przykładem może być *Paenibacillus campinasensis* BL11, szczep o właściwościach celulolitycznych, wyizolowany w 2006 roku z czarnego ługu w procesie roztwarzania Krafta. Warunki tam panujące są silnie alkaliczne, więc zdecydowanie niekorzystne dla wzrostu bakterii. Izolacja mikroorganizmów celulolitycznych o szerokim zakresie tolerancji na pH może być dodatkowym atrybutem podczas zaburzonych warunków wzrostowych dla mikroorganizmów w trakcie wstępnej obróbki ligninocelulozy [26]. Z gorących źródeł termalnych wyizolowano, termostabilny szczep *Bacillus subtilis* DR wykazujący 70% swojej aktywności celulolitycznej nawet w 75°C [49]. Inny termofilny gatunek *Brevibacillus sp*. JXL wyizolowany z rolniczych odpadów hodowli trzody chlewnej, charakteryzuje się wysokim spektrum substratów takich jak krystaliczna celuloza, CMC, ksylan, celobioza, glukoza i ksyloza. Enzymy tego szczepu były aktywne przez1 godzinę nawet w 100°C [50].

W przyrodzie utylizacja i wykorzystanie celulozy prowadzone są głównie przez wiele celulolitycznych oraz niecelulolitycznych drobnoustrojów. Mikroorganizmy w takich konsorcjach często konkurują o związki odżywcze, ale wiele z nich również współpracuje na zasadzie komensalizmu, protokooperacji lub syntrofii. Komensalizm, czyli współzależność, w wyniku, której jeden z gatunków czerpie wyraźne korzyści, polega głównie na przeprowadzeniu przez mikroorganizmy celulolityczne substratów, nieprzyswajalnych przez partnera (ligninocelluloza), w produkty, które już może wykorzystać, jako składniki odżywcze (glukoza). W przypadku protokooperacji interakcja międzygatunkowa charakteryzuje się czerpaniem obustronnych korzyści przez organizmy, lecz nie jest wymagana do egzystencji monokultur tych drobnoustrojów. Polega głównie na wzajemnym dostarczaniu związków odżywczych, w tym metabolitów wtórnych (np. witamin), przetwarzaniu białek oraz rozkładzie złożonych węglowodanów.

Syntrofia w procesie metanogenezy opiera się na ścisłej współpracy różnych grup mikroorganizmów w procesie katabolizmu beztlenowego. Metan jest produkowany przez archeony metanogenne w procesie redukcji dwutlenku węgla lub octanu wodorem powstałym w fermentacji związków organicznych (takich jak maślan, propionian, mrówczan, etanol). Praktycznie

Tabela IV
Przykłady interakcji mikroorganizmów celulolitycznych i niecelulolitycznych

Mikroorganizymy		Substrat	Warunki hodowli	Efekt kooperacji	Literatura
celulolityczne	niecelulolityczne				
Clostridium thermocellum	*Methanobacterium thermaautotropium*	Mikrokrystaliczna celuloza/celobioza	Hodowla wsadowa, 60°C	Zwiększona szybkość degradacji celulozy; zmiany produktu końcowego z etanolu na metan	[96]
	C. thermosaccharolyticum	Solka Floc	Hodowla wsadowa,	3-krotny wzrost wydajności produkcji etanolu	[65]
	C. thermohydrosulfuricum	Celuloza	Hodowla wsadowa, 60°C	Zwiększona szybkość degradacji celulozy	[62]
	C. thermohydrosulfuricum	Wytłoki z Osiki	Hodowla wsadowa, 60°C	Zwiększona produkcja etanolu	[94]
Fibrobacter succinogenes	*Selenomonas ruminantium*	Celuloza	Hodowla wsadowa, 60°C	Zwiększona degradacja celulozy, konwersja bursztynianu do propionianu	[77]
Ruminococcus albus	*Methanobrevibacter smithii*	Mikrokrystaliczna celuloza	Hodowla ciągła, 37°C	Metanogeneza dzięki międzygatunkowym interreakcjom mikroorganizmom wodorowym	[68]
F. succinogenes lub *Ruminococcus flavefaciens*	*Prevotella ruminicola*	Trawa kupkówka pospolita lub lucerna	Hodowla wsadowa, 38°C	Zwiększony stopień rozkładu celulozy	[23]
F. succinogenes/ *Buytrivibrio fibrisolvens*	*Treponema bryantii*	Słoma jęczmienna	Hodowla wsadowa, 39°C	Zwiększenie szybkości trawienia słomy jęczmiennej, ale nie czystej celulozy	[45]
Trichoderma harzianum	*Clostridium butyricum*	Celuloza	Hodowla	Produkty hydrolizy tlenowej celulozy wykorzystywane przez beztlenowe *Clostridium* sp. wiążące N2	[93]
Cellulomonas flavigena	*Azospirillum brasilense*	Filtr papierowy, słoma pszenicy	Hodowla wsadowa, 30°C	Fizyczne oddziaływania bakterii degradujących celulozę z wiążącym azot Azospirillum	[30]
Cellulomonas flavigena	*Xanthomonas* sp.	Wytłoki z trzciny cukrowej	Hodowla ciągła, 30–40°C	Wydajniejszy wzrost w współhodowli niż w monokulturze	[70]

wszystkie związki organiczne mogą być ostatecznie przekonwertowane w metan, w wyniku syntrofii bakterii fermentacyjnych i metanogenów. Konsumentami produkowanego wodoru mogą być wspomniane metanogeny, ale także, obecne bakterie homoacetogenne i bakterie redukujące siarczany. Procesy fermentacyjne i produkcja metanu muszą pozostawać w równowadze gdyż nadmierne gromadzenie w hodowli produktów fermentacji, w tym wodoru może być toksyczne dla różnych grup mikroorganizmów przeprowadzających proces fermentacji metanowej [22, 60]. Przykładowe wyniki prowadzonych badań nad interakcjami mikroorganizmów celulolitycznych oraz niecelulolitycznych przedstawione są w tabeli IV.

W hodowli mikroorganizmów, stosowanej w procesie utylizacji ligninocelulozy na ogół otrzymuje się mieszaninę produktów, które mogą zawierać glukozę, kwas octowy, dwutlenek węgla. W obecności innych grup drobnoustrojów ich różnorodność, może zostać zredukowana do ostatecznych produktów. W zależności od grupy fizjologicznej prokariontów wchodzących w skład zespołu mikroorganizmów (beztlenowe bakterie fermentacyjne, archeony metanogenne) ostatecznymi produktami mogą być: etanol i metan wchodzący w skład wartościowego biogazu. Proces metanogenzy jest powszechnie stosowany w oczyszczalniach ścieków, w celu wytworzenia biogazu, aby zrównoważyć koszt pracy oczyszczalni [36, 59, 89].

Zastosowanie enzymów oraz drobnoustrojow celulolitycznych (również tych modyfikowanych genetycznie) może mieć ogromny wpływ na poprawę efektywności hydrolizy, co za tym idzie zoptymalizowaniu oraz obniżeniu kosztów produkcji biopaliw.

Biopaliwa, w obecnej chwili mogą być najważniejszymi alternatywnymi źródłami energii. W biotechnologii wyróżnia się dwie możliwości otrzymywania paliw z biomasy ligninocelulozowej. Pierwszy proces SHF (Separate Hydrolysis and Fermentation), oparty jest na oddzielnych etapach hydrolizy oraz fermentacji. Substraty są degradowane przez enzymy celuloli-

tyczne, hemicellulolityczne, ligninolityczne w wyniku hydrolizy, a następnie produkty te ulegają przemianom biochemicznym do ostatecznych produktów np. do metanu. Drugi proces tzw. „skonsolidowany bioprocesing" (CBP, Consolidated Bioprocessing), oparty jest na połączeniu dwóch wymienionych etapów, w jeden nierozłączny proces przeprowadzany w jednym bioreaktorze. Obecnie wciąż poszukuje się takich bakterii, które efektywnie radziłyby sobie zarówno z procesem hydrolizy jak i fermentacji. W tym celu próbuje się stosować metody inżynierii genetycznej. Proces „skonsolidowanego bioprocesingu" boryka się z dwoma głównymi problemami. Pierwszy z nich to optymalna temperatura dla hydrolizy biomasy ligninocelulozowej (ok. 30°C) oraz fermentacji (w przypadku fermentacji metanowej – 37°C). Drugi problem polega na utrzymaniu stabilnej struktury mikroorganizmów tlenowych i beztlenowych, umożliwiającą kontrolę przebiegu procesów biochemicznych przeprowadzanych przez dane grupy mikroorganizmów i prowadzących do powstawania wartościowych biopaliw w procesie przemysłowym.

6. Podsumowanie

Istnieje ogromna ilość odpadów o niskiej wartości lub też materiałów lignocelulozowych, które są zwyczajowo marnowane. Wykorzystanie materiałów lignocelulozowych, takich jak pozostałości rolniczych, przemysłowych, traw, odpadów leśnych, jak również roślin energetycznych, może znacznie przyczynić się do poprawy bioenergetyki w skali światowej. Dzięki mikroorganizmom celulolitycznym możliwe jest wykorzystanie zgromadzonych zapasów energii i ich biokonwersja w użyteczne źródła energii [97].

Procesem kluczowym, często limitującym szybkość biokonwersji, jest właśnie reakcja hydrolizy materiału ligninocelulozowego. W celu ułatwienia szybkiej i skutecznej degradacji ligninocelulozy wymagana jest wstępne przygotowanie biomasy. Alternatywą dla znanych metod fizycznych i chemicznych, są metody biologiczne wykorzystujące aktywność mikroorganizmów, głównie grzybów i bakterii, produkujących enzymy celulolityczne.

Izolowane drobnoustroje celulolityczne różnią się m.in budową i postacią występowania enzymów, szybkością i zakresem aktywności celulolitycznej, aktywnością pomocniczych enzymów oraz losami produktów powstałych podczas hydrolizy materiału ligninocelulozowego. Wspomniane wyżej mutualistyczne interakcje mikroorganizmów celulolitycznych z niecelulolitycznymi mają znaczące konsekwencje w środowisku naturalnym oraz w procesach wykorzystywanych przez człowieka.

Równoczesny proces utylizacji celulozy oraz metanogenezy bądź fermentacji alkoholowej prowadzony przez liczne drobnoustroje, prowadzi do otrzymania biogazu i bioetanolu.

Wiedza na temat utylizacji celulozy, enzymów i mikroorganizmów celulolitycznych a także znajomość zachodzących procesów biochemicznych, stwarza szerokie możliwości dotyczące rozwoju oraz optymalizacji procesów pozyskiwania ekologicznej energii.

Podziękowania

Artykuł powstał w ramach programu Projektu Badań Stosowanych NCBR nr 177481 pt. „Optymalizacja pracy dwustopniowego reaktora do wytwarzania wysokometanowego biogazu – opracowanie biostarterów i biomarkerów fermentacji metanowej".

Piśmiennictwo

1. Arrizubieta M.J, Polaina J.: Increased thermal resistance and modification of the catalytic properties of a beta-glucosidase by random mutagenesis and *in vitro* recombination. *J. Biol. Chem.* **275**, 28843–28848 (2000)
2. Baker J.O., McCarley J.R., Lovett R., Yu C.H., Adney W.S., Rignall T.R., Vinzant T.B., Decker S.R., Sakon J., Himmel M.E.: Catalytically enhanced endocellulase Cel5A from *Acidothermus cellulolyticus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* (**121–124**), 129–140 (2005)
3. Bayer E.A., Chanzy H., Lamed R., Shoham Y.: Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 548–557 (1998)
4. Beguin P., Alzari P.M.: The cellulosome of *Clostridium thermocellum*. *Biochem. Soc. Trans.* **26**, 178–185 (1998)
5. Beguin P., Aubert J.P.: The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev*. **13,** 25–58 (1994)
6. Belaich J.P., Belaich A., Fierobe H.P., Gal L., Gaudin C., Page's S., Reverbel-Leroy C., Tardif C.: The cellulolytic system of *Clostridium cellulolyticum (W)* Genetics, biochemistry and ecology of cellulose degradation. red. K. Ohmiya, K. Hayashi, K. Sakka, Y. Kobayashi, S. Karita, T. Kimura *Uni Publishers*, Tokyo, 1999 s. 479–487
7. Carlile, M.J., Watkinson S.C.: The fungi,. *Academic Press*, New York, N.Y. 269275 (1997)
8. Carpita, N.C., Gibeaut D.M.: Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* **3**, 1–30 (1993)
9. Chaudhary P., Kumar N.N., Deobagkar D.N.: The glucanases of *Cellulomonas*. *Biotechnol. Adv.* **15**, 315–331 (1997)
10. Covert S.F., Bolduc J., Cullen D.: Genomic organization of a cellulase gene family in *Phanerochaete chrysosporium*. *Curr. Genet.* **22**, 407–413 (1992)
11. Coutinho P.M., Henrissat B.: The modular structure of cellulases and other carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach (W) Genetics, biochemistry and ecology of cellulose degradation, red. K. Ohmiya, K. Hayashi, K. Sakka, Y. Kobayashi, S. Karita, T. Kimura, Uni Publishers Co., Tokyo, 1999 s. 15–23
12. Davies G., Henrissat B.: Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **3**, 853–859 (1995)
13. Din N., Damude H.G., Gilkes N.R., Miller R.C., R. Warren A.J., Kilburn D.G.: C1-Cx revisited: intramolecular synergism in a cellulase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 11383–11387 (1994)

14. Ding S.Y., Rincon M.T., Lamed R., Martin J.C., McCrae S.I., Aurilia V., Shoham Y., Bayer E.A., Flint H.J.: Cellulosomal scaffoldin-like proteins from *Ruminococcus flavefaciens*. *J. Bacteriol.* **183**, 1945–1953 (2001)
15. Eriksson K.E.L., Blanchette R.A., Ander P.: Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components, *Springer--Verlag*, New York, N.Y. 1990
16. Escovar-Kousen J.M, Wilson D., Irwin D.: Integration of computer modeling and initial studies of site-directed mutagenesis to improve cellulase activity on Cel9A from *Thermobifida fusca*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **113–116**, 287–297 (2004)
17. Fan, L.T.,. Lee Y.H, Beardmore D.H.: Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* **22**, 177–199 (1980)
18. Fan, L.T., Gharpuray, M.M., Lee, Y.H.: Cellulose Hydrolysis Biotechnology Monographs 57, Springer, Berlin, 1987
19. Fanutti C., Ponyi T., Black G.W., Hazlewood G.P., Gilbert H.J.: The conserved noncatalytic 40-residue sequence in cellulases and hemicellulases from anaerobic fungi functions as a protein docking domain. *J. Biol. Chem.* **270**, 29314–29322 (1995)
20. Fields, M.W., Russell J.B., Wilson D.B.: The role of ruminal carboxymethylcellulases in the degradation of β-glucans from cereal grain. *FEMS Microbiol. Ecol.* **27**, 261–268 (1998)
21. Fields M.W., Mallik S., Russell J.B.: *Fibrobacter succinogenes* S85 ferments ball-milled cellulose as fast as cellobiose until cellulose surface area is limiting. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 570–574 (2000)
22. Fondevila M., Dehority B.A.: Degradation and utilization of forage hemicellulose by rumen bacteria, singly and in coculture or added sequentially. *J. Appl. Bacteriol.* **77**, 541–548 (1994)
23. Fondevila M., oraz Dehority B.A.: Interactions between *Fibrobacter succinogenes*, *Prevotella ruminicola*, and *Ruminococcus flavefaciens* in the digestion of cellulose from forages. *J. Anim. Sci.* **74**, 678–684 (1996)
24. Gaudin C., Belaich A., Champ S., Belaich J.P.: CelE, a multidomain cellulase from *Clostridium cellulolyticum*: a key enzyme in the cellulosome? *J. Bacteriol.* **182**, 1910–1915 (2000)
25. Ghose T.K.: Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem.* **59,** 257–268 (1987)
26. Gonzalez-Blasco G., Sanz-Aparicio J., Gonzalez B., Hermoso J.A., Polaina J.: Directed evolution of beta -glucosidase A from *Paenibacillus polymyxa* to thermal resistance. *J. Biol. Chem.* **275**, 13708–13712 (2000)
27. Greene N.: Growing energy. How biofuels can help end America's oil dependence. Natural Resources Defense Council, New York, 2004, s. 1–86
28. Guglielmi G., Beguin P.: Cellulase and hemicellulase genes of *Clostridium thermocellum* from five independent collections contain few overlaps and are widely scattered across the chromosome. *FEMS Microbiol. Lett.* **161**, 209–215 (1998)
29. Halldorsdottir S., Thorolfsdottir E.T., Spilliaert R., Johansson M., Thorbjarnardottir S.H., Palsdottir A., Hreggvidsson G.O., Kristjansson J.K., Holst O., Eggertsson G.: Cloning, sequencing and overexpression of a *Rhodothermus marinus* gene encoding a thermostable cellulase of glycosyl hydrolase family 12. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**, 277–284 (1998)
30. Halsall D.M. oraz Goodchild D.J.: Nitrogen fixation associated with development and localization of mixed populations of *Cellulomonas sp*. and *Azospirillum brasilense* grown on cellulose or wheat straw. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 849–854 (1986)
31. Henriksson G., Johansson G., Pettersson G.: A critical review of cellobiose dehydrogenases. *J. Biotechnol.* **78**, 93–113 (2000)
32. Henrissat B., Bairoch A.: Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **316**, 695 – 696 (1996)
33. Henrissat B., Teeri T.T., Warren R.A.J.: A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants. *FEBS Lett.* **425**, 352–354 (1998)
34. Hill J., Nelson E., Tilman D., Polasky S., Tiffany D.: Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **314**, 1598–1600 (2006)
35. Holtzapple M., Cognata M., Shu Y., Hendrickson C.: Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **36**, 275–287 (1990)
36. Horvan B.,Rieu-Lesme F., Fonty G., Gouet P.: *In vitro* interaction between rumen H_2-producing cellulolytic microorganisms and H_2-utilizing acetogenic and sulfate-reducing methanogenic bacteria. *Anaerobe*, **2**, 175–180 (1996)
37. Hu G., Heitmann J.A., Rojas O.J.: Quantification of cellulase activity using the quartz crystal microbalance technique. *Anal. Chem.* **81**, 1872–1880 (2009)
38. Ilmen M., Saloheimo A., Onnela M.L., Penttila M.E.: Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63,** 1298–1306 (1997)
39. Irwin D.C., Spezio M., Walker L.P., Wilson D.B.: Activity studies of eight purified cellulases: specificity, synergism, and binding domain effects. *Biotechnol. Bioeng.* **42**, 1002–1013 (1993)
40. Kaper T., Lebbink J.H., Pouwels J., Kopp J., Schulz G.E., van der Oost J., de Vos W.M.: Comparative structural analysis and substrate specificity engineering of the hyperthermostable beta--glucosidase CelB from *Pyrococcus furiosus*. *Biochemistry*, **39**, 4963–4970 (2000)
41. Kim Y.S., Jung H.C, Pan J.G.: Bacterial cell surface display of an enzyme library for selective screening of improved cellulose variants. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 788–793 (2000)
42. Kim Y.W., Lee S.S, Warren R.A, Withers S.G.: Directed evolution of a glycosynthase from *Agrobacterium sp*. increases its catalytic activity dramatically and expands its substrate repertoire. *J. Biol. Chem.* **279**, 42787–42793 (2004)
43. Kruus K., Andreacchi A., Wang W.K., Wu J.H.D.: Product inhibition of the recombinant CelS, an exoglucanase component of the *Clostridium thermocellum* cellulosome. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 399–404 (1995)
44. Kubicek C.P., Penttila M.E.: Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*. (W) *Trichoderma* and *Gliocladium*, red. G.E. Harman and C.P. Kubicek, vol. 2. Taylor & Francis Ltd., London, 1998, s. 49–72
45. Kudo H., Cheng K.J., Costerton J.W.: Interactions between *Treponema bryantii* and cellulolytic bacteria in the *in vitro* degradation of straw cellulose. *Can. J. Microbiol.* **33**, 244–248 (1987)
46. Lamed R., Setter E., Kenig R., Bayer E.A.: The cellulosome: a discrete cell surface organelle of *Clostridium thermocellum* which exhibits separate antigenic, cellulose-binding and various cellulolytic activities. *Biotechnol. Bioeng.* **13**, 163–181 (1983)
47. Lewis, N.G., and E. Yamamoto: Lignin: Occurrence, biogenesis and biodegradation. Ann. Rev. Plant Physiol. *Plant Molec. Biol.* **41**, 455–496 (1990)
48. Li X.L., Chen H., Ljungdahl L.G.: Two cellulases, CelA and CelC, from the polycentric anaerobic fungus *Orpinomyces* strain PC-2 contain N-terminal docking domains for a cellulase-hemicellulase complex. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4721–4728 (1997)
49. Li W., Zhang W.W., Yang M.M., Chen Y.L.: Cloning of the thermostable cellulase gene from newly isolated *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*. *Mol Biotechnol.* **2**, 195–201 (2008)
50. Liang Y., Yesuf J., Schmitt S., Bender K., Bozzola J.: Study of cellulases from a newly isolated thermophilic and cellulolytic *Brevibacillus sp*. strain JXL. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* (2009)

51. Lim W.J, Hong S.Y, An C.L, Cho K.M, Choi B.R, Kim Y.K, An J.M, Kang J.M, Lee S.M, Cho S.J, Kim H., Yun H.D.: Construction of minimum size cellulase (Cel5Z) from *Pectobacterium chrysanthemi* PY35 by removal of the C-terminal region. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**, 46–52 (2005)
52. Lynch J.M.: The terrestrial environment. (W) Microorganisms in action: concepts and applications in microbial ecology, red. J.M Lynch, J.E. Hobbie, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, 1988, s. 103–131
53. Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S.: Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **66**, 506–577 (2002)
54. Mahadevan S.A., Wi S.G., Lee D.S, Bae H.J.: Site-directedmutagenesis and CBM engineering of Cel5A (Thermotoga maritima). *FEMS Microbiol. Lett*., **287**, 05–211 (2008)
55. Maki M., Leung K.T., Qin W.: The prospects of cellulose – producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *Int. J. Biol. Sci.* **5**, 500–516 (2009)
56. Mandels M., Reese E.T.: Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *J. Bacteriol.* **73,** 269–278 (1957)
57. McCarthy J.K., Uzelac A., Davis D.F., Eveleigh D.E.: Improved catalytic efficiency and active site modification of 1,4-beta--D-glucan glucohydrolase A from *Thermotoga neapolitana* by directed evolution. *J. Biol. Chem.* **279**, 11495–11502 (2004)
58. Messner R., Hagspiel K., Kubicek C.P.: Isolation of a beta-glucosidase-binding and activating polysaccharide from cell walls of *Trichoderma reesei*. *Arch. Microbiol.* **154**, 150–155 (1990)
59. Miller T.L., Currenti E., Wolin M.J.: Anaerobic bioconversion of cellulose by *Ruminococcus albus, Methanobrevibacter smithii*, and *Methanosarcina barkeri*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 494–498 (2000)
60. Miron J. oraz Ben-Ghedalia D.: The degradation and utilization of wheat-straw cell wall monosaccharide components by defined ruminal cellulolytic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 432–437 (1992)
61. Montegut D., Indictor N., Koestler R.J.: Fungal deterioration of cellulosic textiles: a review. *Int. Biodeterior.* **28**, 209–226 (1991)
62. Mori Y.: Nutritional interdependence between *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* and *Clostridium thermocellum*. *Arch. Microbiol.* **164**, 152–154 (1995)
63. Morrison M.: Do ruminal bacteria exchange genetic material? *J. Dairy Sci*. **79**, 1476–1486 (1996)
64. Murashima K., Kosugi A., Doi R.H.: Thermostabilization of cellulosomal endoglucanase EngB from *Clostridium cellulovorans* by *in vitro* DNA recombination with non-cellulosomal endoglucanase EngD. *Mol Microbiol*. **45**, 617–626 (2002)
65. Ng T.K., Ben-Bassat A., Zeikus J.G.: Ethanol production by thermophilic bacteria: fermentation of cellulosic substrates by cocultures of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 1337–1343 (1981)
66. Palonen H., Tenkanen M., Linder M.: Dynamic interaction of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases Ce16A and Ce17A and cellulose at equilibrium and during hydrolysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5229–5233 (1999)
67. Park S.R., Cho S.J., Kim M.K., Ryu S.K., Lim W.J., An C.L., Hong S.Y., Kim J.H., Kim H., Yun H.D.: Activity enhancement of Cel5Z from *Pectobacterium chrysanthemi* PY35 by removing C-terminal region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**, 425–430 (2002)
68. Pavlostathis S.G., Miller T.L., Wolin M.J.: Cellulose fermentation by continuous cultures of *Ruminococcus albus* and *Methanobrevibacter smithii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 109–116 (1990)
69. Percival Zhang Y.H., Himmel M.E., Mielenz J.R.: Outlook for cellulose improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol. Adv*. **24**, 452–481 (2006)
70. Ponce-Noyola T. oraz de la Torre M.: Interactions of a mixed culture composed of *Cellulomonas flavigena* and *Xanthomonas sp*. growing in continuous culture on sugar cane bagasse. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 531–534 (1993)
71. Reese E.T., Mandels M.: Enzymatic degradation. (W) Cellulose and cellulose derivatives. red. N.M. Bikales and L. Segal, Wiley Interscience, New York, 1079–1094 (1971)
72. Reczey K., Brumbauer A., Bollok M., Szengyel Z., Zacchi G.: Use of hemicellulose hydrolysate for beta-glucosidase fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **72**, 225–235 (1998)
73. Rignall T.R., Baker J.O., McCarter S.L., Adney W.S., Vinzant T.B., Decker S.R., Himmel M.E.: Effect of single active-site cleft mutation on product specificity in a thermostable bacterial cellulase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **98–100**, 383–394 (2002)
74. Rouvinen J., Bergfors T.,Teeri T., Knowles J.K., Jones T.A.: Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science*, **249**, 380–386 (1990)
75. Sakon J., Irwin D., Wilson D.B., Karplus P.A.: Structure and mechanism of endo/exocellulase E4 from *Thermomonospora fusca*. *Nature Struct. Biol.* **4**, 810–818 (1997)
76. Sakon J., Adney W.S., Himmel M.E., Thomas S.R., Karplus P.A.: Crystal structure of thermostable family 5 endocellulase E1 from *Acidothermus cellulolyticus* in complex with cellotetraose. *Biochemistry*, **35**, 10648–10660 (1996)
77. Scheifinger C.C., Wolin M.J.: Propionate formation from cellulose and soluble sugars by combined cultures of *Bacteroides succinogenes* and *Selenomonas ruminantium*. *Appl. Microbiol.* **26**, 789–795 (1973)
78. Schneider S.H.: The Greenhouse Effect: Science and Policy. *Science,* **243**, 771–781 (1989)
79. Schurz J.: Bioconversion of Cellulosic Substances into Energy Chemicals and Microbial Protein Symposium Proceedings, IIT, New Delhi, 37 (1978)
80. Schwarz W.H.: The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 634–649 (2001)
81. Seiboth B., Hakola S., Mach R.L., Suominen P., Kubicek C.P.: Role of four major cellulases in triggering cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. *J. Bacteriol.* **179**, 5318–5320 (1997)
82. Sharrock K.R.: Cellulase assay methods: a review. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **17**, 81–105 (1988)
83. Shoham Y., Lamed R., Bayer E.A.: The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides. *Trends Microbiol.* **7**, 275–281 (1999)
84. Spiridonov N.A., Wilson D.B.: Characterization and cloning of *celR*, a transcriptional regulator of cellulase genes from *Thermomonospora fusca*. *J. Biol. Chem.* **274**, 13127–13132 (1999)
85. Sun Y., Cheng J.: Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology.* **83**, 1–11 (2002)
86. Tamaru Y., Karita S., Ibrahim A., Chan H., Doi R.H.: A large gene cluster for the *Clostridium cellulovorans* cellulosome. *J. Bacteriol.* **182**, 5906–5910 (2000)
87. Teeri T.T.: Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends Biotechnol.* **15**, 160–167 (1997)
88. Tomme P.R., Warren A.J., Gilkes N.R.: Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microb. Physiol.* **37**, 1–81 (1995)
89. Tong X.G., Smith L.H., McCarty P.L.: Methane fermentation of selected lignocellulosic materials. *Biomass*, **21**, 239–255 (1990)
90. Usami S., Kirimura K., Imura M., Morikawa S.: Cellular localization of the constitutive β-glucosidase in *Trichoderma viride*. *J. Ferment. Bioeng.* **70**, 185–187 (1990)

91. Vallim M.A., Janse B.J.H., Gaskell J., Pizzirani-Kleiner A.A., Cullen D.: *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase and cellobiose dehydrogenase transcripts in wood. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1924–1928 (1998)
92. Vardavakis E.: Seasonal fluctuations of aerobic cellulolytic bacteria, and cellulase and respiratory activities in a soil profile under a forest. *Plant Soil*. **115**, 145–150 (1989)
93. Veal D.A., oraz Lynch J.M.: Associative cellulolysis and nitrogen fixation by co-cultures of *Trichoderma harzianum* and *Clostridium butyricum*: the effects of ammonium nitrogen on these processes. *J. Appl. Bacteriol.* **63**, 245–253 (1987)
94. Wang D.I.C., Avgerinos G.C., Biocic I., Wang S.D., Fang H.Y.: Ethanol from cellulosic biomass. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser.* **300**, 323–333 (1983)
95. Watanabe T., Sato T., Yoshioka S., Koshijima T., Kuwahara M.: Purification and properties of *Aspergillus niger* -glucosidase. *Eur. J. Biochem.* **209**, 651–659 (1992)
96. Weimer P.J. oraz. Zeikus J.G.: Fermentation of cellulose and cellobiose by *Clostridium thermocellum* in the absence and presence of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 289–297 (1977)
97. Wheals A.E., BassoL. C., Alvesand D.M.G., Amorim H.V.: Fuel ethanol after 25 years. *Trends in Biotechnol.* **17**, 482–487 (1999)
98. Wittrup K.D., Bailey J.E.: A single-cell assay of β-galactosidase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cytometry*, **9**, 394–404 (1988)
99. Wood T.M.: Fungal cellulases. *Biochem. Soc. Trans*. **20**, 46–53 (1992)
100. Wood T.M, Bhat K.M.: Methods for measuring cellulase activities. *Methods Enzymol.* **160**, 87–117 (1988)
101. Zverlov V.V., Velikodvorskaya G.A., Schwarz W.H., Kellermann J., Staudenbauer W.L.: Duplicated *Clostridium thermocellum* cellobiohydrolasegene encoding cellulosomal subunits S3 and S5. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 852–859 (1999)

POST. MIKROBIOL.,
2016, 55, 2, 147–156
http://www.pm.microbiology.pl

MIKROORGANIZMY W BIOAUGMENTACJI ZANIECZYSZCZONYCH ŚRODOWISK

Agnieszka Mrozik[1]

[1] Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach

Wpłynęło w lipcu 2015 r.
Zaakceptowano w styczniu 2016 r.

1. Wprowadzenie. 2. Mikroorganizmy w bioaugmentacji. 2.1. Pojedyncze szczepy. 2.2. Konsorcja mikroorganizmów. 2.3. Mikroorganizmy modyfikowane genetycznie. 3. Sposoby dostarczania mikroorganizmów do środowiska. 4. Czynniki ograniczające bioaugmentację. 5. Podsumowanie

Microorganisms in bioaugmentation of polluted environments

Abstract: Bioaugmentation is defined as a technique for improving the degradative capacity of contaminated soil and water by adding selected strains or consortia of microorganisms. In the treatment of environmental pollution by microorganisms, three approaches can be distinguished: autochthonous bioaugmentation, in which microorganisms isolated from contaminated site as an enriched culture are reinjected to the original environment; allochthonous bioaugmentation (bioenrichment), in which seeding material is isolated from another place and gene bioaugmentation, in which genetically engineered microorganisms equipped with genes encoding proteins related to some desired function are introduced into polluted site. In the selection of proper culture for biougmentation, the following features of microorganism should be taken into consideration: fast growth, ease of culivation, capacity to withstand high concentration of contaminants and the ability to survive in a wide range of environmental conditions. The enhancement of bioaugmentation may be also achieved by delivering microorganisms on various carriers or by the use of activated soil. The efficiency of bioaugmentation is determined by abiotic and biotic factors. The first include chemical structure of contaminants, their concentration and bioavailability as well as fluctuations or extremes in temperature, pH and nutrients level. Among biotic factors, the most important are the interactions between autochthonous and added microorganisms such a competition, predation and bacteriophages. Numerous studies have demonstrated that bioaugmentation is a promising technology in remediation of soil, water and sediments polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons, nitrophenols, polychlorinated biphenyls, chlorophenols, crude oil, diesel oil and several pesticides.

Introduction. 2. Microorganisms in bioaugmentation. 2.1. Single strains. 2.2. Consortia of microorganisms. 2.3. Genetically engineered microorganisms. 3. Methods for delivering microorganisms into environment. 4. Factors limiting bioaugmentation. 5. Summary

Słowa kluczowe: bioaugmentacja, mikroorganizmy, zanieczyszczenia
Key words: bioaugmentation, microorganisms, pollutants

1. Wprowadzenie

Wzrost zanieczyszczenia środowiska związkami ropopochodnymi, polichlorowanymi bifenylami (PCB), wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi (WWA), nitro- i chlorofenolami, pestycydami, farmaceutykami oraz metalami ciężkimi stwarza konieczność stosowania skutecznych metod ich detoksykacji i/lub eliminacji. Aby ograniczyć ilość związków toksycznych w różnych ekosystemach należy wdrażać przyjazne środowisku technologie, tańsze od metod fizykochemicznych i bardziej efektywne w przywracaniu środowiska do stanu właściwego.

Obiecującą technologią wspomagającą usuwanie zanieczyszczeń z gleby, wody, osadów dennych czy ścieków jest bioaugmentacja. Polega ona na wprowadzeniu do skażonych miejsc wyselekcjonowanych mikroorganizmów w celu wzmocnienia naturalnej aktywności degradacyjnej rodzimej mikroflory [19, 30, 45, 68]. Stosowanie bioaugmentacji zaleca się wtedy, gdy liczba mikroorganizmów autochtonicznych degradujących określone zanieczyszczenie jest zbyt mała do ich eliminacji oraz w miejscach skażonych mieszaninami różnych toksycznych związków, wymagających dłuższego czasu aklimatyzacji i adaptacji inokulantów do rozkładu poszczególnych zanieczyszczeń [22]. Powinno się ją również stosować na obszarach, na których koszty usuwania zanieczyszczeń metodami fizykochemicznymi znacznie przewyższają koszty bioaugmentacji. Mikroorganizmy można wykorzystywać w charakterze inokulum zarówno w miejscu skażenia (*in situ*), jak i w specjalnie wyznaczonym do tego celu miejscu (*ex situ*). Dodatkowo bioaugmentację coraz częściej łączy się z innymi metodami bioremediacji inżynieryjnej w celu intensyfikacji rozkładu zanieczyszczeń, na przykład z biostymulacją czy biowentylacją [1, 28, 48, 51, 66].

Bioaugmentacja nie jest nową metodą. Od wielu lat jest praktykowana w rolnictwie, leśnictwie i oczyszczaniu ścieków. Pierwsze próby inokulacji gleby przez zasiedlające korzenie roślin strączkowych bakterie z rodzaju

* Autor korespondencyjny: Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach, ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice; tel. 32 2009555; e-mail: agnieszka.mrozik@us.edu.pl

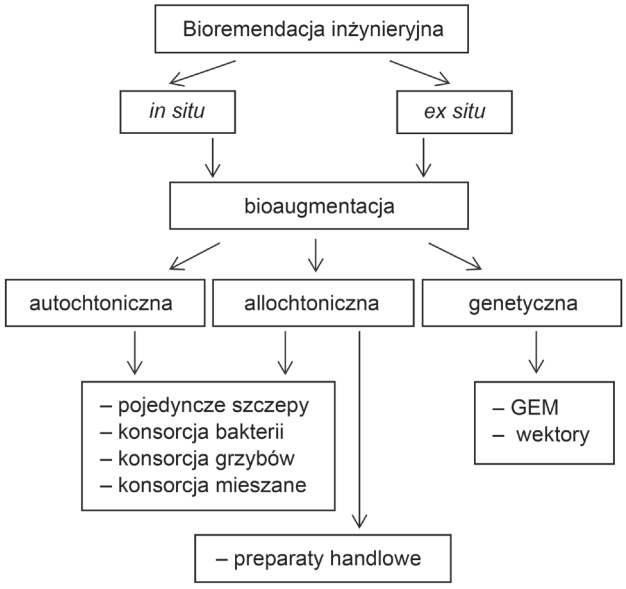
Rhizobium przeprowadzono w XIX wieku. W późniejszym czasie podejmowano również próby bioaugmentacji gleby z użyciem bakterii *Azotobacter* i *Azospirillum* spp. w celu zwiększenia plonów roślin uprawnych [43]. Innym sposobem intensyfikacji zbiorów było także zaszczepianie nasion roślin uprawnych mikroorganizmami promującymi wzrost roślin (plant-growth--promoting microorganisms) lub mikroorganizmami chroniącymi rośliny przed atakiem patogenów (plant--protecting microorganisms) [6, 27]. Pierwszą natomiast zakończoną sukcesem eksperymentalną bioaugmentację wód podziemnych skażonych trichloroetylenem z użyciem bakterii *Ralstonia eutropha* KT-2 przeprowadzili w 2000 roku w Japonii Nakamura i wsp. [47].

2. Mikroorganizmy w bioaugmentacji

Mikroorganizmy w porównaniu z innymi organizmami charakteryzują się wyjątkową zdolnością adaptacji do zmieniających się warunków środowiskowych i wykorzystywania związków toksycznych jako substratów energetycznych i budulcowych. Dzięki tym zdolnościom zaangażowane są w procesy transformacji i/lub eliminacji tych związków z zanieczyszczonych środowisk.

Dobór odpowiednich szczepów do bioaugmentacji nie jest zadaniem łatwym. Praktyczne ich wykorzystanie poprzedza żmudny etap ich izolacji, identyfikacji i oceny aktywności degradacyjnej komórek w stosunku do konkretnego zanieczyszczenia. Idealne mikroorganizmy do bioaugmentacji powinny charakteryzować się niezbyt długim czasem generacji, odpowiednią szybkością działania, mobilnością, zdolnością do adhezji i chemotaksji dodatniej w kierunku atraktanta, odpornością na zmiany czynników środowiskowych oraz niewielkim kosztem ich uzyskania [45, 60, 65].

Znanych jest kilka sposobów selekcji mikroorganizmów do bioaugmentacji. Jednym z nich jest izolacja mikroorganizmów o pożądanych właściwościach z zanieczyszczonego środowiska, namnożenie w warunkach laboratoryjnych i ponowne wprowadzenie do miejsca, z którego naturalnie pochodziły. Zabieg ten nosi nazwę bioaugmentacji autochtonicznej lub reinokulacji mikroorganizmami autochtonicznymi (autochthonous bioaugmentation; re-inoculation) [21, 25, 39]. Można również wprowadzać wyselekcjonowane mikroorganizmy do miejsc, w których związek stanowiący skażenie ma podobne właściwości chemiczne do tego, jaki zanieczyszczał pierwotne źródło ich pochodzenia. Metoda ta znana jest pod nazwą bioaugmentacji allochtonicznej lub biowzbogacenia (allochthonous bioaugmentation; bioenrichment) [3, 55]. Kolejną strategią jest introdukcja do środowiska mikroorganizmów zmodyfikowanych genetycznie (GEM) o wzmożonej



Rys. 1. Rodzaje bioaugmentacji jako jednej z metod bioremediacji inżynieryjnej (opracowanie własne)

aktywności degradacyjnej, czy wprowadzanie wektorów niosących geny kodujące enzymy szlaków katabolicznych różnych związków, co nosi nazwę bioaugmentacji genetycznej (gene bioaugmentation) [16, 25, 32, 50]. Istnieje także możliwość stosowania gotowych preparatów handlowych (np. B8, B10 i Devoroil), zawierających mikroorganizmy i/lub biosurfaktanty [23, 58]. Opisane rodzaje bioaugmentacji ilustruje Rys. 1.

W bioaugmentacji stosuje się głównie bakterie Gram-ujemne z rodzajów: *Pseudomonas* [29, 69], *Sphingobium* [12], *Novosphingobium* [11], *Burkholderia* [36], *Alcaligenes* [26] czy *Achromobacter* [54]. Poza nimi coraz powszechniej stosowane są bakterie Gram--dodatnie, reprezentowane przez rodzaje: *Rhodococcus* [32, 72], *Bacillus* [14] czy *Paracoccus* [64]. Można również introdukować do skażonych środowisk grzyby mikroskopowe z rodzajów: *Achremonium* [57], *Aspergillus* [15], *Penicillium* [40] i *Mucor* [62]. Żaden z tych mikroorganizmów nie jest uniwersalnym dla potrzeb bioaugmentacji, choć wiele z nich przejawia różnorodne cechy metaboliczne i jest zdolnych do degradacji szeregu różnych zanieczyszczeń.

2.1. Pojedyncze szczepy

W ciągu ostatnich kilku lat przeprowadzono wiele badań dotyczących intensyfikacji rozkładu WWA, PCB, BTEX, pestycydów, herbicydów, związków ropopochodnych i składników oleju napędowego z wykorzystaniem pojedynczych szczepów bakterii (Tabela I). Teng i wsp. [64] po inokulacji gleby silnie skażonej WWA szczepem *Paracoccus* sp. HPD-2 uzyskali po 28 dniach eksperymentu spadek ogólnej zawartości

Tabela I
Pojedyncze szczepy bakterii i grzybów w bioaugmentacji skażonych środowisk

Mikroorganizm	Zanieczyszczenie	Lokalizacja	Źródło
Pseudomonas sp. WBC-3	paration	gleba, Chiny	[69]
Sphingobium sp. 22B	fenantren	gleba, Argentyna	[39]
Burkholderia xenovorans LB400	PCB	gleba, USA	[36]
Bacillus sp. PS11	fenol	gleba, Serbia	[14]
Amycolatopsis tucumanensis	Cu	gleba, Argentyna	[2]
Paracoccus sp. HPD-2	WWA	gleba, Chiny	[64]
Novosphingobium DY4	2,4-D	gleba, Chiny	[11]
Pseudomonas sp. JS150	fenol	gleba, Polska	[46]
Aspergillus niger ARIFCC 1053	endosulfan	gleba, Turcja	[7]
Lentinus crinitus CCIBt2611	PCP	gleba, Brazylia	[4]
Phanerochaete velutina FBCC941	WWA	gleba, Finlandia	[70]
Pseudomonas monteilli SB3078	BTEX	osad czynny, Dania	[17]
Rhodococcus sp. YYL	tetrahydrofuran	osad czynny, Chiny	[72]
Sphingomonas sp. TrD23	triklosan	osad czynny, USA	[74]
Sphingobium sp. BiD32	bisfenol A	osad czynny, USA	[74]
Alcanivorax borkumensis SK2^T	ropa naftowa	woda morska, Włochy	[28]

Objaśnienia: PCB – polichlorowane bifenyle; WWA – wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne; 2,4-D – kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy; PCP – pentachlorofenol; BTEX – mieszanina benzenu, toluenu, etylobenzenu i ksylenów

wszystkich WWA o 23,2% w stosunku do ich stężenia wyjściowego, w tym związków 3-, 4- i 5-pierścieniowych odpowiednio o 35,1; 20,7 i 24,3%. W innych badaniach Dai i wsp. [11] bioaugmentowali glebę skażoną herbicydem – kwasem 2,4-dichlorofenoksyoctowym (2,4-D) z użyciem nowo odkrytego szczepu bakterii *Novosphingobium* DY-4. Po inokulacji gleby tymi bakteriami stwierdzili 95% ubytek 2,4-D aplikowanego do gleby w stężeniu 200 mg/kg gleby w ciągu 5–7 dni. Zakończoną sukcesem bioaugmentację gleby skażonej pestycydem parationem metylu z użyciem szczepu *Pseudomonas* sp. WBC3 przeprowadzili Wang i wsp. [69]. W ciągu 15 dni uzyskali całkowity rozkład tego związku w stężeniu 0,536 mg/s.m gleby w glebie inokulowanej bakteriami, podczas gdy w glebie kontrolnej rozkład zachodził wolniej i towarzyszył mu systematyczny wzrost stężenia *p*-nitrofenolu, głównego intermediatu pośredniego rozkładu parationu. Pomyślnie zakończoną bioaugmentację gleby skażonej pentachlorofenolem (PCP) w stężeniu 100 μg/g gleby z użyciem szczepu *Sphingobium chlorophenolicum* przeprowadzili Dams i wsp. [12]. Wykazali, że w glebie bioaugmentowanej tymi bakteriami w ciągu 2 tygodni ubyło około 80% wprowadzonej dawki PCP, podczas gdy w glebie niebioaugmentowanej – około 40%. Bioaugmentację gleby skażonej fenantrenem (2 g/kg s.m. gleby) z użyciem autochtonicznego, wysoce odpornego na suszę szczepu *Sphingobium* sp. 22B oraz tej samej gleby dodatkowo poddanej biostymulacji przeprowadzili Madueno i wsp. [39]. Z badań tych wynika, że rozkład fenantrenu w glebie inokulowanej bakteriami i poddanej biostymulacji (BB) oraz w glebie biostymulowanej, niebioaugmentowanej (BN) zależał od zawartości w nich wody. Przy wilgotności gleby 10% w ciągu 150 dni nie obserwowano rozkładu tego związku w obu glebach, natomiast po jej zwiększeniu w dniu 150 z 10 do 15% w glebie BB w ciągu 11 dni ubyło około 50% wprowadzonej dawki fenantrenu, a w dniu 200–95%. W glebie BN w tym samym czasie ubyło 5 i 95% wyjściowego stężenia tego związku. Wyniki te wskazują, że skuteczniejszym od biostymulacji rozwiązaniem w eliminacji fenantrenu z gleby była bioaugmentacja połączona z biostymulacją.

2.2. Konsorcja mikroorganizmów

Inną strategią bioaugmentacji jest wprowadzanie do zanieczyszczonych środowisk mieszanych konsorcjów mikroorganizmów (Tabela II). Według Heinaru i wsp. [29] konsorcja efektywniej degradują zanieczyszczenia, gdyż zdolności degradacyjne poszczególnych szczepów mogą się uzupełniać. Oznacza to, że produkty pośrednie rozkładu poszczególnych związków przez jedne szczepy mogą być dalej metabolizowane przez inne szczepy. Chi i wsp. [9] wprowadzili konsorcjum trzech szczepów: *Pseudomonas* sp. WBC-3 rozkładającego *p*-nitrofenol, *Cupriavidus necator* JMP134

Tabela II
Konsorcja mikroorganizmów w bioaugmentacji skażonych środowisk

Konsorcjum	Zanieczyszczenie	Lokalizacja	Źródło
Cupriavidus necator JMP134, *Pseudomonas* sp. WBC-3 i *Alcaligenes* sp. NyZ215	*p*-nitrofenol, *m*-nitrofenol *o*-nitrofenol	gleba, Chiny	[9]
B. subtilis, *P. fluorescens*, *Streptococcus faecalis* i *Candida tropicalis*	ropa naftowa	gleba, Chiny	[51]
Aeromonas hydrophila, Alcaligenes xylosoxidans, Gordonia sp., *P. fluorescens, P. putida, Rhodococcus equi, Stenotrophomonas maltophilia* i *Xantomonas* sp.	olej napędowy	gleba, Polska	[63]
P. aeruginosa, Achromobacter xylosoxidans i *Ochrobactrum intermedium*	diesel biodisel	gleba, Brazylia	[10]
Rhodococcus ruber P25 i *Microbacterium* sp. B51	PCB	gleba, Rosja	[18]
Konsorcjum ASP	fenantren	gleba, Indie	[49]
Rhizopus sp., *Penicillium funiculosum* i *Aspergillus sydowii*	ropa naftowa	gleba, Meksyk	[40]
Bacillus B1F, B5A i B3G, *Chromobacterium* sp. 4015 *Enterobacter aglomerans* B1A, *Achremonium* sp., *Aspergillus* sp. i *Verticillum* sp.	WWA	gleba, Brazylia	[57]
B. subtilis DM-4 i *P. aeruginosa* M i NM	ropa naftowa	gleba, Indie	[13]
P. fluorescens T1, *P. diminuta* T2, *P. fluorescens* T3, *Burkholderia pseudomalleii* T4, *P. putida* T5, *Flavobacterium* sp. T6, *Vibrio alginolyticus* T7, *P. aeruginosa* T8, *P. stutzeri* T9 i *P. fluorescens* T10	HCH	gleba, Indie	[8]
Konsorcjum ENEA-LAMOSS (12 szczepów allochtonicznych)	olej napędowy, Pb, Zn	gleba, Włochy	[61]
Rhodococcus sp. YYL, *B. cereus* MLY1 i *B. aquimaris* MLY2	tetrahydrofuran	osad czynny, Chiny	[72]
A. borkumensis SK2^T i *Thalassolituus oleivorans* MIL-1^T	ropa naftowa	woda morska, Włochy	[28]

Objaśnienia: PCB – polichlorowane bifenyle; WWA – wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne; HCH – heksachlorocykloheksan

degradującego *m*-nitrofenol i *Alcaligenes* sp. NyZ215 metabolizującego *o*-nitrofenol do gleby skażonej mieszaniną wszystkich izomerów nitrofenolu w stężeniu 40 μg/g gleby każdy. Uzyskali w ten sposób całkowity ich rozkład w ciągu 8 dni, podczas gdy w glebie kontrolnej w 30 dniu oznaczyli 29% wyjściowego stężenia każdego z tych izomerów. W innych badaniach Szulc i wsp. [63] przeprowadzili w warunkach polowych bioaugmentację gleby skażonej olejem napędowym w stężeniu 8500 mg/kg gleby z użyciem konsorcjum bakterii: *Aeromonas hydrophila*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Gordonia* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *Rhodococcus equi*, *Stenotrophomonas maltophilia* oraz *Xantomonas fluorescens*. Po 365 dniach eksperymentu stwierdzili 95% ubytek zanieczyszczeń w glebie inokulowanej bakteriami, podczas gdy w glebie nieinokulowanej ubyło w tym czasie około 50%. Dodatkowo wykazali w osobnym eksperymencie, że dodatek do gleby bioaugmentowanej biosurfaktantów (ramnolipidów) nie miał znaczącego wpływu na tempo rozkładu oleju napędowego. Synergistyczny efekt 3 gatunków bakterii: *Bacillus subtilis*, *P. fluorescens* i *Streptococcus faecalis* oraz grzyba *Candida tropicalis* w degradacji 16 różnych WWA (składników ropy naftowej) w glebie poddanej bioaugmentacji i biostymulacji obserwowali Qiao i wsp. [51]. Biostymulacja polegała na dodaniu do skażonej gleby komercyjnego nawozu (NPK), węgla brunatnego w postaci popiołu lub organicznych ścieków przemysłowych (NovoGro) oraz wszystkich tych materiałów równocześnie. Najwyższą wydajność rozkładu 2-, 3- i 4- oraz 5- i 6-pierścienowych WWA, wynoszącą odpowiednio 35, 70 i 45%, uzyskali w glebie poddanej bioaugmentacji oraz biostymulacji z użyciem wszystkich 3 preparatów. Znane są również przykłady inokulacji osadów czynnych wybranymi szczepami bakterii. Yao i wsp. [72] introdukowali szczepy *Rhodococcus* sp. YYL, *Bacillus cereus* MLY1 i *B. aquimaris* MLY2 do osadu czynnego zanieczyszczonego syntetycznymi ściekami zawierającymi tetrahydrofuran (THF) w stężeniu 20 mM. Stwierdzili, że szczep YYL dominował w osadzie i kolonizował powierzchnię kłaczków jedynie w obecności dwóch pozostałych szczepów, natomiast gdy introdukowano go indywidualnie nie wykazywał takiej zdolności. Wynikiem kolonizacji i dominacji tego szczepu była efektywna eliminacja zastosowanej dawki THF (95%) w ciągu 20 dni. Z kolei Hassanshahian i wsp. [28] przeprowadzili bioaugmentację i biostymulację naturalnej wody morskiej zanieczyszczonej ropą naftową (1000 ppm) z użyciem odpowiednio 2-składnikowego konsorcjum bakterii *Alcanivorax borkumensis* SK2^T i *Thalassolituus oleivorans* MIL-1^T oraz składników nieorganicznych (KH_2PO_4, NH_4Cl i $NaNO_3$). Z badań tych wynika, że biostymulacja okazała się skuteczniejszym zabiegiem w redukcji zanieczyszczeń niż bio-

Tabela III
Genetycznie modyfikowane mikroorganizmy w bioaugmentacji skażonych środowisk

Mikroorganizmy/wektory	Wektory/geny kataboliczne	Zanieczyszczenia	Lokalizacja	Źródło
E. coli HB101 (pJP4)	plazmid pJP4	2,4-D	gleba, Japonia	[33]
P. putida BBC443	plazmid TOL, *gfp* mut3b	toluen	gleba, USA	[32]
P. putida PAW 340/pDH5	plazmid pDH5	4-CBA	gleba, Włochy	[41]
P. fluorescens MP	megaplazmid pJS1	2,4-DNT	gleba, Argentyna	[44]
P. fluorescens RE	geny *dntABDEG*	2,4-DNT	gleba, Argentyna	[44]
P. putida KT2442	plazmid pNF142::Tn*Mod*-OTc	naftalen	gleba, Rosja	[20]
B. xenovorans LB400 (*ohb*)	*ohb* operon w wektorze pRT1	Aroclor 1242	osad denny, USA	[53]
pDOC	plazmid pDOC, gfp^+	chlorpyrifos	gleba, Chiny	[73]

Objaśnienia: 2,4-D – kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy; 4-CBA – kwas 4-chlorobenzoesowy; 2,4-DNT – 2,4-dinitrotoluen

augmentacja. W glebie poddanej biostymulacji rozkład węglowodorów ropopochodnych nastąpił w 80%, a w glebie bioaugmentowanej w 70%. Dla porównania inokulacja wody pojedynczym szczepem *A. borkumensis* $SK2^T$ okazała się najskuteczniejszym sposobem eliminacji zanieczyszczeń (90%).

2.3. Mikroorganizmy modyfikowane genetycznie

W bioaugmentacji zanieczyszczonych środowisk można również stosować mikroorganizmy modyfikowane genetycznie (GEM) o wzmożonej aktywności degradacyjnej (Tabela III). Takie szczepy pozyskuje się drogą mutagenezy losowej i indukowanej oraz konstruuje metodami inżynierii genetycznej. Lipthay i wsp. [37] inokulowali glebę szczepem *E. coli* HB101, będącej gospodarzem plazmidu pRO103, zawierającego gen dioksygenazy kwasu 2,4-D-dichlorofenoksyoctowgo/2-oksoglutarowego. W wyniku transferu tego plazmidu do szczepu *R. eutropha* uzyskali transkoniuganty *R. eutropha* (pRO103), które lepiej przeżywały w glebie i przeprowadzały szybciej rozkład wprowadzonego do niej kwasu 2,4-D niż komórki bezplazmidowe. Wydajniejszą mineralizację kwasu 4-chlorobenzoesowego (4-CBA) w glebie inokulowanej dzikim szczepem *Arthrobacter* sp. FG1 i modyfikowanym genetycznie *P. putida* PaW340 (pDH5) obserwowali także Massa i wsp. [41]. Uzyskane rekombinanty *Arthrobacter* sp. FG1 (pDH5) z genem dehalogenazy efektywniej rozkładały 4-PCB niż w glebie inokulowanej pre-adaptowanym, dzikim szczepem. W innych badaniach Inoue i wsp. [33] wprowadzili do gleby skażonej 2,4-D szczepy *E. coli* z plazmidem pJP4 i *Pseudomonas* sp. KT2440. Plazmid ten zawierał geny kodujące enzymy rozkładu 2,4-D do 2-chloromaleilooctanu oraz geny oporności na rtęć. Mimo, że liczebność inokulantów drastycznie malała po wprowadzeniu do gleby, stwierdzono wzrost tempa rozkładu 2,4-D, będący wynikiem transferu plazmidu do szczepów naturalnie zasiedlających glebę. Wśród biorców plazmidu znalazły się szczepy autochtoniczne z rodzaju *Burkholderia* oraz allochtoniczny szczep *Pseudomonas* sp. KT2440. Podobne zjawisko w wyniku bioaugmentacji sterylnej gleby skażonej toluenem (4 mg/l) z użyciem szczepu *P. putida* BBC443 niosącego plazmid TOL*gfp*mut3b oraz 4 dzikich szczepów bakterii *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Seratia marcescens* i *P. fluorescens* jako potencjalnych biorców tego plazmidu obserwowali Ikuma i Gunsch [32]. Pomimo, że szczep dawcy zamierał po kilku dniach po introdukcji do gleby, tempo rozkładu toluenu systematycznie się zwiększało i w 24 dniu wynosiło 0,079 mg/g/h. Było to wynikiem wysokiej efektywności transferu i ekspresji genów odpowiedzialnych za rozkład toluenu w komórkach biorców i wzrostu ich liczebności niezależnie od przeżywalności dawcy. Szczepy modyfikowane genetycznie znalazły także zastosowanie w utlenianiu As(III) do As(V) w wodach kopalnianych [16]. Arsen (III) jest bardziej trujący od As(V), trudniejszy do usunięcia z wody oraz bardziej rozpowszechniony. Szczepy wyposażone w plazmid pA101 oraz równocześnie w dwa plazmidy pA101 i pARS były zdolne do wzrostu w tych wodach i całkowicie eliminowały z nich As(III) (0,25 mg/l) w ciągu 24 godzin.

Innym rodzajem bioaugmentacji genetycznej ograniczającej trudności związane ze słabą przeżywalnością inokulantów i niską ich aktywnością jest bezpośrednie wprowadzanie do zanieczyszczonego środowiska wektorów. Strategię taką zastosowali Zhang i wsp. [73], którzy do gleby skażonej chlorpyrifosem (200 mg/kg s.m gleby) wprowadzili plazmid pDOC, pochodzący z bakterii *Bacillus laterosporus*, niosący geny odpowiedzialne za rozkład tego insektycydu. Wynikiem tego był transfer plazmidu do szczepów rodzimych, reprezentujących rodzaje *Pseudomonas* i *Staphylococcus,* które uzyskały zdolność rozkładu chlorpyrifosu w ciągu 5 dni od momentu jego aplikacji do gleby. Częstotliwość transferu plazmidu była najwyższa

w temperaturze 30°C i przy pojemności wodnej gleby 60%. Jednocześnie stwierdzono, że liczebność potencjalnych biorców plazmidu pDOC systematycznie się zwiększała z 29 jtk/g gleby w dniu rozpoczęcia eksperymentu do 130 jtk/g gleby w dniu 14.

Użycie GEM w oczyszczaniu zanieczyszczonych środowisk budzi wielki entuzjazm naukowców, jednakże ze względu na obawy i wątpliwości związane z wprowadzaniem takich mikroorganizmów do gleby czy wód badania w tym zakresie nie są prowadzone na szeroką skalę.

3. Sposoby dostarczania mikroorganizmów do środowiska

Istnieje kilka sposobów dostarczania mikroorganizmów do zanieczyszczonych środowisk. Do gleby najczęściej wprowadza się je poprzez równomierne rozpylanie zawiesiny komórek na powierzchni skażonego obszaru lub dostarcza bezpośrednio w głąb gleby poprzez systemy otworów lub odwierty. Żadna z tych metod nie gwarantuje jednak właściwego rozmieszczenia i przeżywalności introdukowanych szczepów. Rozpylanie zawiesiny na powierzchni gleby ogranicza dostęp mikroorganizmów do jej głębszych warstw, a dostarczanie poprzez otwory czy odwierty nie zapewnia równomiernego rozmieszczenia komórek i może prowadzić do zablokowania przez mikroorganizmy miąższości warstwy wodonośnej. Do wód podziemnych można wprowadzać mikroorganizmy poprzez bezpośrednie iniekcje przez studnie pionowe, szyby czy dreny, ale nie są to również metody w pełni efektywne. Skuteczniejszym sposobem dostarczania mikroorganizmów do gleby czy wód wydaje się użycie komórek immobilizowanych w/na różnych nośnikach. Unieruchamianie komórek ma wiele zalet. Przedłuża czas ich życia w porównaniu do wolnożyjących komórek, zwiększa ich stabilność oraz ogranicza wpływ czynników zewnętrznych [25, 30]. Kuyukina i wsp. [34] wykorzystali komórki *Rhodococcus erytropholis* IEGM 275 i *R. ruber* IEGM 231 unieruchomione w granulach kriożelu alkoholu poliwinylowego do bioaugmentacji gleby skażonej ropą naftową (50 g/kg gleby). Stwierdzili, że w glebie z dodatkiem immobilizowanych bakterii w ciągu 14 miesięcy ubyło około 5% więcej zanieczyszczeń niż w glebie z dodatkiem zawiesiny wolnych komórek i o około 27% więcej niż w glebie kontrolnej, nieinokulowanej bakteriami. Jednocześnie wykazali, że aktywność oddechowa gleby z dodatkiem immobilizowanych komórek oraz ich przeżywalność były wyższe niż w glebie z wolnymi komórkami oraz w glebie kontrolnej. W innych badaniach Xin i wsp. [71] porównywali efekt bioaugmentacji wód podziemnych skażonych BTEX (100 mg/l) z użyciem immobilizowanego w alkoholu poliwinylowym z dodatkiem alginianu sodu szczepu *Mycobacterium* sp. CHXY119 oraz jego mieszaniny z *Pseudomonas* sp. YATO411. Wykazali, że w wodzie z dodatkiem konsorcjum obu szczepów degradacja wszystkich składników BTEX zachodziła w 100% i w krótszym czasie niż w wodzie inokulowanej pojedynczym szczepem. Bioaugmentację wody morskiej zanieczyszczonej olejem napędowym z użyciem 2-składnikowego konsorcjum bakterii: *Rhodococcus pyridinivorans* CC-HCCH11, *Gordonia alcanivorans* CC-JG39 i *Alcaligenes piechaudii* CC-ESB2 (w różnych kombinacjach), unieruchomionych w kulkach alginianu wapnia oraz wolnych komórek przeprowadzili Liu i wsp. [38]. Najwyższą wydajność eliminacji zanieczyszczeń (78%) uzyskali w wodzie z dodatkiem immobilizowanego szczepu CC-HCCH11 i CC-JG39 w stosunku 5:1. Dla porównania wydajność rozkładu oleju w wodzie z wolnymi bakteriami w identycznym stosunku wynosiła około 50%. Shi i wsp. [56] badali zdolność degradacji karbazolu, dibenzo(f)fenolu oraz dibenzofuranu przez szczep *Arthrobacter* sp. W1 immobilizowany w różnych nośnikach: agarze, κ-karagenie oraz gumie gellan i inokulowany do ścieków koksowniczych. Z badań tych wynika, że najwyższą efektywność eliminacji tych związków (90%) uzyskano w ciągu 4 godzin z zastosowaniem bakterii unieruchomionych z użyciem gumy gellan. W tym samym czasie w ściekach z dodatkiem komórek immobilizowanych w agarze i κ-karagenie ubytek wyjściowego stężenia zanieczyszczeń mieścił się w zakresie 25–50%. Bioaugmentacja gleby czy wód z wykorzystaniem immobilizowanych mikroorganizmów o wysokim potencjale degradacji konkretnego zanieczyszczenia nie zawsze odnosi jednak oczekiwany skutek. Na przykład Maqbool i wsp. [42] nie obserwowali pozytywnego wpływu bioaugmentacji ryzosfery *Sesbania cannabina* z użyciem konsorcjum immobilizowanych bakterii *Microbacterium foliorum*, *G. alkanivorans* i *Mesorhizobium* na rozkład węglowodorów ropy naftowej. W tym przypadku biodegradacja ryzosferyczna zanieczyszczeń z udziałem allochtonicznych mikroorganizmów okazała się skuteczniejsza od bioaugmentacji gleby z użyciem immobilizownych bakterii. Przykłady mikroorganizmów immobilizowanych w/na różnych nośnikach w bioaugmentacji różnych środowisk ilustruje Tabela IV.

Innym sposobem dostarczania do gleby mikroorganizmów o wysokim potencjale degradacji konkretnych zanieczyszczeń jest mieszanie jej z tzw. „aktywną glebą", zawierającą populacje eksponowane przed długi okres czasu na obecność określonych związków i zaadaptowane do ich rozkładu [25]. Taki sposób wspomagania rozkładu PCP w glebie, w której rozkład tego związku nie zachodził zastosowali Barbeau i wsp. [5]. Po zmieszaniu tej gleby z „aktywną glebą", zasiedlaną przez mikroorganizmy rozkładające PCP, w ciągu 130 dni nastąpił rozkład tego związku w 98%.

Tabela IV
Mikroorganizmy immobilizowane w bioaugmentacji skażonych środowisk

Mikroorganizmy	Nośnik	Zanieczyszczenie	Lokalizacja	Źródło
Rhodococcus pyridinivorans CC-HCCH11, *Gordonia alcanivorans* CC-JG39 i *Alcaligenes piechaudii* CC-ESB2	alginian wapnia	olej napędowy	woda morska, Meksyk	[32]
P. mendocina, Planomicrobium alkanoclasticum, Bacillus sp., *Arthrobacter pascens* i *A. nitrogujacolicus*	muszle małży, brykiety z włókna kokosowego, muszle + agar	olej napędowy	woda morska, Australia	[59]
Rhodococcus corynebacterioides	chityna, chitozan	ropa naftowa	woda morska, Argentyna	[24]
Mycobacterium sp. CHXY119 i *Pseudomonas* sp. YATO411	alginian sodu, alkohol poliwinylowy	BTEX	wody gruntowe, USA	[71]
konsorcjum bakterii	zeolity, węgiel aktywny	ropa naftowa	gleba, Chiny	[35]
Rhodococcus erythropolis i *R. ruber*	kriożel alkoholu poliwinylowego	ropa naftowa	gleba, Rosja	[34]
Microbacterium foliorum, *G. alkanivorax* i *Messorhizobium* sp.	alginian sodu z dodatkiem ziemi okrzemkowej	ropa naftowa	gleba, Chiny	[42]
Sphingobium indicum B90A	proszek z kolby kukurydzy	HCH	gleba, Indie	[52]

Objaśnienia: BTEX – mieszanina benzenu, toluenu, etylobenzenu i ksylenów; HCH – heksachlorocykloheksan

4. Czynniki ograniczające bioaugmentację

Jednym z głównych czynników ograniczających pomyślny przebieg bioaugmentacji jest słaba przeżywalność wprowadzonych do środowiska mikroorganizmów. Ich liczebność zazwyczaj drastycznie maleje w krótkim czasie po aplikacji do skażonych miejsc. Przyczyną śmierci inokulantów może być brak zdolności konkurowania z rodzimą mikroflorą o związki odżywcze, produkcja antybiotyków czy bakteriocyn przez autochtoniczne mikroorganizmy, obecność inhibitorów, drapieżnictwo czy infekcja bakteriofagami [25]. Sposobami zwiększania przeżywalności introdukowanych mikroorganizmów jest wprowadzanie dużej ich biomasy w zakresie 10^6–10^9/g lub l [11, 28, 51, 69], kilkukrotna aplikacja mikroorganizmów (succesive bioaugmentation) w zależności od tempa rozkładu toksycznych związków [10], biostymulacja poprzez dostarczenie dodatkowych składników organicznych i nieorganicznych [48], czy unieruchamianie komórek w różnych nośnikach [34]. Do monitorowania przeżywalności i aktywności introdukowanych do środowiska mikroorganizmów służą zaawansowane metody genetyczne [17].

Niemniej ważne od doboru odpowiednich szczepów do inokulacji, sposobu ich dostarczenia do środowiska oraz wzajemnych interakcji z rodzimą mikroflorą są czynniki abiotyczne, jak: temperatura, pH, dostęp tlenu, zawartość materii organicznej, poziom substratów odżywczych i kofaktorów czy wilgotność. Z licznych prac wynika, że optymalna temperatura dla wzrostu i rozkładu wielu związków przez mikroorganizmy kształtuje się w zakresie 15–45°C. Patel i wsp. [49] w badaniach wpływu temperatury w zakresie 30–50°C na rozkład fenantrenu w bioaugmentowanym osadzie z użyciem konsorcjum ASP wykazali, że najefektywniej rozkład tego związku (80%) przebiegał w temperaturze 37°C, a najmniej wydajnie (10%) w temperaturze 45°C. Dodatkowo stwierdzili, że optymalne pH dla rozkładu fenantrenu wynosiło 8,0. W innych badaniach Hong i wsp. [31] ustalili, że rozkład fenitrotionu w glebie inokulowanej szczepem *Burkholderia* sp. FDS-1 zachodził najintensywniej w temperaturze 30°C i pH 7,5. Innym czynnikiem limitującym rozkład zanieczyszczeń w glebie jest zawartość w niej wody. Madueno i wsp. [39] wykazali, że tempo rozkładu fenantrenu w glebie o pojemności wodnej (WHC) równej 20%, poddanej bioaugmentacji autochtonicznej, drastycznie w niej zmalało w porównaniu do tempa rozkładu tego związku w glebie o WHC – 15% . Podobnie Viňas i wsp. [67] obserwowali znaczniej wydajniejszą biodegradację krezoli w glebie o WHC na poziomie 40–60% niż w glebie o WHC – 20%. Nie bez znaczenia w skutecznej eliminacji toksycznych związków z gleby jest także zawartość w niej materii organicznej. Zazwyczaj proces biodegradacji zanieczyszczeń zachodzi szybciej w glebach o większej zawartości materii organicznej, co może być związanie ze zmniejszeniem ich toksycznego działania na komórki mikroorganizmów w wyniku wiązania się z frakcjami humusowymi oraz mineralnymi gleby [26]. Kompleksowe badania losów wprowadzonych do środowiska inokulantów oraz wzajemnych interakcji między introdukowanymi i rodzimymi mikroorganizmami z jednoczesnym uwzględnieniem zmieniających się warunków środowiskowych jest niezwykle trudne, ale niezbędne do pomyślnego przebiegu bioaugmentacji.

5. Podsumowanie

Z dokonanego przeglądu literatury wynika, że bioaugmentacja jest obiecującą technologią w eliminacji szkodliwych związków z różnych środowisk. Jej zaletami są łatwość przeprowadzenia, stosunkowo niskie koszty oraz duża skuteczność, natomiast ograniczeniami – słaba przeżywalność inokulantów lub zanik ich aktywności degradacyjnej po introdukcji do środowiska oraz obniżenie tempa rozkładu substancji zanieczyszczającej przez wzrost toksyczności produktów pośrednich biodegradacji. Duże nadzieje wiąże się z rozwojem nowych strategii selekcji mikroorganizmów i zachowania ich aktywności w kontakcie z mikroflorą autochtoniczną, opracowaniem innych metod dostarczania komórek do skażonych środowisk (np. z użyciem nanomateriałów) oraz zastosowaniem nowoczesnych technik molekularnych do monitorowania liczebności i aktywności inokulantów (np. qPCR, (RT)-qPCR, SIP czy eGFP-tagging). Konieczne są również dokładne badania interakcji między inokulowanymi szczepami a zespołami mikroorganizmów rodzimych na poziomie komórka-komórka w rzeczywistych warunkach oczyszczania konkretnych środowisk, gdyż wiedza w tym zakresie jest ciągle ograniczona.

Piśmiennictwo

1. Agarry S., Latinwo G.K.: Biodegradation of diesel oil in soil and its enhancement by application of bioventing and amendment with brewery waste effluents as biostimulation-bioaugmentation agents. *J. Ecol. Eng*. **16**, 82–91 (2015)
2. Albarracín V.H., Amoroso M.J., Abate C.M.: Bioaugmentation of copper polluted soil microcosms with *Amycolatopsis tucumanensis* to diminish phytoavailable copper for *Zea mays* plants. *Chemosphere*, **79**, 131–137 (2010)
3. Alvarez V.M., Marques J.M., Korenblum E., Seldin L.: Comparative bioremediation of crude oil-amended tropical soil microcosms by natural attenuation, bioaugmentation, or bioenrichment. *Appl. Environ. Soil Sci*. **2011**, 1–10 (2011)
4. Ballaminut N., Gomes Machado K.M., dos Santos Oliveira L.H., Matheus D.R.: Physiological characterization of fungal inoculum for biotechnological remediation of soils. *Braz. Arch. Biol. Technol*. **57**, 561–570 (2014)
5. Barbeau C., Deschênes L., Karamanev D., Comeau Y, Samson R.: Bioremediation of pentachlorophenol-contaminated soil by bioaugmentation using activated soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **48**, 745–752 (1997)
6. Bent E., Tuzun S., Chanway C.P., Enebak S.: Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. *Can. J. Microbiol*. **47**, 793–800 (2001)
7. Bhalerao T.S.: Bioremediation of endosulfan-contaminated soil by using bioaugmentation treatment of fungal inoculant *Aspergillus niger*. *Turk. J. Biol*. **36**, 561–567 (2012)
8. Bidlan R., Afsar M., Manonmani H.K.: Bioremediation of HCH-contaminated soil: elimination of inhibitory effects of the insecticide on radish and green gram seed germination. *Chemosphere*, **56**, 803–881 (2004)
9. Chi X-Q., Zhang J-J., Zhao S., Zhou N-Y.: Bioaugmentation with a consortium of bacterial nitrophenol-degraders for remediation of soil contaminated with three nitrophenol isomers. *Environ. Pollut.* **172**, 33–41 (2013)
10. Colla T.S., Andreazza R., Bucker F., de Souza M.M., Tramontini L., Prado G.R., Frazzon A.P.G., Camargo F.A.D.O., Bento F.M.: Bioremediation assessment of diesel-biodiesel-contaminated soil using an alternative bioaugmentation strategy. *Environ. Sci. Pollut. Res*. **21**, 2592–2602 (2014)
11. Dai Y., Li N., Zhao Q., Xie S.: Bioremediation using *Novosphingobium* strain DY4 for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-contaminated soil and impact on microbial community structure. *Biodegradation*, **26**, 161–170 (2015)
12. Dams R.I., Paton G., Killham K.: Bioaugmentation of pentachlorophenol in soil and hydroponic system. *Int. Biodeterior. Biodegr*. **60**, 171–177 (2007)
13. Das K., Mukherjee A.K.: Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresour. Technol*. **98**, 1339–1345 (2007)
14. Djokic L., Narancic T., Biocanin M., Saljnikov E., Casey E., Vasiljevic B., Nikodinovic-Runic J.: Phenol removal from four different natural soil types by *Bacillus* sp. PS11. *Appl. Soil Ecol*. **70**, 1–8 (2013)
15. dos Santos E.O., da Rossa C.F.C., dos Passos C.T., Sanzo A.V.L., Burkhert J.F.M., Kalil S.J., Burkhert C.A.V.: Pre-screening of filamentous fungi isolated from a contaminated site in Southern Brazil for bioaugmentation purposes. *Afr. J. Biotechnol*. **7**, 1311–1317 (2008)
16. Drewniak Ł., Ciezkowska M., Radlinska M., Sklodowska A.: Construction of the recombinant broad-host-range plasmids providing their bacterial hosts arsenic resistance and arsenite oxidation ability. *J. Biotechnol*. **196–197**, 42–51 (2015)
17. Dueholm M.S., Marques I.G., Karst S.M., D'Imperio S., Tale V.P., Lewis D., Nielsen P.H., Nielsen J.L.: Survival and activity of individual bioaugmentation strains. *Bioresour. Technol*. **186**, 192–199 (2015)
18. Egorova D.O., Demakov V.A., Plotnikova E.G.: Bioaugmentation of a polychlorobiphenyl contaminated soil with two aerobic bacterial strains. *J. Hazard. Mater*. **261**, 378–386 (2013)
19. El Fantroussi S., Agathos S.N.: Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr. Opin. Biotechnol*. **8**, 268–275 (2005)
20. Filonov A.E., Akhmetov L.I., Puntus I.F., Esikova T.Z., Gafarov A.B., Izmalkova T.Yu, Sokolov S.L., Kosheleva I.A., Boronin A.M.: The construction and monitoring of genetically marked, plasmid-containing, naphthalene-degrading strains in soil. *Microbiology*, **74**, 526–532 (2005)
21. Fodelianakis S., Kalogerakis N. i wsp.: Allochthonous bioaugmentation in ex situ treatment of crude oil-polluted sediments in the presence of an effective degrading indigenous microbiome. *J. Hazard. Mater.* **287**, 78–86 (2015)
22. Forsyth J.V., Tsao Y.M., Bleam R.D.: Bioremediation: when is bioaugmentation needed? (w) Bioaugmentation for site remediation, red. R.E. Hinchee, J. Fredrickson, B.C Alleman, Columbus Battele Press, USA, 1995, s. 1–14
23. Gabbasovna Akhmetzyanova L., Nikolaevich K.I., Jurevna Selivanovskaya S.: Comparative analysis of the effectiveness of oil contaminated soil remediation by microbial isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and commercial preparation "Devoroil". *Adv. Environ. Biol*. **8**, 117–121 (2014)
24. Gentili A.R., Cubitto M.A., Ferrero M., Rodriguès M.S.: Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. *Int. Biodeterior. Biodegr*. **57**, 222–228 (2006)

25. Gentry T.J., Rensing C., Pepper I.L.: New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **34**, 447–494 (2004)
26. Haluška L., Barančiková G., Baláž Š., Dercová K., Vrana B., Paz-Wiesshaar M., Furčiová E., Bielek P.: Degradation of PCB in different soil by inoculated *Alcaligenes xylosoxidans*. *Sci. Total Environ.* **175**, 275–285 (1995)
27. Hamid M., Siddiqui I.A., Shahid Shaukat S.: Improvement of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 biocontrol activity against root-knot nematode by the addition of ammonium molybdate. *Lett. Appl. Microbiol*. **364**, 239–244 (2003)
28. Hassanshahian M., Emtiazi G., Caruso G., Cappello S.: Bioremediation (bioaugmentation/biostimulation) trials of oil polluted seawater: a mesocosm simulation study. *Mar. Environ. Res*. **95**, 28–38 (2014)
29. Heinaru E., Merimaa M., Viggor S., Lehiste M., Leito I., Truu J., Heinaru A.: Biodegradation efficiency of functionally important populations selected for bioaugmentation in phenol- and oil-polluted area. *FEMS Microbiol. Ecol*. **51**, 363–373 (2005)
30. Herrero M., Stuckey D.C.: Bioaugmentation and its application in wastewater treatment: a review. *Chemosphere*, **140**, 119–128 (2015)
31. Hong Q., Zhang Z., Hong Y., Li S.: A microcosm study on bioremediation of fenitrothion-contaminated soil using *Burkholderia* sp. FDS-1. *Int. Biodeterior. Biodegr*. **59**, 55–61 (2007)
32. Ikuma K., Gunsch C.: Successful genetic bioaugmentation with *Pseudomonas putida* for toluene degradation in soil columns. *Environ. Chem. Lett*. **11**, 365–370 (2013)
33. Inoue D., Yamazaki Y., Tsutsui H., Sei K., Soda S., Fujita M., Ike M.: Impacts of gene bioaugmentation with pJP4-harboring bacteria of 2,4-D-contaminated soil slurry on the indigenous microbial community. *Biodegradation*, **23**, 263–276 (2012)
34. Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Kamenskikh T.N., Bulicheva M.V., Stukova G.I.: Survival of cryogel-immobilized *Rhodococcus* strains in crude oil-contaminated soil and their impact on biodegradation efficiency. *Int. Biodeterior. Biodegr*. **84**, 118–125 (2013)
35. Liang Y., Zhang X., Dai D., Li G.: Porous biocarrier-enhanced biodegradation of crude oil contaminated soil. *Int. Biodeterior. Biodegr*. **63**, 80–87 (2009)
36. Liang Y., Meggo R., Hu D., Schnoor J.L., Mattes T.E.: Enhanced polychlorinated biphenyl removal in a switchgrass rhizosphere by bioaugmentation with *Burkholderia xenovorans* LB400. *Ecol. Eng*. **71**, 215–222 (2014)
37. Lipthay J.R., Barkay T., Sorensen S.J.: Enhanced degradation of phenoxyacetic acid in soil by horizontal transfer of the *tfdA* gene encoding a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dioxygenase. *FEMS Microbiol. Lett*. **35**, 75–84 (2001)
38. Liu P-W.G., Liou J.W., Li Y.T., Su W.L., Chen C-H.: The optimal combination of entrapped bacteria for diesel remediation in seawater. *Int. Biodeterior. Biodegrad*. **102**, 383–391 (2015)
39. Madueno L., Alvarez H.M., Morelli I.S.: Autochthonous bioaugmentation to enhance phenanthrene degradation in soil microcosms under arid conditions. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **12**, 2317–2326 (2015)
40. Mancera-López M.E., Esparza-García F., Chávez-Gómez B., Rodríguez-Vázquez R., Saucedo-Castañeda G., Barrera-Cortés J.: Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with filamentous fungi. *Int. Biodeterior. Biodegr*. **61**, 151–160 (2008)
41. Massa V., Infantino A., Radice F., Orlandi V., Tavecchio F., Giudici R., Conti F., Urbini G., Di Guardo A., Barbieri P.: Efficiency of natural and engineered bacterial strains in the degradation of 4-chlorobenzoic acid in soil slurry. *Int. Biodeterior. Biodegr*. **63**, 112–115 (2009)
42. Maqbool F., Wang Z., Xu Y., Zhao J., Gao D., Zhao Y-G., Bhatti Z.A., Xing B.: Rhizodegradation of petroleum hydrocarbons by *Sesbania cannabina* in bioaugmented soil with free and immobilized consortium. *J. Hazard. Mater*. **237–238**, 262–269 (2012)
43. Monib M., Abd-el-Malek Y., Hosny I., Fayez M.: Effect of *Azotobacter* inoculation on plant growth and soil nitrogen. *Zentralbl. Bakteriol. Naturwiss*. **134**, 140–148 (1979)
44. Monti M.R., Smania A.M., Fabro G., Alvarez M.E., Argaraña C.E.: Engineering *Pseudomonas fluorescens* for biodegradation of 2,4-dinitrotoluene. *Appl. Environ. Microbiol*. **71**, 8864–8872 (2005)
45. Mrozik A., Piotrowska-Seget Z.: Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiol. Res*. **165**, 363–375 (2010)
46. Mrozik A., Miga S., Piotrowska-Seget Z.: Enhancement of phenol degradation by soil bioaugmentation with *Pseudomonas* sp. JS150. *J. Appl. Microbiol*. **111**, 1–14 (2011)
47. Nakamura K., Ishida H., Iizumi T., Shibuya K., Okamura K.: Quantitative PCR-detection of a phenol-utilizing bacterium, *Ralstonia eutropha* KT-1, injected to a trichloroethylene-contaminated site. *Environ. Eng. Res*. **37**, 267–278 (2000)
48. Nikolopoulou M., Pasadakis N., Kalogerakis N.: Evaluation of autochthonous bioaugmentation and biostimulation during microcosm-simulated oil spills. *Mar. Pollut. Bull*. **72**, 165–173 (2013)
49. Patel V., Patel J., Madamwar D.: Biodegradation of phenanthrene in bioaugmented microcosm by consortium ASP developed from coastal sediment of Alang-Sosiya ship breaking yard. *Mar. Pollut. Bull*. **74**, 199–207 (2013)
50. Pieper D.H., Reineke W.: Engineering bacteria for bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol*. **11**, 262–270 (2000)
51. Qiao J., Zhang C., Luo S., Chen W.: Bioremediation of highly contaminated oilfield soil: bioaugmentation for enhancing aromatic compounds removal. *Front. Environ. Sci. Eng*. **8**, 293–304 (2014)
52. Raina V., Lal R. i wsp.: Enhanced biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) in contaminated soils via inoculation with *Sphingobium indicum* B90A. *Biodegradation*, **19**, 27–40 (2008)
53. Rodrigues J.L.M., Kachel C.A., Aiello M.R., Quensen J.F., Maltseva O.V., Tsoi T.V., Tiedje J.M.: Degradation of Aroclor 1242 dechlorination products in sediments by *Burkholderia xenovorans* LB400(*ohb*) and *Rhodococcus* sp. strain RHA1(*fcb*). *Appl. Environ. Microbiol*. **72**, 2476–2482 (2006)
54. Ronen Z., Vasiluk L., Abeliovih A., Nejidat Z.: Activity and survival of tribromophenol-degrading bacteria in a contaminated desert soil. *Soil Biol. Biochem*. **32**, 1643–1650 (2000)
55. Semrany S., Favier L., Djelal H., Taha S., Amrane A.: Bioaugmentation: possible solution in the treatment of bio-refractory organic compounds. *Biochem. Eng. J*. **69**, 75–86 (2012)
56. Shi S., Qu Y., Ma F., Zhou J.: Bioremediation of coking wastewaters containing carbaozole, dibenzofuran and dizobenzothipene by immobilized naphthalene-cultivated *Arthrobacter* sp. W1 in magnetic gellan gum. *Bioresour. Technol*. **166**, 79–86 (2014)
57. Silva I.S., dos Santos E.C., de Menezes C.R., de Faria A.F., Franciscon E., Grossman M., Durrant L.R.: Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. *Bioresour. Technol*. **100**, 4669–4675 (2009)
58. Simon M.A., Bonner J.S., Page C.A., Townsend R.T., Mueller D.C., Fuller C.B., Autenrieth R.L.: Evaluation of two commercial bioaugmentation products for enhanced removal of petroleum from a wetland. *Ecol. Eng*. **22**, 263–277 (2004)

59. Simons K.L., Ansar A., Kadali K., Bueti A., Adetutu E.M., Ball A.S.: Investigating the effectiveness of economically sustainable carrier material complexes for marine oil remediation. *Bioresour. Technol*. **126**, 202–207 (2012)
60. Singer A.C., van der Gast C.J., Thompson I.P.: Perspectives and vision for strain selection in bioaugmentation. *Trends Biotechnol*. **23**, 74–77 (2005)
61. Sprocati A.R., Alisi C., Tasso F., Marconi P., Sciullo A., Pinto V., Chiavarini S., Ubaldi C., Cremisini C.: Effectiveness of a microbial formula, as a bioaugmentation agent, tailored for bioremediation of diesel oil and heavy metal co-contaminated soil. *Proc. Biochem*. **47**, 1649–1655 (2012)
62. Szewczyk R., Długoński J.: Pentachlorophenol and spent engine oil degradation by *Mucor ramosissimus*. *Int. Biodeterior. Biodegr*. **63**, 123–129 (2009)
63. Szulc A., Ambrożewicz D., Sydow M., Ławniczak Ł., Piotrowska-Cyplik A., Marecik R., Chrzanowski Ł.: The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: feasibility during field studies. *J. Environ. Manage*. **132**, 121–128 (2014)
64. Teng Y., Luo Y., Sun M., Liu Z., Li Z., Christie P.: Effect of bioaugmentation by *Paracoccus* sp. strain HPD-2 on the soil microbial community and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from an aged contaminated soil. *Bioresour. Technol.* **101**, 3437–3443 (2010)
65. Thompson I.P., van der Gast C.J., Ciric L., Singer A.C.: Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environ. Microbiol*. **7**, 909–915 (2005)
66. Tyagi M., M. da Fonseca M.R., de Carvalho C.C.C.R.: Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, **22**, 231–241 (2011)
67. Viňas M., Sabate J., Espuny M.J., Anna M., Vin M.: Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily cresoate-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol*. **71**, 7008–7018 (2005)
68. Vogel T.M.: Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**, 311–316 (1996)
69. Wang L., Chi X-Q., Zhang J-J., Sun D-L., Zhou N-Y.: Bioaugmentation of a methyl parathion contaminated soil with *Pseudomonas* sp. strain WBC-3. *Int. Biodeterior. Biodegr*. **87**, 116–121 (2014)
70. Winquist E., Björklöf K., Schultz E., Räsänen M., Salonen K., Anasonye F., Cajthaml T., Steffen K.T., Jørgensen K.S., Tuomela M.: Bioremediation of PAH-contaminated soil with fungi – from laboratory to field scale. *Int. Biodeterior. Biodegr.* **86**, 238–247 (2014)
71. Xin B-P., Wu C-H., Wu C-H., Lin C-W.: Bioaugmented remediation of high concentration BTEX-contaminated groundwater by permeable reactive barrier with immobilized bead. *J. Hazard. Mater*. **244–245**, 765–772 (2013)
72. Yao Y., Lu Z., Zhu F., Min H., Bian C.: Successful bioaugmentation of an activated sludge reactor with *Rhodococcus* sp. YYL for efficient tetrahydrofuran degradation. *J. Hazard. Mater*. **261**, 550–558 (2013)
73. Zhang Q., Wang B., Cao Z., Yu Y.: Plasmid-mediated bioaugmentation for the degradation of chlorpyrifos in soil. *J. Hazard. Mater*. **221–222**, 178–184 (2012)
74. Zhou N.A., Lutovsky A.C., Andaker G.L., Ferguson J.F., Gough H.L.: Kinetics modeling predicts bioaugmentation with Sphingomonad cultures as a viable technology for enhanced pharmaceutical and personal care products removal during wastewater treatment. *Bioresour. Technol.* **166**, 158–167 (2014)

POST. MIKROBIOL.,
2016, 55, 2, 157–171
http://www.pm.microbiology.pl

BAKTERIOCYNY BAKTERII GRAM-UJEMNYCH – STRUKTURA, MECHANIZM DZIAŁANIA I ZASTOSOWANIE

Urszula Błaszczyk[1]*, Jagoda Moczarny[1]

[1] Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Technicznej, Wydział Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Wpłynęło w lipcu 2015 r.
Zaakceptowano w styczniu 2016 r.

1. Wprowadzenie. 2. Klasyfikacja bakteriocyn bakterii Gram-ujemnych. 3. Produkcja kolicyn przez bakterie kolicynogenne. 3.1. Synteza kolicyn. 3.2. Eksport kolicyn z komórek producenta. 4. Mechanizmy działania kolicyn. 4.1. Translokacja. 4.2. Efekt letalny kolicyn. 5. Charakterystyka i podział mikrocyn. 5.1. Struktura i genetyka wybranych mikrocyn. 5.1.1. MccE492. 5.1.2. MccJ25. 5.1.3. MccC7-C51. 5.2. Mechanizmy działania mikrocyn. 5.2.1. MccE492. 5.2.2. MccJ25. 5.2.3. MccC7-C51. 6. Potencjalne zastosowanie kolicyn i mikrocyn. 7. Podsumowanie

Bacteriocins of Gram-negative bacteria – structure, mode of action and potential applications

Abstract: Bacteriocins are a diverse group of ribosomally synthesized peptides or proteins secreted by bacteria, which help them to compete in their local environments for the limited nutritional resources. Bacteriocins kill or inhibit the growth of other bacteria. Generally, these molecules have a narrow spectrum of antibacterial activity, but some of them demonstrate a broad spectrum of action. Bacteriocins from Gram-negative bacteria are divided into two main groups: high molecular mass proteins (30–80 kDa) known as colicins, and low molecular mass peptides (between 1–10 kDa) termed microcins. Colicins are produced by *Escherichia coli* strains harbouring a colicinogenic plasmid. Such colicinogenic strains are widespread in nature and are especially abundant in the gut of animals. The biosynthesis of colicins is mediated by the SOS regulon, which becomes activated in the response to DNA damage. The colicin synthesis is lethal for the producing cells as a consequence of the concomitant biosynthesis of the colicin lysis protein. Microcins are usually highly stable molecules, which are resistant to proteases, extreme pH values and temperatures. They are produced by enteric bacteria under stress conditions, particularly nutrient depletion. Microcins are encoded by gene clusters carried by plasmids or in certain cases by the chromosome. In this review, we have summarized the most important information about structure and properties of bacteriocins from Gram-negative bacteria, their diverse mechanisms of action and potential application as food preservatives and in livestock industry.

1. Introduction. 2. Classification of bacteriocins from Gram-negative bacteria. 3. Production of colicins by colicinogenic bacteria. 3.1. Colicin synthesis. 3.2. Export of colicins from bacteriocin-producing cells. 4. Modes of colicin action. 4.1. Translocation. 4.2. Lethal effect of colicins. 5. Characteristics and classification of microcins. 5.1. Structure and genetics of selected microcins. 5.1.1. MccE492. 5.1.2. MccJ25. 5.1.3. MccC7-C51. 5.2. Mechanisms of action of microcins. 5.2.1. MccE492. 5.2.2. MccJ25. 5.2.3. MccC7-C51. 6. Potential applications of colicins and microcins. 7. Summary

Słowa kluczowe: aktywność antymikrobiologiczna, bakterie Gram-ujemne, kolicyny, mikrocyny
Key words: antimicrobial activity, Gram-negative bacteria, colicins, microcins

1. Wprowadzenie

Allelopatia to szeroko rozpowszechnione w naturze zjawisko, wprowadzone do literatury naukowej już w 1937 roku przez austriackiego badacza Hansa Molischa [66]. W świecie bakterii pojęcie to często odnoszone jest do antagonistycznego oddziaływania pomiędzy populacjami poprzez produkcję substancji szkodliwych dla populacji konkurencyjnej [40]. Do takich allelopatycznych związków wytwarzanych przez mikroorganizmy zaliczane są m.in.: metabolity wtórne – amoniak lub nadtlenek wodoru, klasyczne antybiotyki o szerokim spektrum działania (bacytracyna, polimiksyna B), enzymy bakteriolityczne i, co stanowi temat niniejszego artykułu – bakteriocyny, zwykle definiowane jako biologicznie aktywne peptydy lub białka działające bakteriobójczo [40, 79].

W 1925 roku udokumentowano pierwsze odkrycie wskazujące na to, że bakterie są producentami cząsteczek antydrobnoustrojowych [42]. Wtedy to belgijski mikrobiolog André Gratia opisał obecność wrażliwych na podwyższoną temperaturę substancji o znacznej specyficzności antymikrobiologicznej, wytwarzanych przez *Escherichia coli* V, której aktywność skierowana była przeciwko innym szczepom tego samego gatunku, tj. *E. coli* φ [42]. Substancje te zostały nazwane kolicynami, by wskazać organizm, który je wyprodukował. W 1946 roku Gratia i Fredericq dowiedli, że kolicyny są białkami [41], a ich spektrum działania jest ograniczone w zależności od obecności bądź braku specyficznych receptorów na powierzchni komórek wrażliwych [32].

Bakteriocyny tworzą dużą i niezwykle zróżnicowaną funkcjonalnie rodzinę toksyn. Specyficzną cechą, która je łączy to fakt, że są peptydami lub białkami

* Autor korespondencyjny: Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Technicznej, Wydział Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków; tel. 12 6624790; e-mail: ublaszczyk@ar.krakow.pl

syntetyzowanymi rybosomalnie [18]. Dodatkowo wykazują aktywność antymikrobiologiczną przeciwko szczepom przeważnie blisko spokrewnionym, posiadając jednocześnie specyficzny sprzężony mechanizm immunologiczny, który chroni je przed działaniem własnej toksyny. Warto wspomnieć o badaniach, które wskazują, że bakteriocyny przyczyniają się do wzrostu dynamiki konkurencji pomiędzy różnymi szczepami bakterii, przez co w dużej mierze wpływają na utrzymanie różnorodności mikrobiologicznej [79, 80]. Prawdopodobnie 99% bakterii wytwarza co najmniej jedną bakteriocynę, jednak większość nie została jeszcze zidentyfikowana [53, 82]. Niektóre szczepy syntetyzują dwie lub więcej bakteriocyn [77].

Ze względu na rosnącą oporność bakterii na wiele klasycznych antybiotyków zapoczątkowano szereg badań mających na celu poznanie potencjalnej roli naturalnie produkowanych oraz modyfikowanych bakteriocyn, jako odpowiedników tradycyjnie stosowanych antybiotyków [19, 38]. Bakteriocyny można odróżnić od klasycznych antybiotyków ze względu na następujące cechy:

- bakteriocyny są peptydami lub białkami, których synteza odbywa się rybosomalnie, a antybiotyki to wtórne metabolity niektórych mikroorganizmów, nie tylko bakterii,
- bakteriocyny przeważnie mają wąskie spektrum działania, podczas gdy większość antybiotyków wykazuje szeroki zakres aktywności,
- w odróżnieniu od antybiotyków, do interakcji z komórką wrażliwą bakteriocyny wymagają niekiedy cząsteczki dokującej, która jest niezbędna do bezpośredniego kontaktu z błoną komórki docelowej,
- mechanizm działania bakteriocyn najczęściej polega na formowaniu porów w błonie komórkowej, ale niektóre bakteriocyny mogą również oddziaływać antagonistycznie wobec wrażliwych mikroorganizmów m.in. poprzez niespecyficzną degradację DNA, specyficzną hydrolizę RNA, hamowanie syntezy peptydoglikanu będącego składnikiem ściany komórkowej bakterii; antybiotyki blokują syntezę ściany komórkowej, upośledzają funkcje błony komórkowej lub działają wewnątrzkomórkowo (m.in. zaburzają replikację DNA, syntezę RNA i bakteryjnych białek),
- stwierdzono toksyczność i występowanie skutków ubocznych w przypadku stosowania antybiotyków, w odróżnieniu od nietoksycznych bakteriocyn, które naturalnie występują w niektórych produktach spożywczych i od dawna nieświadomie były spożywane przez ludzi, ponadto są wrażliwe na proteazy i podlegają rozkładowi w przewodzie pokarmowym,
- antybiotyki stosowane są w celach klinicznych, a bakteriocyny w przemyśle spożywczym [9, 17, 43].

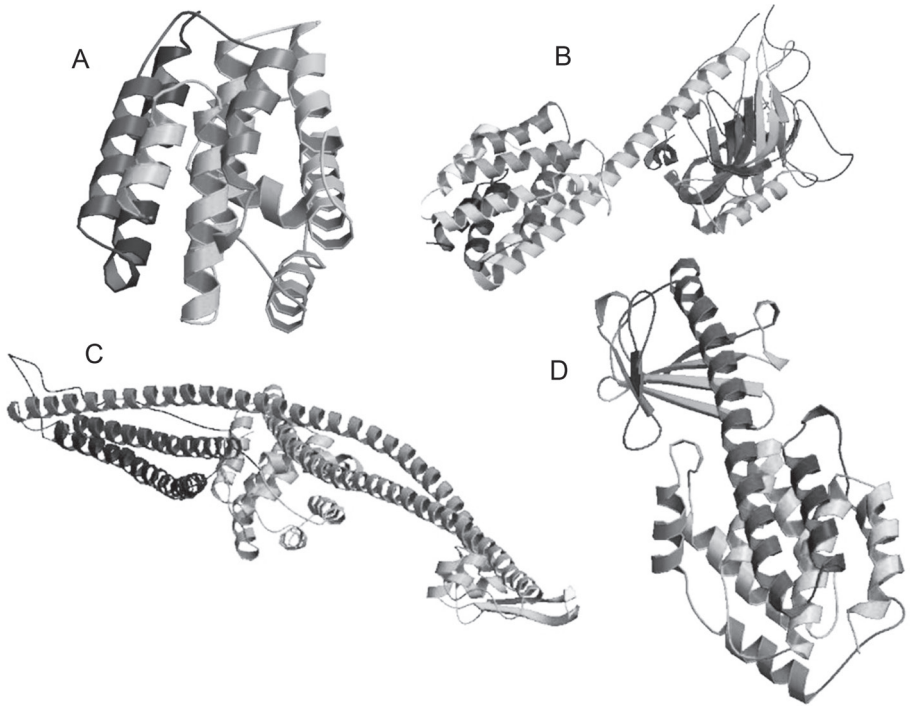
W przeciwieństwie do bakteriocyn, szerokie spektrum działania antybiotyków wiąże się z efektem letalnym nie tylko w stosunku do bakterii chorobotwórczych, ale także przyczynia się do likwidacji korzystnej dla organizmu człowieka flory bakteryjnej, która według niektórych badań może w późniejszym czasie nie wrócić już do swojego pierwotnego składu, a niektóre grupy bakterii mogą zostać zastąpione przez mikroorganizmy oporne na antybiotyki. Długotrwała ekspozycja pożytecznej flory bakteryjnej na antybiotyki może odpowiadać za zwiększoną podatność organizmu na infekcje i choroby takie jak: otyłość, cukrzyca typu 1, nieswoiste zapalenie jelit, alergie, astma [8].

Rodzina bakteriocyn stanowi grupę związków organicznych, które różnią się między sobą m.in. masą cząsteczkową, właściwościami biochemicznymi, mechanizmem działania, spektrum aktywności lub rodzajem komórek wrażliwych, na którą działają [15, 44].

2. Klasyfikacja bakteriocyn bakterii Gram-ujemnych

Wiele uwagi poświęca się bakteriocynom wytwarzanym przez bakterie Gram-dodatnie. Poznawane są coraz to nowe cząsteczki należące do tej niezwykle licznej i zróżnicowanej grupy związków antydrobnoustrojowych [36, 37, 46, 56, 57, 59, 60, 62, 65, 70, 105, 109]. Bakteriocyny produkowane przez bakterie Gram-dodatnie różnią się od tych wytwarzanych przez bakterie Gram-ujemne w dwóch zasadniczych kwestiach. Po pierwsze, uwalnianie bakteriocyny do środowiska zewnętrznego w przypadku bakteriocyn bakterii Gram-dodatnich niekoniecznie musi się wiązać się z lizą komórki, która ją wyprodukowała jak ma to miejsce w przypadku bakteriocyn bakterii Gram-ujemnych, zaliczanych do rodziny kolicyn. Ta znacząca różnica powstała w związku z mechanizmem transportu umożliwiającym wydzielenie bakteriocyny. Zwykle biosynteza bakteriocyn bakterii Gram-dodatnich podlega samoregulacji dzięki specyficznie wyspecjalizowanym mechanizmom transportu ułatwiającym wydzielanie, jednak niektóre wykorzystują *sec*-zależne drogi eksportu. Po drugie, bakterie Gram-dodatnie wykształciły bakteriocyno-specyficzną regulację, natomiast w przypadku większości bakteriocyn bakterii Gram-ujemnych synteza jest regulowana w oparciu o system SOS [79].

Bakterie Gram-ujemne, podobnie jak Gram-dodatnie, produkują szereg bakteriocyn, a ich nazwa pochodzi od rodzaju bakterii, który je wytwarza (np. klebicyna – *Klebsiella pneumoniae*) lub od gatunku (np. kolicyna – *E. coli*, pestycyna – *Yersinia pestis*, marcescyna – *Serratia marcescens*) [15]. Charakterystyczne dla bakteriocyn bakterii Gram-ujemnych jest to, że zarówno producent, jak również szczepy wrażliwe należą do tego samego rodzaju i w większości tego



Rys. 1. Struktury wybranych kolicyn
A. Kolicyna A (PDB: 1COL). **B**. Kolicyna B (PDB: 1RH1). **C**. Kolicyna Ia (PDB: 1CII). **D**. Kolicyna N (PDB: 1A87).

PDB ID: 1COL
Parker M.W., Postma J.P., Pattus F., Tucker A.D., Tsernoglou, D.: Refined structure of the pore-forming domain of colicin A at 2.4 A resolution. *J. Mol. Biol.* **224**, 639–657 (1992)
PDB ID: 1RH1
Hilsenbeck J.L., Park H., Chen, G., Youn B., Postle K., Kang C.: Crystal structure of the cytotoxic bacterial protein colicin B at 2.5 A resolution. *Mol. Microbiol.* **51**, 711–720 (2004)
PDB ID: 1CII
Wiener M., Freymann D., Ghosh P., Stroud R.M.: Crystal structure of colicin Ia. *Nature*, **385**, 461–464 (1997)
PDB ID: 1A87
Vetter I.R., Parker M.W., Tucker A.D., Lakey J.H., Pattus F., Tsernoglou D.: Crystal structure of a colicin N fragment suggests a model for toxicity. *Structure*, **6**, 863–874 (1998)

samego gatunku [95]. Klasyfikuje się je zasadniczo jako kolicyny i mikrocyny.

Kolicyny to białka o masie cząsteczkowej 25–80 kDa produkowane przez i aktywne przeciwko *E. coli* i innym członkom rodziny *Enterobacteriaceae* [81]. Kolicyna V jest pierwszą, odkrytą prawie 100 lat temu bakteriocyną [42], do dzisiaj opisano ponad 30 różnych cząsteczek zaliczanych do rodziny kolicyn [77]. Schematyczne struktury wybranych kolicyn zostały przedstawiona na Rysunku 1.

Z historycznego punktu widzenia, jak i możliwości ich potencjalnego zastosowania, kolicyny, obok bakteriocyn wytwarzanych przez bakterie fermentacji mlekowej, należą do najintensywniej badanych bakteriocyn. W przeciwieństwie do bakteriocyn produkowanych przez bakterie Gram-dodatnie, których biosynteza podlega samoregulacji, jeśli chodzi o mechanizmy transportu odpowiedzialne za ich wydzielanie, kolicyny funkcjonują w oparciu o system SOS. W warunkach stresowych, takich jak: redukcja składników pokarmowych lub promieniowanie UV, dochodzi do indukcji części bakterii z populacji *E. coli* zdolnych do wydzielania bakteriocyny. Indukcja ta skutkuje śmiercią komórek produkujących kolicyny (jednocześnie z kolicyną syntetyzowane jest białko lityczne), co w rezultacie prowadzi do uwolnienia z komórek producenta cząsteczek kolicyny, a przez to również śmierci znajdujących się w pobliżu komórek wrażliwych. Wydzielone białka wiążą się ze specyficznymi receptorami na powierzchni komórek docelowych i przemieszczają się do ich wnętrza z pomocą białek transportowych.

Pomimo różnic w mechanizmach działania, większość kolicyn wykazuje podobną organizację strukturalną z trzema funkcjonalnymi domenami: regionem N-terminalnym (ok. 25% białka) odpowiedzialnym za przemieszczenie się do komórki docelowej, regionem centralnym (ok. 50% całego białka) zaangażowanym w wiązanie kolicyny ze specyficznymi receptorami w błonie zewnętrznej oraz regionem C-terminalnym odpowiadającym za aktywność antybakteryjną [79]. Domena receptorowa wiąże kolicynę z receptorem na powierzchni błony zewnętrznej komórki wrażliwej, po czym białko to jest translokowane w głąb błony bądź cytoplazmy komórki docelowej. W transporcie do komórki biorą udział dwie grupy białek – system Ton oraz system Tol. Oporność na antybakteryjne działanie kolicyn może wytworzyć się w wyniku zmian strukturalnych w obrębie receptorów błonowych, dzięki

którym kolicyny wnikają do wnętrza komórki, bądź modyfikacji w mechanizmie wchłaniania [10, 82]. Duże podobieństwo strukturalne do kolicyn wykazują piocyny, bakteriocyny produkowane przez bakterie z rodzaju *Pseudomonas* [48].

Mikrocyny to znacznie mniejsze od kolicyn niskocząsteczkowe peptydy (< 10 kDa), syntetyzowane przez bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*. Działają antagonistycznie w stosunku do szczepów blisko spokrewnionych. Z wyjątkiem *K. pneumoniae*, wszystkie znane szczepy wytwarzające mikrocyny należą do gatunku *E. coli* [23, 44]. W przeciwieństwie do kolicyn, synteza mikrocyn nie podlega regulacji przez system SOS i nie jest śmiertelna dla szczepu, który produkuje mikrocynę [44, 72]. Klaster mikrocynowy jest bardziej zróżnicowany od kolicynowego i zawiera w sobie geny odpowiedzialne za biosyntezę mikrocyn (w niektórych przypadkach geny kodujące białko prekursorowe i enzymy modyfikacji posttranslacyjnej) oraz te decydujące o ich sekrecji i odporności [4].

Co ciekawe, mikrocyną okazałą się być również pierwsza opisana bakteriocyna – kolicyna V (ColV) [77]. W ostatnich latach liczba zidentyfikowanych mikrocyn powiększyła się z dziewięciu do czternastu i, w przeciwieństwie do kolicyn, siedem z nich udało się wyizolować oraz opisać na poziomie strukturalnym i funkcjonalnym. Są to mikrocyny B17, C51, E492, J25, L, M oraz V (wcześniej zanana jako ColV) [28].

3. Produkcja kolicyn przez bakterie kolicynogenne

3.1. Synteza kolicyn

Synteza kolicyn jest kodowana przez plazmidy Col, różniące się między sobą wielkością (np.: plazmid pColE1 – 6,6 kpz, a pColH aż 94 kpz) [95]. Odróżnia je również zdolność do powielania, liczba kopii przypadających na komórkę oraz zdolność do transferu przez koniugację [74].

Plazmidy Col, oprócz kolicyn, kodują dodatkowo jeden, bądź częściej, dwa dodatkowe typy białek: białko odpornościowe i białko lityczne [74]. Przykład stanowi operon kolicyny E1, który zawiera trzy geny. Geny *cea, imm* oraz *kil* odpowiadają w kolejności za strukturę bakteriocyny, białka odpornościowego oraz litycznego. Rolą białka immunologicznego jest specyficzna ochrona komórki kolicynogennej (wiąże i inaktywuje toksyczną proteinę) przed jej własną kolicyną, jak również przed innymi kolicynami tego samego typu, które pochodzą ze środowiska. Białko lityczne jest natomiast małą lipoproteiną, odpowiedzialną za łatwiejsze uwolnienie zsyntetyzowanej kolicyny z komórki producenta. Podczas gdy gen *imm* występuje we wszystkich plazmidach Col, gen *kil* obecny jest jedynie w grupie plazmidów małych – Ia i Ib [95].

Usytuowanie genów w plazmidach Col zależy od antagonistycznego mechanizmu działania kolicyn oraz od wzajemnej interakcji pomiędzy kolicyną, a jej białkiem odpornościowym. W przypadku kolicyn, które działają na błonę plazmatyczną, gen *imm* jest transkrybowany kolejno w kierunku przeciwnym do genu decydującego o strukturze kolicyny, jak i genu *kil*. Dla kolicyn posiadających aktywność nukleazy, gen *imm* stanowi część jednostki transkrypcyjnej i zorientowany jest w tym samym kierunku co dwa pozostałe geny, a dodatkowo intensywność jego transkrypcji jest proporcjonalna do transkrypcji genów *cea* i *kil*. Nawet w przypadku komórek, w których operon kolicynowy jest wyłączony, synteza białka odpornościowego jest kontynuowana. Kontrolowana jest przez niezależny promotor, który umożliwia komórce przeżycie na podłożu, w którym kolicyny produkowane są w sposób spontaniczny przez pewną część komórek.

Proces syntezy kolicyn determinowany jest przez kilka czynników. Podstawową regulację, powszechną wśród prawie wszystkich kolicyn, zapewnia system SOS, który bierze udział w kontrolowaniu ekspresji genów oraz naprawianiu uszkodzonego DNA. W normalnych warunkach produkcja kolicyn jest wyłączona u większości komórek w populacji. Ma ona miejsce tylko u małej części populacji, jako skutek losowej samorzutnej aktywacji systemu SOS [44]. Synteza kolicyn w kulturze producenta wzrasta ponad tysiąc raz dzięki indukcji po fazie lag. W przypadku niektórych kolicyn istnieją również bardziej łagodne mechanizmy regulacji uczestniczące w kształtowaniu tego procesu [95]. Kolejno, synteza kolicyn może być regulowana poprzez nieswoistą represję kataboliczną. Niskie stężenie glukozy w podłożu komórek kolicynogennych powoduje, że wzrasta synteza cAMP, który wiążąc się z odpowiednim białkiem receptorowym tworzy kompleks stymulujący ekspresję genu strukturalnego kolicyny [85]. Produkcja kolicyny E1 jest również stymulowana przez brak tlenu. W warunkach beztlenowych, transkrypcja genu kolicyny jest aktywowana przez białko regulatorowe FNR. Warunki anaerobiozy dodatkowo znacznie skracają fazę lag, przez co synteza kolicyny wzrasta 45-krotnie w porównaniu z warunkami tlenowymi. Białko FNR jest syntetyzowane stale, ale aktywne jest tylko w warunkach beztlenowych. Związanie aktywnej formy białka FNR blisko promotora inicjuje transkrypcję genu kolicyny [29].

3.2. Eksport kolicyn z komórek producenta

Żadna z kolicyn nie jest transportowana specyficznie z komórki producenta. Nie wykryto również w obrębie ich struktury N-końcowej sekwencji sygnałowej [10, 50]. Kolicyny są uwalniane z komórki razem

z innymi proteinami. Ten proces jest wspomagany przez tzw. białko lityczne, które powoduje również lizę błony komórkowej, ściany komórkowej i błony zewnętrznej, w wyniku czego dochodzi do śmierci komórki bakteryjnej [14]. Ekspresja genu *kil* kodującego białko lityczne regulowana jest przez promotor, który jest wspólny z genem strukturalnym białka kolicynowego. W związku z tym do ekspresji genu *kil* dochodzi wtedy, gdy synteza kolicyny w komórce zostanie zaindukowana. Niezwykle stabilna sekwencja sygnałowa białka litycznego nie jest degradowana przez co wpływa na efektywny eksport kolicyny z komórki producenta [95].

4. Oddziaływanie kolicyn na komórki bakteryjne

Hamujący efekt kolicyn na komórki bakteryjne ograniczony jest do wrażliwych szczepów z rodziny *Enterobacteriaceae*. Efekt inhibicji zależny jest od rodzaju interakcji pomiędzy kolicyną, a komórką bakteryjną, przy czym wymagana jest obecność specyficznego receptora kolicynowego w błonie zewnętrznej oraz funkcjonalnego mechanizmu translokacji pomiędzy błoną zewnętrzną i plazmatyczną bakterii. Oddziaływanie kolicyn na komórki wrażliwe sprowadza się do trzech etapów:

- związanie się do zewnętrznej błony bakteryjnej z udziałem specyficznego receptora,
- translokacja przez błonę zewnętrzną, ścianę i błonę komórkową,
- efekt letalny.

To trzystopniowe działanie odzwierciedla organizacja cząsteczki kolicynowej, która składa się z trzech domen: receptorowej, translokacyjnej i letalnej [13]. Każda z domen funkcjonalnych w cząsteczce kolicyny jest właściwie niezależna, w związku z czym, dzięki wzajemnej kombinacji fragmentów genów poszczególnych domen, możliwe jest stworzenie nowych typów kolicyn, jak również hybryd kolicyn z innymi bakteriocynami.

Stopień wrażliwości szczepu na kolicynę jest funkcją średniej liczby receptorów przypadających na komórkę. Stąd, wrażliwość na kolicyny ma charakter ilościowy.

Można wyróżnić trzy typy niewrażliwości na kolicyny:

- Oporność z powodu braku funkcjonalnego receptora kolicynowego. Stwierdzono doświadczalnie, że kultura wzrastająca na płytce z agarem w obecności kolicyny bez występujących widocznych czynników ograniczających jest uważana za oporną.
- Tolerancja z powodu zaburzonego systemu translokacji. „Tolerancyjna" komórka, w przeciwieństwie do komórki „opornej" wyposażona jest w całkowicie funkcjonalny receptor. Jednakże, wiąże ona zwykle mniejszą liczbę cząsteczek kolicyny niż komórka wrażliwa.
- Odporność. Komórka posiada funkcjonalny receptor kolicynowy, jak również sprawny mechanizm translokacji, jednakże wzmocnienie efektu letalnego jest utrudnione przez wzajemne oddziaływanie kolicyny z proteiną odpornościową, która syntetyzowana jest przez komórkę razem z kolicyną [49]. W związku z tym, odporność jest równoważna z niewrażliwością komórki producenta [95].

4.1. Translokacja kolicyn

Kolicyny wiążą się ze specyficznymi receptorami znajdującymi się na zewnętrznej błonie, skąd zostają przemieszczone do wnętrza komórki bakteryjnej. Translokacja przebiega dzięki systemom Ton oraz Tol. Grupa kolicyn A wykorzystuje system Tol i potrzebuje poryn, tj.: OmpF oraz białek TolA, TolB, TolQ i TolR, podczas gdy kolicyny grupy B wykorzystują system Ton razem ze specyficznymi receptorami oraz białkami TonB, ExbB oraz ExbD [50]. TonB i ExbD, jak również TolA i TolR to białka zakotwiczone dzięki swoim N-końcom w błonie plazmatycznej. TolQ i ExbB to integralne białka błonowe, natomiast białko TolB, które nie posiada swojego odpowiednika w systemie Ton, jest zlokalizowane głównie w peryplazmie. Białko TolA jest analogiczne do białka TonB, natomiast nie mogą się zastępować. TolQ funkcjonalnie może pełnić rolę odpowiednika ExbB, podobnie jak TolR z ExbD [95].

Kompleks Tol jest niezbędny dla integralności osłony bakteryjnej. Skutkiem mutacji genu *tol* jest tzw. tolerancyjny fenotyp – obniżona wrażliwość na kolicyny, zwiększona przepuszczalność zewnętrznej błony komórkowej dla barwników, zwiększona wrażliwość na detergenty itd.

Liczba receptorów błonowych przypadająca na jedną komórkę bakteryjną waha się od 10^2 (BtuB) do 10^5 (OmpF) kopii. Jednakże import kolicyn nie jest ograniczony liczbą cząsteczek receptorowych na powierzchni błony, a raczej liczbą receptorów związanych z kompleksami translokacyjnymi – system Tol występuje w liczbie 400–1000 kopii na komórkę [27]. Wynika z tego, że pomimo znacznej liczby cząsteczek kolicynowych, które przyłączą się do specyficznych receptorów na powierzchni błony zewnętrznej, nie wszystkie zostaną translokowane do wewnątrz. Niektóre receptory współdziałają alternatywnie z obydwoma systemami translokacji. W takich przypadkach transport „naturalnych" substratów odbywa się tylko przez system Ton, podczas gdy kolicyny wykorzystują obydwa systemy do ich translokacji [95].

Po translokacji cząsteczki kolicyny dochodzi do rearanżacji jej struktury trzeciorzędowej. Kolicyna A przekształca swoją strukturę podczas translokacji, a jej denaturacja zmniejsza czas, który jest potrzebny do wywołania efektu letalnego [6].

4.2. Efekt letalny kolicyn

Badania dotyczące oddziaływania kolicyn na wrażliwe komórki bakteryjne dowodzą, że już pojedyncza, bądź kilka cząsteczek kolicynowych wystarcza do wywołania efektu letalnego wrażliwej bakterii. Efekt bakteriobójczy kolicyny poprzedzony jest działaniem bakteriostatycznym [91], a czas trwania fazy bakteriostatycznej jest odwrotną funkcją mnogości kolicyn. Każda komórka, która zwiąże kolicynę chwilowo przeżywa, jednak traci zdolność do podziału.

Wysoce skuteczna aktywność antymikrobiologiczna kolicyn jest częściowo ograniczona ze względu na to, że nie wszystkie cząsteczki kolicyn połączone z receptorem mogą związać się z kompleksem translokacyjnym, a dodatkowo wystawione są na działanie proteinaz na powierzchni komórek bakteryjnych. Kolicyny obydwu grup A i B utrzymują kontakt z receptorem podczas tworzenia kanałów w błonie plazmatycznej. W związku z tym, można wykluczyć ich hamujący efekt dzięki trypsynie, która degraduje części cząsteczek znajdujących się na powierzchni komórki.

Kolicyny eliminują wrażliwe bakterie na różne sposoby. Najczęstszym z nich jest formowanie kanałów jonowych w błonie plazmatycznej, co prowadzi do depolaryzacji błony. Inny sposób wiąże się z aktywnością nukleazową kolicyn, natomiast najrzadziej dochodzi do zahamowania syntezy peptydoglikanu [95].

5. Charakterystyka i podział mikrocyn

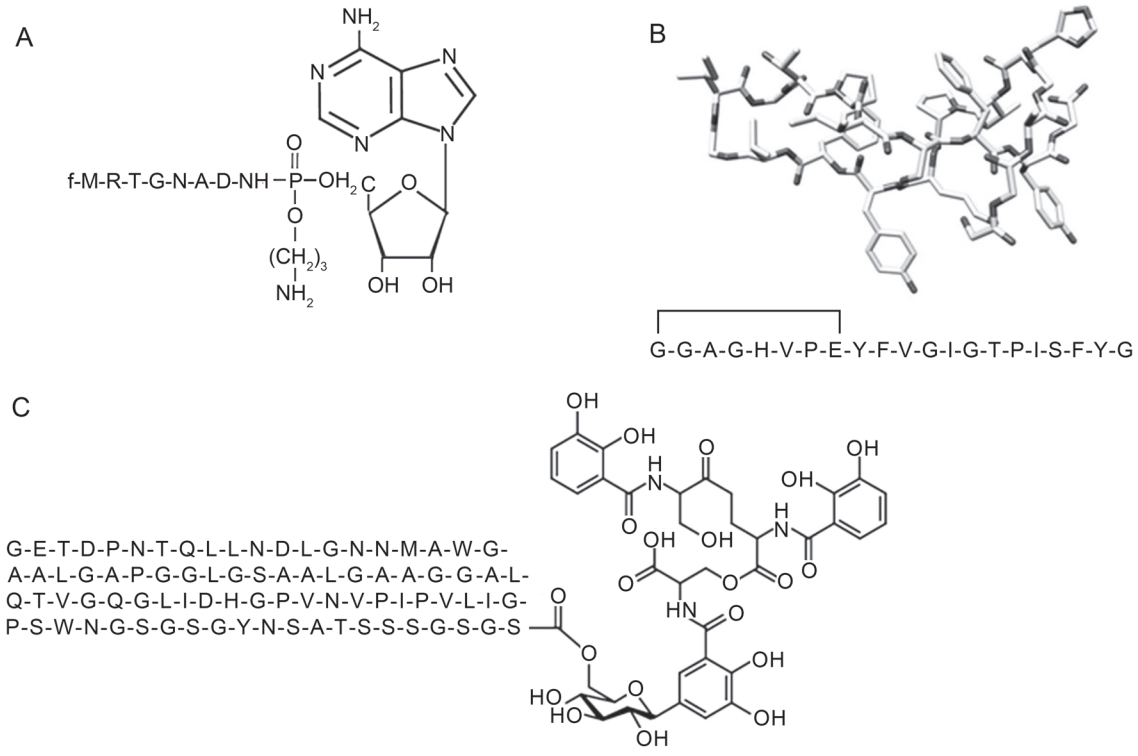
Termin „mikrocyny" wprowadzono z uwagi na to, żeby odróżnić klasę antybakteryjnych peptydów, o masie molekularnej poniżej 10 kDa, od większych od nich kolicyn [74]. Mikrocyny wykazują odporność na wysoką temperaturę, krańcowe pH i proteazy. Produkowane pod wpływem stresu (np. niedobór składników odżywczych), wykazują silną aktywność antybakteryjną w stosunku do szczepów blisko spokrewnionych włączając rodzaje: *Escherichia*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* oraz *Shigella*, przy minimalnym stężeniu hamującym (MIC – *Minimal Inhibitory Concentration*) w skali nanomolarnej.

Podobnie do bakteriocyn produkowanych przez bakterie Gram-dodatnie, mikrocyny wydzielane są zwykle jako syntetyzowane rybosomalnie prekursory. Są kodowane przez geny znajdujące się w plazmidach albo, w niektórych przypadkach, w chromosomach. Operony, które zawierają geny kodujące prekursory mikrocyn, kodują również czynniki odpowiedzialne za odporność na mikrocyny, białka sekrecyjne oraz enzymy modyfikacyjne, co wpływa na ogromną różnorodność mikrocyn, zarówno pod względem ich struktury, jak i mechanizmów działania [28].

Mikrocyny dzieli się na dwie klasy w zależności od ich masy cząsteczkowej, obecności bądź też braku mostków disiarczkowych oraz ze względu na modyfikacje posttranslacyjne. **Klasa I** mikrocyn (B17, C7-C51, J25) to kodowane w plazmidach peptydy o masie cząsteczkowej poniżej 5 kDa, które podlegają modyfikacjom posttranslacyjnym i działają na cele zlokalizowane wewnątrzkomórkowo [34, 72]. Hamują funkcje życiowe tych szczepów bakteryjnych, które wykazują podobną morfologię i fizjologię. Do **klasy II** należą peptydy o wyższej masie molekularnej w zakresie 5–10 kDa, wykazujące aktywność antybakteryjną głównie poprzez oddziaływanie na błony komórkowe. Wśród mikrocyn zaliczanych do klasy II wyróżnia się dwie podklasy. **Klasa IIa** obejmuje trzy kodowane plazmidowo peptydy, które nie ulegają modyfikacjom posttranslacyjnym, a w swej budowie prawdopodobnie posiadają mostki dwusiarczkowe (mikrocyny L, V oraz 24). Natomiast kodowane w chromosomach liniowe mikrocyny E492, M i H47, które mogą ulegać lub nie C-końcowym modyfikacjom zaliczane są do **klasy IIb**. Są to tzw. mikrocyny sideroforowe. Wysoce konserwatywna C-końcowa sekwencja 10 aminokwasów jest ich znakiem rozpoznawczym [100].

Pomimo wysokiej heterogeniczności mikrocyn pod względem budowy strukturalnej, organizacja ich klastru genowego jest konserwatywna i składa się z przynajmniej czterech zespolonych genów, zgrupowanych w jednym lub kilku operonach. Mowa tu o genach strukturalnych kodujących prekursor mikrocynowy, sąsiadujących z nimi genach odpowiadających za odporność szczepu wytwarzającego daną mikrocynę na jej działanie antymikrobiologiczne i genach kodujących właściwy system eksportu mikrocyny, który umożliwia jej prawidłową sekrecję. Dodatkowo występują geny kodujące enzymy niezbędne do prawidłowego przebiegu modyfikacji posttranslacyjnych [28]. Niektóre prekursory mikrocyn ulegają modyfikacjom posttranslacyjnym w trakcie procesu dojrzewania do mikrocyny aktywnej. Modyfikacje, którym ulegają mikrocyny aktywne mogą przebiegać drogami rybosomalną i nierybosomalną. Dojrzałe mikrocyny są wówczas eksportowane przy użyciu systemu transportującego ABC (*ATP-Binding Cassette Transporter*) [78].

Warto zwrócić uwagę na trzy wybrane mikrocyny: E492, J25 i C7-C51 (Rys. 2) oraz strategie wykorzystywane przez enterobakterie, które dzięki tym białkom wykazują aktywność antymikrobiologiczną w obecności bakterii. Wspomniane mikrocyny oddziałują na inne komórki przy użyciu strategii tzw. konia trojańskiego (*Trojan Horse*). Mikrocyna może naśladować potrzebny komórce składnik odżywczy, np. kompleks sideofor-żelazo, co umożliwia jej translokację do peryplazmy dzięki wcześniejszemu rozpoznaniu mikrocyny przez specyficzne receptory w zewnętrznej błonie komórko-



Rys. 2. Struktury wybranych mikrocyn

A. Mikrocyna C7-C51 – peptyd z modyfikowanym AMP. **B**. Mikrocyna J25 – peptyd w kształcie lasso; struktura trójwymiarowa (górna, PDB: 1Q71) i pierwszorzędowa (dolna), klamra oznacza pierścień laktamowy utworzony pomiędzy grupą α-aminową Gly[1] a grupą γ-karboksylową Glu[8]. **C**. Mikrocyna E492 – peptyd sideroforowy.

PDB ID: 1Q71

Rosengren K.J., Clark R.J., Daly N.L., Goransson U., Jones A., Craik D.J.: Microcin J25 has a threaded sidechain-to-backbone ring structure and not a head-to-tail cyclized backbone. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 12464–12474 (2003)

wej atakowanej bakterii. Może być również wydzielana w formie nieaktywnej molekuły, by po wniknięciu do wrażliwej bakterii i związaniu się z wewnętrzną błoną stać się cząsteczką toksyczną [78].

5.1. Struktura i genetyka wybranych mikrocyn

5.1.1. MccE492

Najlepiej scharakteryzowaną mikrocyną należącą do klasy IIb jest mikrocyna E492 (w skrócie Mcc492), która produkowana jest przez szczep *K. pneumoniae* RYC492 [23]. Późniejsze klonowanie 13 kpz fragmentu DNA w *E. coli* [106] pozwoliło na oczyszczenie i określenie struktury wyżej wymienionej mikrocyny. Dziesięć genów uporządkowanych w pięć jednostek transkrypcyjnych jest niezbędnych do biosyntezy MccE492 [54]. Gen *mceA* koduje 99-aminokwasowy prekursor MccE492, a *mceB* białko odpornościowe (chroniące producenta przed działaniem własnej bakteriocyny). Inne geny zaangażowane są w modyfikacje posttranslacyjne. Są to *mceC, mceD i mceI*, kodujące odpowiednio peptydy homologiczne do glikozylotransferazy, esterazy i acylotransferazy [68, 101], jak również gen *mceJ*, który nie ma ewidentnych homologii ze znanymi genami [68]. Dwa kolejne geny *mceG* i *mceH* są niezbędne do eksportu MccE492. Kodują odpowiednio transporter ABC oraz białko pomocnicze. Gen *mceF* jest również zaangażowany w eksport mikrocyny, natomiast funkcja *mceE* pozostaje nieokreślona [54].

W oparciu o wyniki spektrometrii masowej stwierdzono, że MccE492 to niemodyfikowany, 84-aminokwasowy peptyd o charakterze anionowym. Co więcej, aminokwasy wchodzące w skład wspomnianej mikrocyny w większości nie posiadają ładunku i mają charakter hydrofobowy z wyłączeniem histydyny, trzech reszt asparaginianu i jednej glutaminianu [78]. Odcinek C-końcowy bogaty jest w cząsteczki seryny (sekwencja aminokwasowa SGSGYNSATSSSGSGS, Rys. 2). Zmieniając skład podłoża hodowlanego wyizolowano oraz zidentyfikowano posttranslacyjnie zmodyfikowaną mikrocynę E492 nazwaną MccE492m, która jest produkowana zarówno przez typ dziki *K. pneumoniae*, jak i przez rekombinowany szczep *E. coli* VCS257 [98]. Zmodyfikowana mikrocyna E492 posiada w swojej budowie C-glikozylowany, liniowy trimer DHBS (N-(2,3-dihydroksybenzoilo)-L-serynę) związany do grupy karboksylowej seryny w pozycji 84 dzięki wiązaniu O-glikozydowemu. Razem z enterobaktyną (cykliczny trimer DHBS) i salmocheliną (C-glikozylowany

odpowiednik enterobaktyny), DHBS jest jednym z głównych sideroforów katecholowych, dzięki którym bakterie Gram-ujemne wiążą żelazo i importują do wnętrza komórek. Zmodyfikowana mikrocyna wybiórczo wiąże żelazo do fragmentu katecholowego naśladując prawdziwy siderofor. Ponieważ MccE492m wykazuje szersze spektrum aktywności przeciwbakteryjnej oraz działa znacznie silniej na mikroorganizmy wrażliwe (niższy zakres wartości MIC) w porównaniu do MccE492, Thomas i wsp. [98] wysnuli wniosek, że modyfikacja prowadzi do lepszego rozpoznawania oraz większej aktywności przeciwbakteryjnej mikrocyny. Mikrocyna E492m zawierająca siderofor salmochelinowy jest pierwszym członkiem z nowej klasy peptydów przeciwdrobnoustrojowych określanych jest jako peptydy sideroforowe. Postranslacyjna modyfikacja (ugrupowanie sideroforowe) wzmacnia aktywność przeciwbakteryjną MccE492, która jest skierowana głównie przeciwko niektórym enterobakteriom za pośrednictwem receptorów sideroforów typu katecholowego [98]. Co więcej, wyizolowano oraz scharakteryzowano dwie kolejne mikorcyny sideroforowe – M oraz H47 i tym samym dowiedziono istnienia rodziny peptydów antybakteryjnych, produkowanych przez bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* i związanych ze sobą strukturalnie – mikorcyn sideroforowych [100].

5.1.2. MccJ25

Mikrocyna J25 (MccJ25, Rys. 2) odkryta u kałowego szczepu *E. coli* AY25 jest kodowana w plazmidzie pTUC100. Fragment DNA o długości 4,8 kpz, zawierający geny odpowiedzialne za produkcję MccJ25, eksport z komórki i odporność na wspomnianą mikrocynę, został sklonowany i zsekwencjonowany. Gen *mcjA* koduje prekursor MccJ25, podczas gdy *mcjB* i *mcjC* kodują peptydy odpowiedzialne prawdopodobnie za modyfikacje posttranslacyjne McjA. Ostatni gen *mcjD* odpowiedzialny jest zarówno za wydzielanie, jak i odporność na mikrocynę J25 [28].

Mikrocyna J25 jest pierwowzorem peptydów o kształcie lasso, które tworzą rosnącą klasę bioaktywnych peptydów, syntetyzowanych w większości przez proteobakterie i aktinobakterie. Składają się z pierścienia makrolaktamowego zamkniętego pomiędzy N-końcową grupą aminową i boczną grupą karboksylową asparaginianu lub glutaminianu w pozycji 8 lub 9, gdzie zakleszczony jest C-końcowy fragment peptydu w formie luźnego łańcucha tworząc kształt lasso.

Ta szczególna, niefaworyzowana entropowo budowa jest stabilizowana m.in. przez mostki disiarczkowe, które wiążą luźny łańcuch z pierścieniem. MccJ25 jest 21-aminokwasowym peptydem w kształcie lasso: grupa aminowa Gly^{1} połączona jest z boczną grupą karboksylową Glu^{8} wiązaniem laktamowym formując N-końcowy pierścień związany z C-końcowym łańcuchem. Zagięcie lassa jest utrzymywane dzięki bocznym łańcuchom dwóch aromatycznych aminokwasów, Phe^{19} i Tyr^{20}, które zapobiegają jego wysunięciu się z pierścienia. C-końcowy łańcuch jest trwale uwięziony w pierścieniu dzięki oddziaływaniom sterycznym [83]. Taka struktura nadaje mikrocynie J25, jak również innym peptydom w kształcie lasso, niezwykle wysoką stabilność w momencie oddziaływania większości proteaz oraz wysokich temperatur w połączeniu z dużą koncentracją czynników chaotropowych [83]. W bardzo kwaśnym środowisku lub poprzez działanie endopeptydaz dochodzi do przerwania pętli i powstania dwułańcuchowego białka, podczas gdy C-końcowy fragment pozostaje ściśle zakotwiczony w pierścieniu [78].

5.1.3. MccC7-C51

Mikrocyna C7-C51 (w skrócie MccC7-C51, MccC, Rys. 2) jest najmniejszą wyizolowaną dotąd mikrocyną, a dodatkowo jedyną znaną, która przyłącza nukleotyd podczas modyfikacji posttranslacyjnych. MccC7-C51 to N-formylowany heptapeptyd ze związanym kowalencyjnie do C-końcowego asparaginianu zmodyfikowanym adenozynomonofosforanem (AMP) [78].

Mikrocyna C7 została wyizolowana przez Novoa i wsp. [69], którzy stwierdzili, że jest kodowana w plazmidzie pMccC7 o wielkości 43 kpz. Następnie mikrocyna nazwana C51, produkowana przez inny szczep *E. coli*, została wyodrębniona przez Khmela i wsp. [52], a wyizolowany plazmid pMccC51 miał wielkość 38 kpz. W dalszym etapie badań fragmenty DNA o wielkości 6,2 kpz i 5,7 kpz, pochodzące odpowiednio z plazmidu pC7 oraz pC51, zawierające klastry genów odpowiedzialnych za syntezę wyżej wspomnianych mikrocyn, a także ich sekrecją oraz odporność zostały zsekwencjonowane, a geny scharakteryzowane [31, 39]. Okazało się, że sekwencje nukleotydowe genów pochodzących z pC7 oraz pC51 są bardzo zbliżone do siebie. Wchodzące w skład klastrów geny *mccA*, *mccB*, *mccD* i *mccE* odpowiedzialne są za produkcję MccC7 i MccC51, podczas gdy *mccC i mccE* są niezbędne do warunkowania odporności. Ostatni, szósty gen z klastra – *mccF*, jest transkrybowany od przeciwległego końca i w małym stopniu odpowiada za odporność wobec MccC7, natomiast nie spełnia tej roli w przypadku MccC51. Zatem jedyna różnica pomiędzy klastrami genów pochodzących z pC7 oraz pC51 ma związek z kodowaniem odporności. Okazało się ponadto, że microcyny C7 i C51, chociaż kodowane przez dwa różne klastry genów mają identyczną strukturę cząsteczkową [78].

5.2. Mechanizmy działania mikrocyn

5.2.1. MccE492

MccE492 selektywnie hamuje wzrost Gram-ujemnych enterobakterii takich jak: *E. coli*, *Salmonella ente-*

rica, *Enterobacter cloacae* i *K. pneumoniae*. Wartości MIC wynoszą 40–160 nM przeciwko *E. coli* i *S. enterica* [28].

Mikrocyny E492, M i H47 nie są zdolne do zahamowania wzrostu szczepów niosących mutację w genach *fepA, cir* i *fiu* (produktami genów są białka receptorowe FepA, Cir i Fiu), gdyż dla uzyskania aktywności wymagają receptorów żelazowo-katecholowych. Przyłączenie MccE492 poprzez FepA, Fiu i Cir działa na zasadzie kooperacji, jednak głównym receptorem jest FepA [97]. Są to trzy sideroforowe receptory typu katecholowego, które związane są z systemem TonB. Aktywność mikrocyny E492 jest TonB-zależna [98], co znaczy, że wymagany jest występujący w błonie wewnętrznej kompleks TonB-ExbB-ExbD, który wykorzystuje siłę protonomotoryczną z błony plazmatycznej w celu transdukcji energii do błony zewnętrznej i zapewnienie energii do transportu. Bogaty w seryny region C-końcowy nie jest wymagany do funkcjonowania mikrocyny wewnątrz komórki wrażliwej, toteż uważa się, że służy on rozpoznaniu mikrocyny przez receptory katecholowo-sideroforowe FepA, Fiu i Cir. Po wniknięciu do przestrzeni peryplazmatycznej, mikrocyna E492 oddziałuje z komponentami błony wewnętrznej – ManY/ManZ i indukuje formowanie porów oraz depolaryzację błony wewnętrznej powodując śmierć komórki [7]. Nie wiadomo jednak, czy receptory żelazowo-sideroforowe kończą swoje działanie na destabilizacji błony, czy też służą dodatkowo do translokowania mikrocyny [25].

5.2.2. MccJ25

Mikrocyna ta wykazuje silną aktywność bakteriobójczą przeciwko wielu bakteriom należącym do rodziny *Enterobacteriaceae* z MIC w granicach 5–500 nM, m.in. szczepom z rodzajów *Salmonella, Escherichia* oraz *Shigella* [73]. Mikrocyna J25 do swojej aktywności wymaga transportera żelaza FhuA znajdującego się w błonie zewnętrznej [86]. Przeprowadzono eksperyment, w którym zbadano *in vitro* i *in vivo* wzajemne interakcje pomiędzy mikrocyną, a FhuA. W tym celu użyto aktywnej mikrocyny J25 i jej zmodyfikowanej formy uzyskanej dzięki trawieniu termolizyną. Ta modyfikacja sprawia, że mikrocyna traci prawie całkowicie swoją antybakteryjną aktywność. Badania *in vivo* wykazały, że dla prawidłowej aktywności mikrocyny niezbędne są zarówno zewnętrzny receptor błonowy FhuA, jak i kompleks TonB-ExbB-ExbD znajdujący się w błonie wewnętrznej. W przypadku, gdy u szczepu wrażliwego dojdzie do mutacji w genach kodujących FhuA, TonB i ExbB-ExbD, staje się on oporny na mikrocynę [24]. Dodatkowo MccJ25 nie pozwala na zainfekowanie *E. coli* przez faga T5 hamując jego adhezję, co wskazuje na to, że mikrocyna powstrzymuje interakcję pomiędzy fagiem, a receptorem FhuA. Badania *in vitro* potwierdzają te wyniki [78].

Znajdując się w przestrzeni peryplazmatycznej, MccJ25 wchodzi w interakcję z białkiem SbmA [86]. Nie określono precyzyjnie roli wspomnianego białka, ale prawdopodobnie pozwala mikrocynie J25 przekroczyć wewnętrzną błonę bakteryjną. Wewnątrzkomórkowym celem MccJ25 jest polimeraza RNA (RNAP, *RNA Polymerase*). Mikrocyna hamuje proces transkrypcji w komórce bakteryjnej poprzez zablokowanie drugiego kanału doprowadzającego substraty NTP (trifosforany rybonukleozydów) do centrum aktywnego polimerazy RNA [2, 67].

Mikrocyna J25 jest podzielona na dwa regiony: pierścień i łańcuch oraz fragment Val^{11}-Pro^{16} tworzący motyw β-szpilki do włosów, a każdy z wspomnianych regionów odgrywa szczególną rolę w odniesieniu do aktywności antybakteryjnej bakteriocyny. Beta zakręt odpowiada za rozpoznanie przez receptor FhuA, natomiast region pierścień – łańcuch odpowiedzialny jest za inhibicję RNAP [24, 89]. Trwają badania nad krystalizacją kompleksu FhuA – MccJ25 i określeniem sposobu w jaki mikrocyna jest translokowana do przestrzeni peryplazmatycznej [78].

5.2.3. MccC7-C51

Mikrocyna C7-C51 wykazuje bakteriostatyczną aktywność przeciwko kilku gatunkom spośród następujących rodzajów enterobakterii: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* oraz *Proteus* [39, 52]. Hamuje wzrost szczepów *E. coli* w zakresie MIC 100–500 nM [28].

Mikrocyna ta wnika do wnętrza komórki wrażliwej dzięki porynom OmpF i jest aktywnie przemieszczana przez błonę wewnętrzną jedynie dzięki transporterowi ABC – YejABEF. W rzeczywistości mikrocyna ta wykorzystuje N-formylowany heptapeptyd jako kamuflaż, by wniknąć w głąb komórki bakteryjnej i tam się aktywować [63]. Zanim to nastąpi, podlega dwustopniowej modyfikacji. Pierwszy etap zapewnia deformylaza peptydowa, która usuwa N-końcową grupę formylową, drugi następuje dzięki kilku aminopeptydazom o szerokim spektrum działania, których celem jest wiązanie peptydowe Ala^{6}-Asp^{7} i rozszczepienie części białkowej bakteriocyny. W rezultacie, zmodyfikowany związek zostaje uwolniony i pełni rolę potencjalnego inhibitora syntetazy aspartylo-tRNA, co skutkuje zatrzymaniem syntezy białek [64].

Unikalny sposób działania mikrocyny C7-C51, która dopiero wewnątrz komórki docelowej wykazuje swoją aktywność antymikrobiologiczną, czyni z niej bardzo atrakcyjny przedmiot dalszych badań. Szereg analogów MccC7-C51, które wykorzystują mechanizm tzw. konia trojańskiego naśladując naturalną mikrocynę już zostało zsyntetyzowanych chemicznie [103]. Związki te zamiast asparaginianu w pozycji 7 mają wbudowane inne aminokwasy i dlatego mogą działać

na inne syntetazy aminoacylo-tRNA. Rozważa się możliwość tworzenia kolejnych, nowych peptydów antybakteryjnych wywodzących się z mikrocyny C7-C51, charakteryzujących się większą biodostępnością, silniejszą aktywnością antymikrobiologiczną i działających na inne cele wewnątrzkomórkowe [103].

6. Potencjalne zastosowanie kolicyn i mikrocyn

W związku ze wzrostem świadomości konsumentów dotyczącej artykułów spożywczych, producenci żywności stoją przed dużym wyzwaniem, aby produkty przez nich otrzymywane były jak najmniej przetworzone, bez chemicznych dodatków konserwujących, a przy tym miały długi okres przydatności do spożycia. Bakteriocyny stanowią bardzo atrakcyjną opcję, aby choć część tych wymagań była w przyszłości zaspokojona. Stanowią naturalne dodatki do żywności, bo wytwarzane są przez bakterie, które występują w wielu produktach (np. otrzymywanych na drodze fermentacji mlekowej) i były spożywane przez ludzi nieświadomie od dawna [18]. By zastosować bakteriocynę jako potencjalny konserwant żywności, niezbędnym jest by spełniła kilka kryteriów. Po pierwsze, szczep wytwarzający bakteriocynę musi posiadać status GRAS (*Generally Recognized As Safe*). Po drugie, wytwarzana bakteriocyna powinna być termostabilna, odporna na zmiany pH oraz wykazywać szerokie spektrum działania, bądź też aktywność przeciwbakteryjną w stosunku do konkretnego patogenu. Bakteriocyna nie może stanowić ryzyka dla zdrowia konsumenta, a jej dodatek do żywności powinien wpływać na polepszenie bezpieczeństwa, jakości oraz smaku produktu [47]. Dodatek bakteriocyny jako biokonserwanta może być korzystny ze względu na zmniejszenie ryzyka skażenia żywności, redukcję zakażeń krzyżowych w łańcuchu żywnościowym, wydłużenie czasu przydatności produktu do spożycia oraz zmniejszenie ilości innych chemicznych konserwantów, które potencjalnie mogłyby być użyte [35].

Obecnie stosowanymi jako biokonserwanty bakteriocynami są te wytwarzane przez bakterie kwasu mlekowego (LAB). Jednak bakteriocyny bakterii Gram-dodatnich nie hamują lub hamują jedynie w niewielkim stopniu rozwój Gram-ujemnych patogenów. Bakteriocyną stosowaną na skalę przemysłową jest nizyna (E234) wytwarzana przez *L. lactis* i opisana po raz pierwszy w 1928 roku. Została zatwierdzona jako biokonserwant w 1988 roku przez FDA (*Food and Drug Agency*) i jest powszechnie używana w ponad 45 krajach, zgodnie z prawnie obowiązującymi regulacjami [35, 79]. Nizyna wykazuje działanie antagonistyczne w stosunku do szczepów bakterii z rodzajów *Clostridium*, *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Lactococcus* i *Lactobacillus,* jednakże nie hamuje rozwoju bakterii Gram-ujemnych, tj. *Salmonella*, *Escherichia*, *Yersinia* i *Pseudomonas*, chyba że zostaną one dodatkowo potraktowane substancją chelatującą, np. EDTA [21, 96]. Aby poszerzyć spektrum działania podjęto badania nad ekspresją mikrocyny V w komórkach LAB [61]. Stworzono również rekombinantową bakteriocynę, hybrydę enterocyny CRL35 i mikrocyny V, nazwaną Ent35-MccV, która wykazuje aktywność antymikrobiologiczną przeciwko *E. coli* i *L. monocytogenes* [1].

Sable i wsp. [86] badając ekstrakty mleka i mięsa wykazali, że mikrocyna J25 hamuje wzrost szczepów *E. coli* O157:H7 wywołujących biegunki, natomiast Lyon i wsp. [58] zasugerowali rozpylanie kolicyn na produktach żywnościowych i maszynach używanych w przetwórstwie żywności.

Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) probiotyki to żywe drobnoustroje, które podane człowiekowi i zwierzętom w odpowiedniej ilości mają korzystny wpływ na organizm gospodarza [26, 90]. Oczyszczone bakteriocyny albo produkujące je kultury bakterii uważane za probiotyczne mogą redukować liczbę patogenów lub korzystnie wpływać na skład mikroflory jelitowej. Zdecydowana większość bakterii probiotycznych należy do bakterii Gram-dodatnich, jednak wyjątkiem od tej reguły jest np. niepatogenny szczep *E. coli* Nissle 1917 wchodzący w skład preparatów probiotycznych, np. Mutaflor® [110]. Cursino i wsp. [20] wykazali, że szczep *E. coli* H22, produkujący kilka związków o działaniu antybakteryjnym (m.in. kolicyny E1, Ib, mikrocynę C7), hamuje rozwój patogennych i potencjalnie patogennych enterobakterii (*Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*) i mógłby znaleźć zastosowanie jako szczep probiotyczny.

W związku z rosnącą opornością bakterii na klasyczne antybiotyki poszukuje się nowych związków o działaniu antybakteryjnym i bakteriocyny są rozważane jako jedno z alternatywnych rozwiązań wspomnianego problemu. Ponadto ze względu na różny mechanizm działania, połączenie bakteriocyn z niektórymi antybiotykami może pozwolić na uzyskanie synergistycznego efektu [3]. W wyniku fuzji domeny kolicyny Ia, odpowiedzialnej za tworzenie kanałów jonowych, i feromonów Gram-dodatnich bakterii (AgrD1, cCF10), otrzymano nową grupę peptydów antybakteryjnych, które są skuteczne i specyficzne wobec Gram-dodatnich szczepów patogennych, bez toksyczności w stosunku do komórek ssaków [75, 76]. Zihler i wsp. [110] wykazali, że szczep *E. coli* L1000, produkujący mikrocynę B17, może być użyteczny w zwalczaniu infekcji wywołanych przez *Salmonella.* Natomiast Brown i wsp. [11] udowodnili, że niektóre kolicyny charakteryzują się aktywnością antybakteryjną skierowaną przeciwko adherentno-inwazyjnym szczepom *E. coli* (AIEC) wyizolowanym z przewodu pokar-

mowego pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna i mogą być rozważane jako potencjalne terapeutyki.

Odrębną grupą badań nad bakteriocynami bakterii Gram-ujemnych jest sprawdzenie możliwości zastosowania ich w terapii antynowotworowej. Doświadczenia te zapoczątkowano ponad 30 lat temu, kiedy zaobserwowano, że kolicyna E3 działa cytotoksycznie na komórki HeLa [93]. Od tamtego czasu wiadomo, że niektóre kolicyny wywierają efekt letalny na komórki nowotworowe, chociaż nie jest jasne czy mechanizm działania jest identyczny jak w przypadku wrażliwych komórek bakteryjnych. Wykazano, że proliferacja komórek białaczki mysiej linii P388 jest zahamowana przez kolicynę E3 [33]. Wspomniana linia komórkowa została również poddana działaniu kolicyn D, E2 oraz A. Stwierdzono, że żywotność komórek ulegała obniżeniu w przypadku wszystkich zastosowanych bakteriocyn, przy czym najsilniejszy efekt był widoczny po zastosowaniu kolicyny A [94]. Badano również wpływ kolicyn E1 i E3 na transformowane *v-myb* monoblasty. W tym przypadku także zaobserwowano spadek żywotności testowanych komórek [92]. W innych badaniach wykazano, że kolicyny A i E1 charakteryzują się aktywnością cytotoksyczną wobec 11 ludzkich nowotworowych linii komórkowych [16]. Pozostałe testowane w doświadczeniu kolicyny (E3 i U) nie wpływały istotnie na badane linie komórkowe. Aktywność cytotoksyczna była silnie zróżnicowana w zależności od rodzaju kolicyny, jak i linii komórek nowotworowych. Kolicyna A charakteryzowała się największą aktywnością cytotoksyczną, ale również hamowała wzrost normalnych fibroblastów linii MRC5. Kolicyna E1 działała słabiej, zarówno na komórki nowotworowe, jak i normalne fibroblasty. Farkas-Himsley i Cheung [30] badali oddziaływanie bakteriocyn, w tym kolicyn na rozmaite komórki bakteryjne i eukariotyczne. Dowiedziono, że kolicyny wywierają silniejszy wpływ na komórki nowotworowe niż normalne, przy czym zwierzęce komórki nowotworowe były bardziej wrażliwe na działanie bakteriocyn niż ludzkie. Wiadomo również, że niektóre mikrocyny (np. E492) mogą indukować apoptozę w pewnych ludzkich liniach komórkowych [45]. Wyniki innych badań sugerują, że obecność kolicyn, produkowanych przez szczepy bakterii występujące w przewodzie pokarmowym, może być jednym z czynników ograniczających rozwój raka jelita grubego [12]. W przypadku osób zdrowych stwierdzono, że 63,8% badanych posiadało w przewodzie pokarmowym szczepy *E. coli* wytwarzające bakteriocyny, podczas gdy u chorych na raka jelita grubego szczepy te wykryto jedynie u 41,6% badanych. Wydaje się zatem, że potencjalnym sposobem zapobiegania tego typu nowotworom mogłaby być suplementacja probiotykami produkującymi bakteriocyny. Kolicyny mogłyby być rozważane jako leki antynowotworowe o umiarkowanym potencjale [55, 108].

Intensywnie bada się również możliwość zastosowania bakteriocyn bakterii Gram-ujemnych w hodowli zwierząt. Żywy inwentarz może zostać zainfekowany przez niezliczone patogenne mikroorganizmy, wśród których znajdują się i takie, które mogą zakazić organizm ludzki. Zjadliwe szczepy *E. coli* (np. O157:H7) oraz *Salmonella enteritidis* wywołują infekcje jelitowe zarówno u ludzi, jak i zwierząt, i są mikroorganizmami w zwalczaniu których wymagana jest terapia przeciwbakteryjna [5]. *Salmonella* i *Campylobacter* są przyczyną ponad 90% wszystkich przypadków zakażenia żywności na świecie [99].

Hodowcy zajmujący się żywym inwentarzem stosują szereg antybiotyków, np.: penicylinę, fluorochinolony lub tetracyklinę w celu zwalczenia powszechnych infekcji bakteryjnych. Co więcej, specyfiki te często stosowane są profilaktycznie i wspomagająco, przez co działają nie tylko na szczepy zjadliwe, ale także na komensale żyjące w jelitach zwierząt [5]. Bardzo ważną kwestią jest ograniczenie stosowanie tradycyjnych antybiotyków, aby szczepy nie zyskiwały na nie oporności. W tym celu pracuje się nad wieloma strategiami, które mają polepszyć zdrowie zwierząt oraz wydajność i bezpieczeństwo mikrobiologiczne żywności bez zastosowania antybiotyków.

Istnieje wiele obaw zarówno o zdrowie publiczne, jak i ze względów ekonomicznych o wybuch chorób spowodowanych przez mikrobiologiczne zakażenie drobiu i jaj przez szczepy *S. enterica,* które są częstym kontaminantem i powszechnym patogenem wywołującym nieżyt żołądka i jelit [22, 99]. W celu zahamowania rozprzestrzeniania się, jak również eliminacji bakterii *Salmonella* z drobiu, do paszy piskląt dodaje się naturalną florę bakteryjną występującą w jelitach kur, a dodatkowo podaje się niezjadliwe mutanty tej bakterii, które konkurencyjnie zapobiegają kolonizacji przez szczepy wirulentne. Próby *in vitro* wskazują, że mikrocyny produkowane przez szczepy *E. coli* hamują wzrost patogennych szczepów *Salmonella*. Nawet na podłożu ubogim w składniki pokarmowe, w warunkach zakwaszenia oraz w obecności żółci i enzymów proteolitycznych szczepy *E. coli* mogą produkować mikrocyny [73, 107].

U bydła, żwacz jest głównym rezerwuarem Gram-ujemnego szczepu *E. coli* O157:H7, który wytwarza toksynę Shiga wywołującą u ludzi ostre biegunki i bardzo groźny, szczególnie u niemowląt, zespół hemolityczno-mocznicowy [71]. Zakażenie człowieka bakteriami STEC (*Shiga toxin-producing E. coli*) następuje głównie na skutek spożycia zanieczyszczonej żywności (mleka, sera, niedogotowanego mięsa) lub wody, a także poprzez bezpośredni kontakt z nosicielami. Zastosowanie terapii antybiotykowej powoduje, że bakterie produkują nadmierne ilości tej toksyny, co zwiększa zjadliwość szczepu producenta [104]. Niektóre kolicynogenne szczepy *E. coli* wykazują zdolność

hamowania rozwoju enterokrwotocznych szczepów *E. coli* [87]. Odkryto, że zaaplikowanie bakterii wytwarzających kolicyny do żwacza znacznie redukuje poziom patogenów jelitowych u bydła [38]. Bakterie *E. coli* wytwarzające kolicynę E7 hamują kolonizację przez patogenny szczep *E. coli* O157:H7 po podaniu go cielętom w formie szczepienia [88]. W innych badaniach Jordi i wsp. [51] testowali wpływ 20 kolicynogennych szczepów *E. coli* na rozwój 5 szczepów *E. coli* wytwarzających toksynę Shiga (O26, O111, O128, O145 i O157:H7). W symulowanym środowisku żwacza, kolicyny E1, E4, E8-J, K i S4 znacząco ograniczały wzrost szczepów wytwarzających toksynę Shiga. Kolejnym obiecującym szczepem jest produkująca mikrocynę B17 *E. coli* Nissle 1917, której obecność prowadzi do zmniejszenia o połowę częstości występowania biegunek u bydła [102].

7. Podsumowanie

Od ostatnich niemalże stu lat trwają intensywne badania nad bakteriocynami wykazującymi działanie przeciwdrobnoustrojowe, produkowanymi przez Gram-ujemne bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae.* Wśród nich wyróżnić można duże białka o masie 25–80 kDa, nazwane kolicynami oraz mikrocyny – peptydy o niskiej masie , wahającej się od 1–10 kDa. Informacja genetyczna zawarta w klastrach genowych kolicyn, jak i mikrocyn determinuje ich produkcję, eksport oraz odporność. Wszystkie do dziś odkryte kolicyny kodowane są w plazmidach, w przeciwieństwie do mikrocyn, wśród których te należące do klasy IIb kodowana są chromosomalnie.

Inaczej niż w przypadku mikrocyn, głównym mechanizmem indukującym produkcję kolicyn jest system SOS, który stanowi część systemu kontroli ekspresji genów, naprawiającego uszkodzenia DNA. Może być aktywowany pod wpływem stresu środowiskowego, np. promieniowania UV lub ekspozycji na inne czynniki uszkadzające DNA. Z kolei synteza mikrocyn przeważnie indukowana jest w wyniku redukcji składników odżywczych.

Jedną z ważniejszych różnic pomiędzy mikrocynami i kolicynami, pomijając oczywistą rozbieżność w przypadku mas cząsteczkowych obu grup związków, jest ich struktura. W przeciwieństwie do kolicyn, mikrocyny mogą podlegać modyfikacjom posttranslacyjnym. Klaster genowy kolicyn jest wysoce konserwatywny, a w obrębie ich struktury można wyróżnić trzy domeny odpowiedzialne za związanie kolicyny z odpowiednim receptorem, translokację do wnętrza komórki wrażliwej i aktywność antybakteryjną. Zarówno kolicyny, jak i mikrocyny mają wąskie spektrum działania i wykazują aktywność antymikrobiologiczną przeciwko szczepom filogenetycznie spokrewnionym ze szczepem producenta.

Opisane w artykule mikrocyny (E492, J25, C7-C51) wykorzystują niezwykle złożone mechanizmy działania typu tzw. konia trojańskiego. Łączą się z receptorami, dzięki którym komórka wrażliwa pobiera ze środowiska niezbędne substancje (receptory żelazowo-sideroforowe), albo używają pewnego rodzaju kamuflażu w celu swobodnego wniknięcia w głąb komórki docelowej, która rozpoznaje je, jako substancje nieszkodliwe. Dopiero po wniknięciu wnętrza komórki docelowej, stają się substancjami szkodliwymi dla komórek wrażliwych. Powyższe strategie różnią się od tych wykorzystywanych przez bakteriocyny bakterii Gram-dodatnich [28, 78].

Trwające od wielu lat badania nad bakteriocynami bakterii Gram-ujemnych pozwoliły odkryć zasady ich syntezy, budowę molekularną, stabilność, jak również mechanizmy, za pomocą których oddziałują na komórki bakteryjne. Od pewnego czasu wielką uwagę poświęca się na badanie ich potencjalnego zastosowania antymikrobiologicznego w przetwórstwie żywnościowym, ale także w medycynie i hodowli zwierząt. Jedno jest natomiast pewne, im więcej dowiadujemy o tej fascynującej rodzinie toksyn, tym większy zdaje się być ich potencjał, który w przyszłości pozwoliłby stawić czoła wielu ludzkim wyzwaniom związanym ze zdrowiem, rolnictwem i przemysłem żywieniowym.

Piśmiennictwo

1. Acuña L., Picariello G., Sesma F., Morero R.D., Bellomio A.: A new hybrid bacteriocin, Ent35-MccV, displays antimicrobial activity against pathogenic Gram-positive and Gram-negative bacteria. *FEBS Open Bio.* **2**, 12–19 (2012)
2. Adelman K., Yuzenkova J., La Porta A., Zenkin N., Lee J., Lis J.T., Borukhov S., Wang M.D., Severinov K.: Molecular mechanism of transcription inhibition by peptide antibiotic microcin J25. *Mol. Cell*, **14**, 753–762 (2004)
3. Balciunas E.M., Castillo Martinez F.A., Todorov S.D., Gombossy de Melo Franco B.D., Converti A., Prinheiro de Souza Oliveira R.: Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control,* **32**, 134–142 (2013)
4. Baquero F., Moreno F.: The microcins. *FEMS Microbiol. Lett.* **23**, 117–124 (1984)
5. Barton M.D., Hart W.S.: Public health risks: Antibiotic resistance – review. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* **14**, 414–422 (2001)
6. Bénédetti H., Lloubès R., Lazdunski C., Letellier L.: Colicin A unfolds during its translocation in *Escherichia coli* cells and spans the whole cell envelope when its pore has formed. *EMBO J.* **11**, 441–447 (1992)
7. Bieler S., Silva F., Soto C., Belin D.: Bactericidal activity of both secreted and nonsecreted microcin E492 requires the mannose permease. *J. Bacteriol.* **188**, 7049–7061 (2006)
8. Blaser M.: Antibiotic overuse: Stop the killing of beneficial bacteria. *Nature*, **476**, 393–394 (2011)
9. Błaszczyk U.: Bakteriocyny – właściwości i zastosowanie. *Laboratorium przemysłowe*, **10**, 28–32 (2008)

10. Braun V., Pilsl H., Gross P.: Colicins: structures, modes of action, transfer through membranes, and evolution. *Arch. Microbiol.* **161**, 199–206 (1994)
11. Brown C.L., Smith K., Wall D.M., Walker D.: Activity of species--specific antibiotics against Crohn's disease-associated adherent--invasive *Escherichia coli*. *Inflamm. Bowel Dis.* **21**, 2372–2382 (2015)
12. Bures J., Horák V., Fixa B., Komárková O., Zaydlar K., Lonský V., Masurka V.: Colicinogeny in colorectal cancer. *Neoplasma*, **33**, 233–237 (1986)
13. Cascales E., Buchanan S.K., Duché D., Kleanthous C., Lloubès R., Postle K., Riley M., Slatin S., Cavard D.: Colicin biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. **71**, 158–229 (2007)
14. Cavard D., Lloubès R., Morlon J., Chartier M., Lazdunski C.: Lysis protein encoded by plasmid ColA-CA31. Gene sequence and export. *Mol. Gen. Genet.* **199**, 95–100 (1985)
15. Chavan M.A., Riley M.A.: Molecular evolution of bacteriocins in Gram-negative bacteria (w) Bacteriocins: Ecology and Evolution, red. M.A. Riley, M.A. Chavan, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007, s. 19–43
16. Chumchalová J., Smarda J.: Human tumor cells are selectively inhibited by colicins. *Folia Microbiol.* **48**, 111–115 (2003)
17. Cleveland J., Montville T.J., Nes I.F., Chikindas M.L.: Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **71,** 1–20 (2001)
18. Cotter P.D., Hill C., Ross R.P.: Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 777–788 (2005)
19. Cotter P.D., Ross R.P., Hill C.: Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics? *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 95–105 (2013)
20. Cursino L., Smajs D., Smarda J., Nardi R.M., Nicoli J.R., Chartone-Souza E., Nascimento A.M.: Exoproducts of the *Escherichia coli* strain H22 inhibiting some enteric pathogens both in vitro and in vivo. *J. Appl. Microbiol.* **100**, 821–829 (2006)
21. Cutter C.N., Siragusa G.R.: Treatments with nisin and chelators to reduce *Salmonella* and *Escherichia coli* on beef. *J. Food Prot.* **58**, 1028–1030 (1995)
22. Daniels N.A., MacKinnon L., Rowe S.M., Griffin P.M., Mead P.S.: Foodborne disease outbreaks in United States schools. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **21**, 623–628 (2002)
23. de Lorenzo V.: Isolation and characterization of microcin E492 from *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* **139**, 72–75 (1984)
24. Destoumieux-Garzón D., Duquesne S., Peduzzi J., Goulard C., Desmadril M., Letellier L., Rebuffat S., Boulanger P.: The iron--siderophore transporter FhuA is the receptor for the antimicrobial peptide microcin J25: role of the microcin Val^{11}-Pro^{16} β-hairpin region in the recognition mechanism. *Biochem. J.* **389**, 869–876 (2005)
25. Destoumieux-Garzón D., Peduzzi J., Thomas X., Djediat C., Rebuffat S.: Parasitism of iron-siderophore receptors of *Escherichia coli* by the siderophore-peptide microcin E492m and its unmodified counterpart. *Biometals*, **19**, 181–191 (2006)
26. Dobson A., Cotter P.D., Ross R.P., Hill C.: Bacteriocin Production: a Probiotic Trait? *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 1–6 (2012)
27. Duché D., Letellier L., Géli V., Bénédetti H., Baty D.: Quantification of group A colicin import sites. *J. Bacteriol.* **177**, 4935–4939 (1995)
28. Duquesne S., Destoumieux-Garzón D., Peduzzi J., Rebuffat S.: Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat. Prod. Rep*. **24**, 708–734 (2007)
29. Eraso J.M., Chidambaram M., Weinstock G.M.: Increased production of colicin E1 in stationary phase. *J. Bacteriol.* **178**, 1928–1935 (1996)
30. Farkas-Himsley H., Cheung R.: Bacterial proteinaceous products (bacteriocins) as cytotoxic agent of neoplasia. *Cancer Res.* **36**, 3561–3567 (1976)
31. Fomenko D.E., Metlitskaya A.Z., Péduzzi J., Goulard C., Katrukha G.S., Gening L.V., Rebuffat S., Khmel I.A.: Microcin C51 plasmid genes: possible source of horizontal gene transfer. *Antimicrob. Agents Chemother*. **47**, 2868–2874 (2003)
32. Fredericq P**.** Sur la pluralité des récepteurs d'antibiose de *E. coli*. *C.R. Soc. Biol.* **140**, 1189–1194 (1946)
33. Fuska J., Fuskova A., Smarda J., Mach J.: Effect of colicin E3 on leukemia cells P388 in vitro. *Experientia*, **35**, 406–407 (1978)
34. Gaillard-Gendron S., Vignon D., Cottenceau G., Graber M., Zorn N., van Dorsselaer A., Pons A.M.: Isolation, purification and partial amino acid sequence of a highly hydrophobic new microcin named microcin L produced by *Escherichia coli*. FEMS *Microbiol. Lett.* **193**, 95–98 (2000)
35. Gálvez A., López R.L., Abriouel H., Valdivia E., Omar N.B.: Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* **28**, 125–152 (2008)
36. Gao Y., Li D., Liu S., Zhang L.: Garviecin LG34, a novel bacteriocin produced by *Lactococcus garvieae* isolated from traditional Chinese fermented cucumber. *Food Control*, **50,** 896–900 (2015)
37. Ghadbane M., Harzallah D., Laribi A.I., Jaouadi B., Belhadj H.: Purification and biochemical characterization of a highly thermostable bacteriocin isolated from *Brevibacillus brevis* strain GM100. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **77**, 151–160 (2013)
38. Gillor O., Kirkup B.C., Riley M.A.: Colicins and microcins: the next generation antimicrobials. *Adv. Appl. Microbiol.* **54**, 129–146 (2004)
39. González-Pastor J.E., San Millán J.L., Castilla M.A., Moreno F.: Structure and organization of plasmid genes required to produce the translation inhibitor microcin C7. *J. Bacteriol.* **177**, 7131–7140 (1995)
40. Gordon D.M., Oliver E., Littlefield-Wyer J.: The diversity of bacteriocins in Gram-negative bacteria (w) Bacteriocins: Ecology and Evolution, red. M. A. Riley, M. A. Chavan, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2007, s. 5–18
41. Gratia A., Fredericq P.: Diversité des souches antibiotiques de *Bacterium coli* et étendue variable de leur champ d'action. *C. R. Soc. Biol*. **140**, 1032–1033 (1946)
42. Gratia A.: Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *C. R. Soc. Biol.* **93**, 1040–1042 (1925)
43. Güllüce M., Karaday M., Barış Ö.: Bacteriocins: promising natural antimicrobials (w) Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Red. A. Méndez-Vilas, Formatex Research Center, Badajoz, Spain, 2013, s. 1016–1027
44. Gwiazdowska D., Trojanowska K.: Bakteriocyny – właściwości i aktywność przeciwdrobnoustrojowa. *Biotechnologia*, **1,** 114–130 (2005)
45. Hetz C., Bono M.R., Barros L.F., Lagos R. Microcin E492, a channel-forming bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae*, induces apoptosis in some human cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **99**, 2696–2701 (2002)
46. H-Kittikun A., Biscola V., El-Ghaish S., Jaffrès E., Dousset X., Pillot G., Haertlé T., Chobert J.M., Hwanhlem N.: Bacteriocin--producing *Enterococcus faecalis* KT2W2G isolated from mangrove forests in southern Thailand: Purification, characterization and safety evaluation. *Food Control*, **54**, 126–134 (2015)
47. Holzapfel W. H., Geisen R., Schillinger U.: Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.* **24**, 343–362 (1995)
48. Jachna-Sawicka K.G., Gospodarek E., Bugalski R.M.: Bakteriocyny pałeczek z rodzaju *Pseudomonas*. *Post. Mikrobiol.* **44**, 17–27 (2005)

49. Jakes K.S., Zinder N.: Highly purified colicin E3 contains immunity protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 3380–3384 (1974)
50. James R., Kleanthous C., Moore G.R.: The biology of E colicins: paradigms and paradoxes. *Microbiology*, **142**, 1569–1580 (1996)
51. Jordi B.J., Boutaga K., van Heeswijk C.M., van Knapen F., Lipman L.J.: Sensitivity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains for colicins under different experimental conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* **204**, 329–334 (2001)
52. Khmel I.A., Bondarenko V.M., Manokhina I.M., Basyuk E.I., Metlitskaya A.Z., Lipasova V.A., Romanova Y.M.: Isolation and characterization of *Escherichia coli* strains producing microcins B and C types. *FEMS Microbiol. Lett.* **111**, 269–274 (1993)
53. Klaenhamer T.R.: Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev*. **12**, 39–85 (1993)
54. Lagos R., Baeza M., Corsini G., Hetz C., Strahsburger E., Castillo J.A., Vergara C., Monasterio O.: Structure, organization and characterization of the gene cluster involved in the production of microcin E492, a channel-forming bacteriocin. *Mol. Microbiol.* **42**, 229–243 (2001)
55. Lancaster L.E., Wintermeyer W., Rodnina M.V.: Colicins and their potential in cancer treatment. *Blood Cells Mol. Dis*. **38**, 15–18 (2007)
56. Lü X., Hu P., Dang Y., Liu B.: Purification and partial characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* TN-2 isolated from fermented camel milk (Shubat) of Xinjiang Uygur Autonomous region, China. *Food Control*, **43**, 276–283 (2014)
57. Lü X., Yi L., Dang J., Dang Y., Liu B.: Purification of novel bacteriocin produced by *Lactobacillus coryniformis* MXJ 32 for inhibiting bacterial foodborne pathogens including antibiotic--resistant microorganisms. *Food Control*, **46**, 264–271 (2014)
58. Lyon W.J., Olson D.G., Murano E.A.: Method and colicin composition for inhibiting *Escherichia coli* 0157:H7 in food products. US Patent 05549895, Iowa State University Research Foundation, Iowa, USA, 1996
59. Maqueda M., Gálvez A., Bueno M.M., Sanchez-Barrena M.J., González C., Albert A., Rico M., Valdivia E.: Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. *Curr. Protein Pept. Sci.* **5**, 399–416 (2004)
60. Martinez R.C., Wachsman M., Torres N.I., LeBlanc J.G., Todorov S.D., Franco B.D.: Biochemical, antimicrobial and molecular characterization of a noncytotoxic bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST71KS. *Food Microbiol.* **34**, 376–381 (2013)
61. McCormick J.K., Klaenhammer T.R., Stiles M.E.: Colicin V can be produced by lactic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* **29**, 37–41 (1999)
62. Messaoudi S., KergourlayG., Dalgalarrondo M., Choiset Y., Ferchichi M., Prévost H., Pilet M.F., Chobert J.C., Manai M., Dousset X.: Purification and characterization of a new bacteriocin active against *Campylobacter* produced by *Lactobacillus salivarius* SMXD51. *Food Microbiol.* **32**, 129–134 (2012)
63. Metlitskaya A., Kazakov T., Kommer A., Pavlova O., Praetorius--Ibba M., Ibba M., Krasheninnikov I., Kolb V., Khmel I., Severinov K.: Aspartyl-tRNA synthetase is the target of peptide nucleotide antibiotic microcin C. *J. Biol. Chem.* **281**, 18033–18042 (2006)
64. Metlitskaya A., Kazakov T., Vondenhoff G.H., Novikova M., Shashkov A., Zatsepin T., Semenova E., Zaitseva N., Ramensky V., Van Aerschot A., Severinov K.: Maturation of the translation inhibitor microcin C. *J. Bacteriol.* **191**, 2380–2387 (2009)
65. Miao J., Guo H., Ou Y., Liu G., Fang X., Liao Z., Ke C., Chen Y., Zhao L., Cao Y.: Purification and characterization of bacteriocin F1, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. tolerans FX-6 from Tibetan kefir, a traditional fermented milk from Tibet, China. *Food Control*, **42**, 48–53 (2014)
66. Molisch H.: Der Einfluss einer Pflanze auf die andere-Allelopathie. Fischer, Jena, 1937
67. Mukhopadhyay J., Sineva E., Knight J., Levy R.M., Ebright R.H.: Antibacterial peptide microcin J25 inhibits transcription by binding within and obstructing the RNA polymerase secondary channel. *Mol. Cell*, **14**, 739–751 (2004)
68. Nolan E.M., Fischbach M.A., Koglin A., Walsh C.T.: Biosynthetic tailoring of microcin E492m: post-translational modification affords an antibacterial siderophore-peptide conjugate. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 14336–14347 (2007)
69. Novoa M.A., Diaz-Guerra L., San Millan J.L., Moreno F.: Cloning and mapping of the genetic determinants for microcin C7 production and immunity. *J. Bacteriol*. **168**, 1384–1391 (1986)
70. Pei J., Yuan Y., Yue T.: Primary characterization of bacteriocin paracin C – A novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei*. *Food Control*, **34**, 168–176 (2013)
71. Phillips C.A.: The epidemiology, detection, and control of *Escherichia coli* O157. *J. Sci. Food Agric*. **79**, 1367–1381 (1999)
72. Pons A.M., Lanneluc I., Cottenceau G., Sable S.: New developments in non-post translationally modified microcins. *Biochimie*, **84**, 531–537 (2002)
73. Portrait V., Gendron-Gaillard S., Cottenceau G., Pons A.M.: Inhibition of pathogenic *Salmonella enteritidis* growth mediated by *Escherichia coli* microcin J25 producing strains. *Can. J. Microbiol.* **45**, 988–994 (1999)
74. Pugsley A.P.: The ins and outs of colicins. I. Production, and translocation across membranes. *Microbiol. Sci.* **1**, 168–175 (1984)
75. Qiu X.Q., Wang H., Lu X.F., Zhang J., Li S.F., Cheng G., Wan L., Yang L., Zuo J.Y., Zhou Y.Q., Wang H.Y., Cheng X., Zhang S.H., Ou Z.R., Zhong Z.C., Cheng J.Q., Li Y.P., Wu G.Y.: An engineered multidomain bactericidal peptide as a model for targeted antibiotics against specific bacteria. *Nat. Biotechnol*. **21**, 1480–1485 (2003)
76. Qiu X.Q., Zhang J., Wang H., Wu G.Y.: A novel engineered peptide, a narrow-spectrum antibiotic, is effective against vancomycin-resistant Enterococcus faecalis. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**, 1184–1189 (2005)
77. Rebuffat S.: Bacteriocins from Gram-negative bacteria: a classification? (w) Prokaryotic Antimicrobial Peptides, red. D. Drider, S. Rebuffat, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2011, s. 55–72
78. Rebuffat S.: Microcins in action: amazing defence strategies of Enterobacteria. *Biochem. Soc. Trans.* **40**, 1456–1462 (2012)
79. Riley M.A.: Bacteriocins, biology, ecology, and evolution (w) Encyclopedia of Microbiology, red. M. Schaechter, Elsevier, Oxford, 2009, s. 32–44
80. Riley M.A., Gordon D.M.: The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends Microbiol.* **7**, 129–133 (1999)
81. Riley M.A., Gordon D.M.: The ecology and evolution of bacteriocins. *J. Ind. Microbiol.* **17**, 151–158 (1996)
82. Riley M.A., Wertz J.E.: Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu. Rev*. *Microbiol.* **56**, 117–137 (2002)
83. Rosengren K.J., Blond A., Afonso C., Tabet J.C., Rebuffat S., Craik D.J.: Structure of thermolysin cleaved microcin J25: extreme stability of a two-chain antimicrobial peptide devoid of covalent links. *Biochemistry*, **43**, 4696–4702 (2004)
84. Sable S., Pons A.M., Gendron-Gaillard S., Cottenceau G.: Antibacterial activity evaluation of microcin J25 against diarrheagenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4595–4597 (2000)
85. Salles B., Weisemann J.M., Wfanstock G.M.: Temporal control of colicin E1 induction. *J. Bacteriol*. **169**, 5028–5034 (1987)
86. Salomón R.A., Farías R.N.: The FhuA protein is involved in microcin 25 uptake. *J. Bacteriol.* **175**, 7741–7742 (1993)
87. Schamberger G.P., Diez-Gonzalez F.: Characterization of colicinogenic *Escherichia coli* strains inhibitory to enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Food Prot*. **67**, 486–492. (2004)

88. Schamberger G.P., Phillips R.L., Jacobs J.L., Diez-Gonzalez F.: Reduction of Escherichia coli O157:H7 populations in cattle by addition of colicin E7-producing E. coli to feed. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 6053–6060 (2004)
89. Semenova E., Yuzenkova Y., Peduzzi J., Rebuffat S., Severinov K.: Structure – activity analysis of microcin J25: distinct parts of the threaded lasso molecule are responsible for interaction with bacterial RNA polymerase. *J. Bacteriol.* **187**, 3859–3863 (2005)
90. Słońska A., Klimuszko D.: Bakteriocyny probiotycznych pałeczek z rodzaju Lactobacillus. Post. Mikrobiol. **49**, 87–96 (2010)
91. Šmajs D.: The morphology of bacterial cell in inhibition zones produced by colicins. *Scripta medica*, **68**, 171–180 (1995)
92. Smarda J., Fialova M., Smarda J.: Cytotoxic effects of colicins E1 and E3 on v-myb-transformed chicken monoblasts. *Folia Microbiol.* (*Praha*), **47**, 11–13 (2001)
93. Smarda J., Obdrzalek V.: The lethal effect of colicin E3 on HeLa cells in tissue cultures. *IRCS J. Med. Sci*. **5**, 524 (1977)
94. Smarda J., Oravec C.: Cytocidal effect of bacteriocin on lymphoma cells. *Akt. Klin. Onkol.* **21**, 209–212 (1989)
95. Smarda J., Šmajs D.: Colicins – exocellular lethal proteins of *Escherichia coli*. *Folia Microbiol.* **43**, 563–582 (1998)
96. Stevens K.A., Sheldon B.W., Klapes N.A. Klaenhammer T.R.: Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* and other Gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 3613–3615 (1991)
97. Strahsburger E., Baeza M., Monasterio O, Lagos R.: Cooperative uptake of microcin E492 by receptors FepA, Fiu, and Cir and inhibition by the siderophore enterochelin and its dimeric and trimeric hydrolysis products. Antimicrob. Agents Chemother. **49**, 3083–3086 (2005)
98. Thomas X., Destoumieux-Garzón D., Péduzzi J., Afonso C., Blond A., Birlirakis N., Goulard C., Dubost L., Thai R., Tabet J.C., Rebuffat S.: Siderophore peptide, a new type of post-translationally modified antibacterial peptide with potent activity. *J. Biol. Chem*. **279**, 28233–28242 (2004)
99. Trevejo R.T., Courtney J.G., Starr M., Vugia D.J.: Epidemiology of salmonellosis in California, 1990–1999: morbidity, mortality, and hospitalization costs. *Am. J. Epidemiol.* **157**, 48–57 (2003)
100. Vassiliadis G., Destoumieux-Garzón D., Lombard C., Rebuffat S., Peduzzi J.: Isolation and characterization of two members of the siderophore-microcin family, microcins M and H47. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 288–297 (2010)
101. Vassiliadis G., Peduzzi J, Zirah S., Thomas X., Rebuffat S., Destoumieux-Garzón D.: Insight into siderophore-carrying peptide biosynthesis: enterobactin is a precursor for microcin E492 posttranslational modification. *Antimicrob. Agents Chemother*. **51**, 3546–3553 (2007)
102. von Buenau R., Jaekel L., Schubotz E., Schwarz S., Stroff T., Krueger M.: Escherichia coli strain Nissle 1917: significant reduction of neonatal calf diarrhea. *J. Dairy Sci.* **88**, 317–323 (2005)
103. Vondenhoff G.H.M., Dubiley S., Severinov K., Lescrinier E., Rozenski J., Van Aerschot A.: Extended targeting potential and improved synthesis of Microcin C analogs as antibacterials. *Bioorg. Med. Chem*. **19**, 5462–5467 (2011)
104. Walterspiel J.N., Ashkenazi S., Morrow A.L., Cleary T.G.: Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on extracellular Shiga-like toxin. *Infection*, **20**, 25–29 (1992)
105. Wannun P., Piwat S., Teanpaisan R.: Purification and characterization of bacteriocin produced by oral *Lactobacillus paracasei* SD1. *Anaerobe*, **27**, 17–21 (2014)
106. Wilkens M., Villanueva J.E., Cofré J., Chnaiderman J., Lagos R.: Cloning and expression in *Escherichia coli* of genetic determinants for production of and immunity to microcin E492 from *Klebsiella pneumonia*. *J. Bacteriol*. **179**, 4789–4794 (1997)
107. Wooley R.E., Gibbs P.S., Shotts E.B.: Inhibition of *Salmonella typhimurium* in the chicken intestinal tract by a transformed avirulent avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.* **43**, 245–250 (1999)
108. Yang S.-C., Lin C.-H., Sung C.T., Fang J.-Y.: Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Front. Microbiol*. **5**, 241 (2014)
109. Zhu X., Zhao Y., Sun Y., Gu Q.: Purification and characterisation of plantaricin ZJ008, a novel bacteriocin against *Staphylococcus* spp. from *Lactobacillus plantarum* ZJ008. *Food Chem.* **165**, 216–223 (2014)
110. Zihler A., Le Blay G., De Wouters T., Lacroix C., Braegger C.P., Lehner A., Tischler P., Rattei T., Hächler H., Stephan R.: *In vitro* inhibition activity of different bacteriocin-producing *Escherichia coli* against *Salmonella* strains isolated from clinical cases. *Lett. Appl. Microbiol.* **49**, 31–38 (2009)

POST. MIKROBIOL.,
2016, 55, 2, 172–181
http://www.pm.microbiology.pl

SKUTECZNOŚĆ WYKORZYSTANIA NISKOTEMPERATUROWEJ PLAZMY W MIKROBIOLOGII I MEDYCYNIE

Maria Laskowska[1], Elżbieta Bogusławska-Wąs[1]*, Patrycja Kowal[1], Marcin Hołub[2], Waldemar Dąbrowski[1]

[1] Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii Stosowanej
[2] Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Katedra Elektroenergetyki i Napędów Elektrycznych

Wpłynęło w sierpniu 2015 r.
Zaakceptowano w styczniu 2016 r.

1. Wstęp. 2. Mechanizm działania zimnej plazmy na mikroorganizmy. 2.1. Efektywność działania sterylizującego. 3. Zastosowanie zimnej plazmy w medycynie. 4. Podsumowanie

Efficiency of using non-thermal plasma in microbiology and medicine

Abstract: Plasma is a partially or totally ionized gas which occurs in nature (e.g. lightning discharge, outer space), but can be also created in the laboratory conditions. Non-thermal plasma generates free radicals of oxygen, nitrogen, high energy electrons and uncharged particles such as atoms and molecules, in aquatic and gas environment. Thus, plasma exerts its effect on both prokaryotic and eukaryotic cells. In many studies, non-thermal plasma was applied mainly to achieve the sterilization effects of e.g. surfaces and medical tools. The results obtained were largely dependent upon the applied parameters of plasma (e.g. frequency, voltage, type of gas). Non-thermal plasma can be applied in microbiology and also in medicine where it can be used to speed up wound healing process or as an effective tool in oncology.

1. Introduction. 2. Plasma action on microorganisms. 2.1. Sterilization efficiency. 3. Application of cold plasma in medicine. 4. Summary

Słowa klucze: medycyna, mikrobiologia, plazma, wolne rodniki, zimna plazma
Key words: free radicals, medicine, microbiology, non-thermal plasma, plasma

1. Wstęp

Pojęcie plazmy, rozumianej jako stan rozproszenia materii (czwarty stan skupienia) wprowadził w 1928 roku amerykański fizykochemik Irving Langmuir, noblista z 1932 roku [31]. Stanowi ona materię, która jest złożona z cząsteczek obojętnych, mieszaniny zjonizowanych i niezjonizowanych atomów w stanie podstawowym i wzbudzonych, wolnych rodników oraz elektronów. Podziału plazmy dokonuje się przede wszystkim z uwagi na ciśnienie, temperaturę i gaz, w którym jest ona generowana. Ze szczegółowym opisem jej rodzajów możemy się zapoznać w wielu publikacjach [2, 11, 50, 53, 60].

W przypadku plazmy termicznej wysokotemperaturowej, elektrony oraz inne cząsteczki wchodzące w jej skład mają taką samą temperaturę. Do jej powstania niezbędne jest wytworzenie wysokiego ciśnienia i utrzymanie równowagi termodynamicznej między cięższymi cząsteczkami chemicznymi a elektronami. W przypadku zimnej plazmy, niskotemperaturowej (CAP – *cold atmospheric plasma*), generowanej w ciśnieniu atmosferycznym bądź w warunkach próżniowych, energia zewnętrzna wykorzystana jest do wytwarzania wysokoenergetycznych elektronów. Elektrony te mają wyższą temperaturę niż inne cząsteczki wchodzące w skład zimnej plazmy w związku z czym temperatura całego procesu podnosi się nieznacznie.

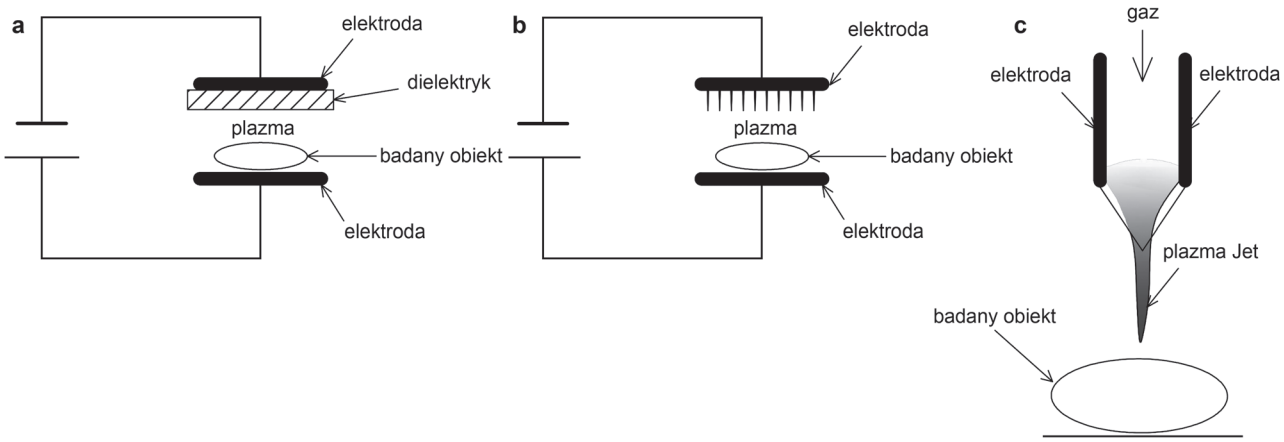
Charakterystyczna dla CAP, niska temperatura procesu wraz z wygenerowanymi właściwościami: biomodulującymi, stymulującymi, dezynfekcyjnymi i sterylizacyjnymi; umożliwia jej wykorzystanie w medycynie [17, 26, 22], technologii żywności [3, 14, 16, 18, 24, 42, 45, 60] i ochronie środowiska [50]. Jej wykorzystanie w nowych obszarach badawczych wymusza dostosowanie technologii wytwarzania CAP. Schematy podstawowych urządzeń wykorzystywanych w procesach stosowanych do generowania niskotemperaturowej plazmy przy ciśnieniu atmosferycznym przedstawiono na rys. 1.

Oddziaływanie zimnej plazmy na żywe organizmy jest procesem złożonym. Polega ono na działaniu:

a. wysokoenergetycznych elektronów nabywających energię w polu elektrycznym,
b. zjonizowanych atomów i cząsteczek, które ulegają jonizacji wskutek uderzeń wysokoenergetycznych elektronów,
c. działaniu wolnych rodników w tym tlenu, azotu – RONS (*reactive oxygen nitrogen species*), czy rodników hydroksylowych,
d. promieniowania UV,
e. nadtlenku wodoru,
f. ozonu [17].

Skuteczność procesu zależy przede wszystkim od takich elementów jak: moc i budowa urządzenia, częstotliwość prądu, długość trwania pojedynczego impulsu

* Autor korespondencyjny: Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii Stosowanej, ul. Papieża Pawła VI nr 3 71-459 Szczecin; tel. 91 4496542; e-mail: elzbieta.boguslawska-was@zut.edu.pl



Rys. 1. Podstawowe schematy konstrukcyjne stosowane do generowania niskotemperaturowej plazmy przy ciśnieniu atmosferycznym
a – wyładowanie dielektryczne barierowe DBD; b – wyładowanie koronowe; c – wyładowanie w układzie Plazma JET

wzbudzającego, czasu oddziaływania plazmy na komórki i tkanki oraz rodzaju użytego gazu [21]. Badania przeprowadzone nad eliminacją *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* oraz *Microsporium canis*, wykazały iż krótkie impulsy (30 ns) generujące plazmę przy wyższym napięciu (14,1 kV) są bardziej skuteczne niż impulsy dłuższe (2 μs) ale o niższym napięciu (10,3 kV). Helmke i wsp. sugerują, że wyższe napięcia generują bardziej energetyczne elektrony, które w efekcie dają więcej wysoko reaktywnych cząsteczek [21], i to właśnie im, najczęściej przypisuje się efekt działania na żywe komórki. W znacznie mniejszym stopniu uwzględnia się oddziaływanie pola elektromagnetycznego szczególnie w przypadku plazmy generowanej promieniowaniem mikrofalowym czy radiowym.

W ocenie efektywności działania CAP, należy również uwzględnić modyfikację właściwości fizyko-chemicznych i fizyko-mechanicznych prowadzących do zmian strukturalnych plazmowanego środowiska. Sugestie naukowców dotyczą przede wszystkim cieczy, w tym wody [12, 23, 39]. W przeprowadzonych bowiem badaniach wykazano, że w wodzie poddanej promieniowaniu koronowemu dochodzi do znacznego obniżenia pH, pojawiają się nadtlenek wodoru, ozon oraz reaktywne formy tlenu i azotu – RONS [17]. Efektem plazmowania jest więc powstanie wody o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych [29, 47]. Cechy dekontaminacyjne, względem *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* oraz *C. albicans*, woda utrzymuje nawet przez czas 1-miesięcznego przechowywania, pomimo zanikania nadtlenku wodoru i ozonu [23].

2. Mechanizm działania zimnej plazmy na drobnoustroje

Zasadnicze wykorzystanie zimnej plazmy w naukach przyrodniczych i medycynie koncentruje się na jej właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. Badania te prowadzone są dwu kierunkowo: działanie sterylizacyjne, np. w leczeniu zakażeń u ludzi oraz możliwość dekontaminacji mikrobiologicznej żywności oraz nasion i cebulek roślin.

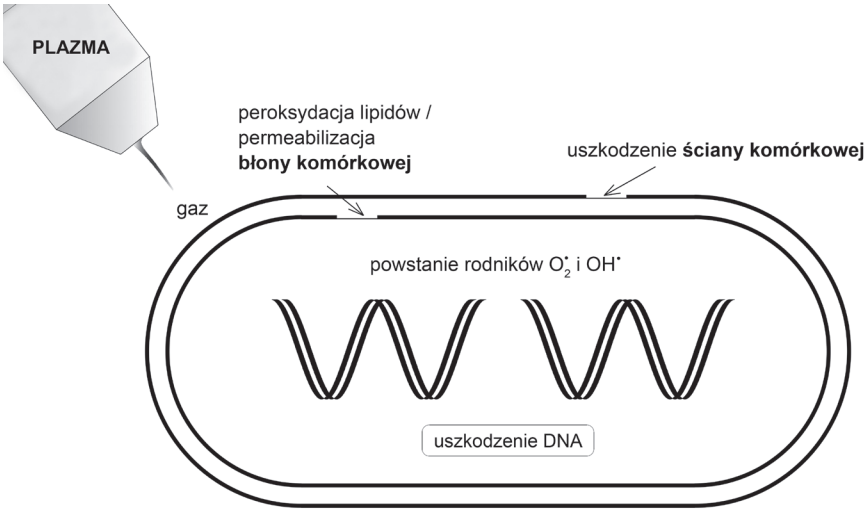
Pierwsze badania wskazujące na aktywność sterylizującą plazmy pod ciśnieniem atmosferycznym zostały opublikowane w 1996 roku przez Laroussi i wsp. z Uniwersytetu w Tennessee. Plazma generowana była przez źródło fal radiowych – RF (*radio frequency*) przy napięciu (od 1 kV do 5 kV). Zakres częstotliwości, w którym otrzymano stabilne wyładowanie w całej przestrzeni pomiędzy elektrodami wynosił od 300 Hz do 4 KHz. Efektem tych badań była eliminacja drobnoustrojów zachodząca w ciągu kilku minut plazmowania [33]. Dalsze badania wykazały skuteczność sterylizującą działania zimnej plazmy na komórki wegetatywne bakterii i ich spory oraz drożdże, pleśnie i wirusy [47, 54, 28, 56]. Wielu autorów zwraca uwagę na istotną rolę gazów w środowisku którego dochodzi do wygenerowania zimnej plazmy [34, 37]. Zastosowanie znalazły: O_2, N_2, powietrze, halogeny, H_2O, CO_2, SO_2, oraz Ar, Ne, He. W przypadku gazów szlachetnych ich działanie sterylizacyjne zwiększa się po dodaniu 2–5% O_2. Proces sterylizacji jest zwykle prowadzony bezpośrednio w miejscu wygenerowania zimnej plazmy. Działają wtedy promieniowanie UV, elektrony, RONS oraz zjonizowane atomy i cząsteczki. Metoda ta najczęściej stosowana jest w przypadku generowania plazmy promieniowaniem RF (1–100 MHz) oraz mikrofalami (> 300 MHz), ponieważ wysokie częstotliwości powodują znaczny wzrost temperatury napromieniowywanego środowiska [37].

Niszczące działanie zimnej plazmy w stosunku do drobnoustrojów, tłumaczone jest mechanizmami zachodzącymi w różnych obszarach komórki – uszkodzenie ściany komórkowej, błony cytoplazmatycznej, DNA i aparatu enzymatycznego. Z przeprowadzonych badań na sporach *Bacillus sp.* wynika, że w procesie plazmowania kinetyka zabijania drobnoustrojów zachodzi

dwu lub trzy etapowo. Początkowo sugerowano, że podstawowym procesem jest zniszczenie DNA poprzez promieniowanie UV. Mechanizm działania promieniowania ultrafioletowego jest dobrze znany. Jego destrukcyjne działanie na kwasy nukleinowe wynika z wysokiej wartości energetycznej i dużego stopnia absorbancji tego rodzaju promieniowania przez cząsteczki DNA i RNA. Najczęściej zachodzące zmiany prowadzą do powstania dimerów tyminy i fragmentacji nukleoidu. Znaczące i gwałtowne zmiany w strukturze DNA mające miejsce jedynie pod wpływem UV nie dają zawsze skutecznego efektu letalnego wskutek ograniczonej penetracji fotonów promieniowania przez struktury spor [38]. Dlatego też, destrukcji DNA drobnoustroju muszą towarzyszyć zmiany wynikające z aktywności rodników utleniających i energii elektronów. Na przykładzie mechanizmów zmian zachodzących w strukturze DNA *Citrobacter freundii*, Surowsky i wsp. ustalili, że związki generowane w plazmie takie jak np. H_2O_2 oraz rodniki wodorotlenowe również przyczyniają się do uszkadzania DNA, co może być jedną z przyczyn śmierci bakterii [52]. Obecnie sugeruje się, że w procesie sterylizacji plazmowej promieniowanie UV odgrywa minimalną rolę [32].

Obserwacje w mikroskopie elektronowym i skaningowym wykazują, że proces plazmowania uszkadza zewnętrzne struktury bakterii. Zachodzi to wskutek dezintegracji struktur powierzchniowych – ściany komórkowej i błony komórkowej. Charakteryzuje się ona najwolniejszą kinetyką, w związku z tym jest to faza, która determinuje szybkość całego procesu sterylizacji. Dezintegracja powierzchni drobnoustrojów przez wytrawianie i fotodesorpcję jest procesem niszczenia ich „atom po atomie". Reaktywne składniki plazmy zderzając się z drobnoustrojami, powodują poważne i trudne do naprawienia uszkodzenia błony komórkowej. W konsekwencji mogą prowadzić do przerwania jej ciągłości. Efekt ten jest również następstwem gromadzenia się ładunku elektrycznego na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej. W tym procesie największe działanie letalne wykazują tlen atomowy oraz rodniki hydroksylowe [38]. Podobny efekt uzyskuje się w wyniku zajścia elektroporacji, inaczej określanej elektropermeabilizacją. Proces ten polega na elektrycznie indukowanym powstaniu nowych mikrospor w błonie komórkowej oraz na wzroście już istniejących. Destrukcyjne działanie tego mechanizmu, opisane na przykładzie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serowar Typhimurium i *Listeria monocytogenes*, polega na zwiększeniu przepuszczalności membrany cytoplazmatycznej komórki. Bezpośrednio wpływa to na potencjał transbłonowy komórek i ich zdolności do regulacji wewnątrzkomórkowej pH [46]. W przypadku fotodesorpcji, w ścianie i błonie komórkowej drobnoustrojów ulegają zerwaniu wiązania chemiczne związków budujących te struktury. W dalszym etapie, z uszkodzonych białek, cukrów i tłuszczów powstają lotne związki węgla, które stopniowo „wyparowują" z powierzchni bakterii. Wykazano, że tworzenie się dwutlenku węgla i innych lotnych związków, wzrasta wraz z temperaturą powierzchni. Oznacza to, że wyższa temperatura powierzchni znacznie zmniejsza czas zabicia drobnoustrojów [37]. W mechanizmie wytrawiania dochodzi także do zmian natury oksydacyjnej w lipidach i białkach budujących drobnoustroje. Moreau i wsp. uważają, że ma to ogromny wpływ na procesy enzymatyczne, a związku z tym i na procesy metaboliczne zachodzące w komórce [38]. Ginięcie drobnoustrojów tłumaczy się także zmianami pH środowiska. Liu i wsp. poddali ekspozycji plazmowej w układzie mikroJET wodę z zawiesiną bakteryjną *S. aureus*. Bezpośrednia obróbka plazmowa, podczas którego zmianie uległo pH środowiska, skutecznie inaktywowała *S. aureus* w ciągu 20 minut. Przy czym najlepszy efekt sterylizacyjny uzyskano przy pH 4,5. Według autorów, zabicie bakterii wynikało ze zmiany kwasowości płynu oraz interakcji reaktywnych związków generowanych przez plazmę, w głównej mierze rodnika hydroksylowego (*HOO*$^{\bullet}$) z komórką. Rodnik ten jest odpowiedzialny za peroksydację kwasów tłuszczowych występujących w komórce bakteryjnej [35].

Szczegółowa analiza obrazów w mikroskopii fluorescencyjnej daje podstawy do wnioskowania, że przyczyną destrukcji komórki na poziomie błony komórkowej jest utrata jej integralności. W przypadku *B. subtilis*, jest to mechanizm oparty na reakcji błony komórkowej ze związkami reaktywnymi wydzielanymi przez plazmę. Obserwacji dokonali Lackmann i Bandow, stosując dysze plazmowe JET [30]. W tym typie, plazma występuje poza układem elektrod a otaczające powietrze pozwala wysokoenergetycznym fotonom na głębokie dotarcie w głąb drobnoustroju. Warto podkreślić, rolę genów *oxyR* lub *soxS* w reakcji komórki na działanie zimnej plazmy. Mutanty pozbawione tych genów są bardziej podatne na działanie zimnej plazmy z wykorzystaniem mieszanki helu z tlenem. Białko SoxS jest regulatorem kontrolującym geny głównie odpowiedzialne za detoksykację nadtlenków i tlenków azotu, natomiast gen *oxyR* jest regulatorem procesów transkrypcyjnych zachodzących podczas aktywacji genów w odpowiedzi na stres oksydacyjny. Dlatego też mutanty z brakującym regulatorem SoxS są wrażliwe na zabicie przez nadtlenki i tlenki azotu, natomiast bakterie z brakującym genem *oxyR* są wrażliwe na reaktywne formy tlenu. Błona komórkowa bakterii nie jest jedynym uszkadzanym miejscem, ponieważ zostaje również uruchomionych aż 18 genów należących do odpowiedzi SOS, który obejmuje różne systemy naprawcze DNA [30]. Sharma i wsp. zaobserwowali zwiększoną ekspresję genów odpowiedzi SOS i genów w odpowiedzi na stres oksy-



Rys. 2. Wewnątrzkomórkowy efekt działania reaktywnych form tlenu wytwarzanych podczas obróbki plazmowej

dacyjny (*oxyS, katG, sodA*) u *E. coli* po działaniu zimnej plazmy. Taka odpowiedź komórkowa może sugerować znaczne uszkodzenia DNA u tego drobnoustroju. Autorzy również postulują, że skuteczność obróbki zimną plazmą drobnoustrojów ma związek z synergicznym działaniem fotonów UV oraz rodników tlenowych [49]. Odpowiedź komórkową po zastosowaniu zimnej plazmy zauważyli również Cooper i wsp. Analizowali oni biologiczną odpowiedź bakterii *Bacillus stratospheric*us na obróbkę plazmową z użyciem wyładowania dielektrycznego (DBD – *dielectric barrier discharge*). Autorzy zaobserwowali przejście komórek bakteryjnych w stadium żyjących ale nie dających się hodować (stadium VBNC – *viable but nonculturable*) już 2 godziny po procesie obróbki plazmowej [9]. Prawdopodobnie jest to reakcja na stres oksydacyjny jakiemu poddane są komórki. Na Rys. 2 przedstawiono schemat sterylizacyjnego działania reaktywnych form tlenu.

Kluczową rolę rodników tlenowych oraz hydroksylowych w eliminacji drobnoustrojów podkreślają również Weiyuan i wsp. Badali oni wpływ obróbki plazmowej pod ciśnieniem atmosferycznym na *E. coli*. Użyto do tego celu specjalnie zaprojektowanego przenośnego urządzenia wytwarzającego plazmę w wielodyszowym układzie JET. Urządzenie to składa się z wolframowych elektrod przechodzących przez otwory w dielektryku z Al_2O_3. Jednocześnie przez otwory te wylatuje zjonizowany gaz. Autorzy podkreślają, że plazma o tak specyficznej budowie była skuteczna w zabiciu bakterii znajdujących się na płytce z pożywką. Za przyczynę tego efektu, uznano związki reaktywne zawierające tlen, które były w stanie zniszczyć wiązania C-C lub C-H występujące w komórce, a następnie powodować rozkład związków organicznych [59].

Wykorzystanie mikroskopii sił atomowych jednoznacznie wskazuje, że jednym kryteriów destrukcji ściany komórkowej i błony cytoplazmatycznej jest rodzaj gazu lub jego mieszanina. Zespół naukowców pod kierunkiem Galvin ustalił, że 5-minutowa ekspozycja z zastosowaniem helu powoduje powstanie w ścianie komórkowej *S. aureus* wgłębień znacznie mniejszych niż ma to miejsce w środowisku mieszaniny helu i powietrza. Tym niemniej wyniki te wykazują, że działanie sterylizacyjne plazmy związane jest nie tylko z działaniem wolnych rodników, ponieważ zachodzi ono także w środowisku zjonizowanych gazów szlachetnych. W procesie tym nie bez znaczenia jest również budowa ściany komórkowej, w której różnice w budowie peptydoglikanu i stopień jego acetylacji wpływają na efekt sterylizujący [15]. W przypadku *E. coli* i *B. subtilis* zastosowanie zimnej plazmy DBD doprowadziło do znacznego zniszczenia błony komórkowej i uwolnienia cytoplazmy do otaczającego medium jedynie u bakterii Gram-ujemnej. W przypadku *B. subtilis,* w obrazie mikroskopowym nie stwierdzono znaczących zmian morfologicznych. Zaobserwowano jedynie redukcję żywotności komórek [32].

W opinii wielu autorów publikacji naukowych, procesy zachodzące w komórce są wynikiem synergistycznego działania czynników powstających podczas generowania plazmy, peroksydacji lipidów w błonie komórkowej, uszkodzenie genomowego DNA i denaturacji białek [15, 32, 37, 38, 52]. Laroussi i wsp. sugerują również, że poza lizą komórek, którą powoduje zimna plazma ma miejsce proces dyfuzji reaktywnych związków do wnętrza komórki bakteryjnej. Mogą one powodować śmierć komórki lub też wprowadzić ją w stan żyjącej ale nie dającej się hodować [32].

2.1. Efektywność działania sterylizującego

Metoda sterylizacji z zastosowaniem zimnej plazmy, generowanej w warunkach ciśnienia atmosferycznego jest coraz częściej badana w aspekcie eliminacji

drobnoustrojów i ich produktów metabolicznych z żywności. W przeciwieństwie do obecnie używanych metod termicznych proces ten nie powoduje znaczących zmian sensorycznych, koloru lub też utraty wartości odżywczych produktu.

Poddanie żywności procesowi plazmowania wprowadza konieczność uwzględnienia dodatkowych czynników ograniczających jej efektywność. Testy przeprowadzone przez Fernández i wsp., jednoznacznie wskazują, że skuteczność zimnej plazmy może zależeć od poziomu zróżnicowania struktury powierzchni badanych produktów żywnościowych. W badaniu wykorzystano sałatę, truskawki oraz ziemniaki, które zaszczepiono *Salmonella* ser. Typhimurium. W wyniku 15-minutowej obróbki plazmowej liczebność bakterii obniżyła się o 2,72 log na sałacie, na truskawkach o 1,76 log. Najmniejszą zaś redukcję uzyskano na ziemniakach – 0,94 log. Za przyczynę takich rozbieżności autorzy podają zróżnicowanie budowy powierzchni. Na podstawie analizy obrazów uzyskanych w mikroskopie skaningowym stwierdzili, że aparaty szparkowe w sałacie, pofałdowania powierzchni truskawek czy ziemniaka mogą przyczyniać się do „chowania" komórek bakteryjnych przez co zmniejsza się ich ekspozycja na czynniki sterylizujące plazmy [14]. Podobne wnioski wynikają z badań Ziuzina i wsp., którzy działaniu CAP poddali pomidory i truskawki. Poziom niewykrywalności drobnoustrojów na pomidorach uzyskano już po 10 sekundach plazmowania szczepów *Salmonella*, 60 sekundach *E. coli* i po 120 sekundach *L. monocytogenes*. W przypadku truskawek (bardziej złożona struktura powierzchni), znaczną redukcję liczebności mikroflory patogennej uzyskano dopiero po 300 sekundach plazmowania. Z powierzchni produktu izolowano o 3,5 log mniej *E. coli,* 3,8 log *Salmonella* ser. Typhimurium oraz 4,2 log *L. monocytogenes* [63].

W tym miejscu należało by również wspomnieć o znaczeniu budowy ściany komórkowej i związanej z tym skuteczności działania zimnej plazmy. W literaturze bowiem nie ma jednoznacznej opinii dotyczącej tych zależności. Według Ermolaeva i wsp., stosujących plazmę nietermiczną w leczeniu zakażeń ran u ludzi, skuteczność jej działania jest uzależniona od gatunku i pochodzenia szczepu. W przeprowadzonych przez autorów badaniach wykorzystano izolaty kliniczne oraz pochodzące z kolekcji szczepy bakterii Gram-ujemnych: *P. areuginosa*, *Burkholderia cenocepacia*, *E. coli* oraz bakterii Gram-dodatnich: *S. epidermidis*, *S. aureus, Streptococcus pyogenes, Enterococcus faecium*. Wszystkie testowane szczepy bakterii Gram-ujemnych wykazywały podobną podatność na obróbkę plazmową. Po 5 minutach plazmowania stwierdzono ich całkowitą eliminację. W przypadku szczepów Gram-dodatnich, autorzy wyróżnili poziomy wrażliwości drobnoustrojów na wygenerowaną plazmę. Do średnio wrażliwych zaliczono *S. epidermidis* i *E. faecium*, natomiast kliniczne izolaty *S. pyogenes* i pochodzący z kolekcji szczep *S. aureus* do najmniej podatnych [13]. Odmienne wyniki badań w swojej pracy przedstawili Daeschlein i wsp. Wykazali oni bowiem, że bakterie Gram-dodatnie są znacznie bardziej wrażliwe niż Gram-ujemne. Jednocześnie wykazali, brak związku efektywności działania wygenerowanej plazmy z opornością na określone antybiotyki [10]. Nieco inne efekty badań uzyskali Galvin i wsp. Oceniali oni wpływ zimnej plazmy z zastosowaniem helu oraz mieszaniny helu z powietrzem na szczepy odporne na metycylinę (MRSA – *methicyllin-resistant S. aureus*) i wrażliwe na metycylinę (MSSA – *methicillin-sensitive S. aureus*) oraz spory *Clostridium difficile*. Autorzy zaobserwowali brak wpływu rodzaju użytego gazu na skuteczność bakteriobójczą wobec klinicznego szczepu *S. aureus* MRSA, którego liczebność zmniejszała się od 5 do 1 log w tych samych warunkach sterylizujących, wyższą przeżywalność zaobserwowano natomiast dla szczepów *S. aureus* MSSA i brak istotnych zmian w liczebności dla *C. difficile* [15].

Kolejnym bardzo istotnym zagadnieniem jest wpływ plazmy na biofilm bakteryjny. Analiza mikroskopowa wykazała bowiem, że w wielowarstwowej strukturze drobnoustrojów zmniejszenie ich liczebności następuje w ograniczonym stopniu. Wynika to z bariery ochronnej, powstającej z górnej warstwy obumierających komórek, które ograniczają działanie plazmy [14]. W związku z tym pojawiają się sugestie, że metoda sterylizacji zimną plazmą może być jedynie zastosowana w przypadku niskiego poziomu kontaminacji [27]. Innych obserwacji dokonali Alkawareek i wsp., według których skuteczność działania omawianej techniki zależy od rodzaju drobnoustrojów tworzących biofilm oraz mechanicznej stabilności macierzy zewnątrzkomórkowej. Badania przeprowadzone na 48 godzinnej hodowli *Vibrio alginolyticus* oraz *Vibrio proteolyticus* wskazują na możliwość całkowitego zniszczenia biofilmów bakteryjnych, co uzyskano w czasie 60–120 sekundowego procesu plazmowania. Na uwagę zasługuje również fakt, iż stopień wrażliwości *V. alginolyticus* był znacznie większy niż w przypadku biofilmu *V. proteolyticus*. Sugerują również, że zimna plazma pod ciśnieniem atmosferycznym może być obiecującym narzędziem w usuwaniu biofilmu morskiego jak również biofilmu tworzącego się na powierzchni będącej w bezpośrednim kontakcie ze środowiskiem wodnym [1].

Eliminacja drobnoustrojów zazwyczaj powiązana jest z miejscem ich namnażania. Wykorzystanie zimnej plazmy w dekontaminacji mikrobiologicznej produktów żywnościowych pozwala jednocześnie na zachowanie podstawowych atrybutów produktu. Bardzo interesujące prace dotyczą działania plazmy na przyprawy. Według

danych amerykańskich 5% importowanych z krajów afrykańskich próbek pieprzu jest zanieczyszczonych bakteriami *Salmonella* [8], co wymusza na producentach wprowadzenie sterylizacji. Jednakże, wysoka temperatura znacząco zmienia ich teksturę oraz własności sensoryczne. Zastosowanie w tym procesie zimnej plazmy minimalizuje pojawianie się nieporządkach cech i ogranicza znacząco liczebność np. zarodników grzybów pleśniowych. Przeprowadzone przez Kim i wsp. badania dotyczące redukcji zarodników *A. flavus* i spor *B. cereus* jednoznacznie wskazują iż działanie zimnej plazmy spowodowało obniżenie ich liczebności, odpowiednio o 2,5 log i 3,4 log [25]. Na podkreślenie zasługuje również fakt, że proces plazmowania nie wpłynął istotnie na wartości smakowe i zapachowe dekontaminowanych przypraw [16]. Podobne wnioski technologiczne uzyskano w eksperymencie przeprowadzonym przez Kim i wsp. W tym przypadku, sterylizacji poddano bekon, a inaktywowanymi bakteriami były: *L. monocytogenes*, *Salmonella* ser. Typhimurium oraz *E. coli.* Zastosowanie mieszaniny gazów helu z tlenem zredukowało liczebność drobnoustrojów o 2–3 cykle logarytmiczne [24].

Zastosowanie plazmy nietermicznej ma również miejsce w przemyśle mleczarskim tym bardziej, że coraz częściej pojawia się na rynku „mleko prosto od krowy" – nie poddane obórce termicznej. Odkażanie mleka, ze względu na jego specyficzną strukturę jest procesem bardzo trudnym. Krótki czas oraz uzyskiwane temperatury podczas procesu plazmowania nie wpływają w znaczący sposób na własności tego produktu przy jednoczesnej redukcji drobnoustrojów [18]. Przeprowadzone przez Gurol i wsp. badania wskazują, że liczebność *E. coli* w mleku (3,0% tłuszczu) została obniżona z początkowej wartości 7,78 log CFU/ml do 3,63 log CFU/ml w czasie 20 minutowej obróbki. Nieco mniejszą skuteczność czynników sterylizujących oznaczono w mleku o mniejszej zawartości tłuszczu i mleku odtłuszczonym [18]. Zestawienie danych dotyczących

Tabela I
Przykładowe publikacje dotyczące zastosowania zimnej plazmy do zabijania drobnoustrojów w żywności

Drobnoustrój	Sposób generowania plazmy	Środowisko	Stopień redukcji drobnoustrojów	Piśmiennictwo
Citrobacter freundii	Plasmajet Ar+0,1%O_2	Sok jabłkowy	5 log	[52]
Escherichia coli	Wyładowanie koronowe, powietrze	Sałata, marchew, pomidory	1,6 log	[4]
Escherichia coli	Wyładowanie koronowe, powietrze	Mleko	5 log	[18]
Listeria innocua	Wyładowanie koronowe He+5%O_2	Mięso, skóra drobiowa	1 log skóra, 3 log mięso	[42]
Ogólna liczba psychotrofów, grzybów i pleśni	Reaktor plazmy pulsacyjnej He, N, Ar	Mięso wieprzowe	2–3 log	[57]
Spory *Aspergillus flavus*, *Bacillus cereus*	Reaktor mikrofalowy N_2, N_2+O_2, He, N_2+O_2, He+O_2	Mielona czerwona papryka	*A. flavus* 2,5 ± 0,3 log *B. cereus* 3,4 ± 0,7 log	[25]
Salmonella Enteridis, *Salmonella* ser. Typhimurium	Wyładowanie DBD	Powierzchnia skorup jaj kurzych	*S.* Enteritidis 4,5 log *S.* Typhimurium 2,5 log	[44]
Listeria innocua	Wyładowanie DBD, Ar 70%+30% O_2	Breasola-plasterkowane mięso	0,8–1,6 log	[45]
Aspergillus spp., *Penicillum* spp.	Reaktor niskociśnieniowy, powietrze, SF6	Nasiona pomidorów, pszenicy, fasoli, grochu, soi, jęczmienia, owsa, żyta, soczewicy, kukurydzy	3 log	[48]
Aspergillus parasiticus	Reaktor niskociśnieniowy, powietrze, SF6	Orzechy laskowe, ziemne, pistacje	1 log	[3]
Escherichia coli, *Salmonella* ser. Typhimurium, *Listeria monocytogenes*	Wyładowanie DBD, powietrze	Pomidory, truskawki	Pomidor – *Salmonella* – 3,1 log, *E. coli* – 6,3 log *L. monocytogenes* – 6,7 log, Truskawki – *E. coli* – 3,5 log, *Salmonella* – 3,8 log, *L. monocytogenes* – 4,2 log	[63]
Salmonella ser. Typhimurium	Reaktor mikrofalowy, O_2	Szpinak, sałata, pomidory, ziemniaki	Szpinak – 3,0 log Sałata – 2,7 log Pomidor – 2,3 log Ziemniaki – 2,2 log	[62]
Listeria monocytogenes, *Escherichia coli*, *Salmonella* ser. Typhimurium	Wyładowanie DBD, He, He+O_2	Plasterkowany bekon	Hel – 1–2 log, Mix hel i tlen – 2–3 log	[24]

działania plazmy na drobnoustroje występujące w żywności przedstawiono w tabeli I.

Wykorzystanie zimnej plazmy w technologii żywności nie powinno ograniczać się jedynie do procesów niszczenia żywych drobnoustrojów w środowisku. Basaran i wsp., w swoich badaniach zwracają uwagę, że poza faktem eliminacji *Aspergillus parasiticus,* wynikiem procesu plazmowania jest również redukcja ich produktów metabolicznych. Stwierdzili oni zmniejszenie o 50% ilości aflatoksyn: B1, B2, G1 i G występujących w orzechach [3]. Surowsky i wsp., natomiast wykazali redukcję aktywności oksydazy polifenolowej i peroksydazy – enzymów odpowiedzialnych za enzymatyczne brązowienie owoców i warzyw oraz wyrabianych z nich świeżych soków [51].

3. Zastosowanie zimnej plazmy w medycynie

W efekcie działania plazmy na żywe organizmy podkreśla się głównie ich wpływ na biopolimery występujące w komórkach. Obróbka plazmowa może doprowadzić do: sieciowania, czyli tworzenia nowych wiązań, wytrawiania – usunięcia z polimeru pewnych składowych bądź wstawiania – dołączania się zjonizowanych cząstek do makromolekuł [55].

Bardzo intensywnie prowadzone są prace nad zastosowaniem zimnej plazmy w medycynie. Dowodem zainteresowania tą problematyką jest pojawienie się terminu „plazma oncology". Badania te ogniskują się na określaniu bezpośredniego działania plazmy na stan fizjologiczny komórek prawidłowych i nowotworowych, hamowaniem rozwoju nowotworów i przyspieszeniem gojenia się ran. W tym ostatnim przypadku dodatkowym elementem jest działanie plazmy na bakterie rozwijające się w zranionej tkance [17].

Mai-Prochnow i wsp. podzielili działanie plazmy na komórki organizmów wyższych w zależności od mocy dawki. Przy niskich dawkach, dochodzi do zabicia bakterii lecz nie ma to wpływu na komórki ssaków. Przy średnich, zachodzi proces przyspieszenia gojenia ran, zwiększenia proliferacji komórek, zwiększenia wydzielania czynnika wzrostu oraz apoptozy komórek nowotworowych. Wysokie dawki plazmy powodują śmierć komórek ssaków i nekrozę tkanek. Szczególnie ważną rolę przeciwnowotworową przypisuje się aktywnej formie tlenku azotu $NO^{\bullet}$, która ma hamować angiogenezę, metastazy, zwiększać apoptozę, cytotoksyczność i chemiowrażliwość [36].

Ze względu na duże zainteresowanie plazmą przez chirurgów i dermatologów podjęto badania nad jej wpływem na ludzkie keratynocyty. Stwierdzono, że plazma generowana przez 1–5 min techniką DBD nie wpływała na apoptozę komórek HaCaT, natomiast poddawanie działaniu zimnej plazmy przez 10 do 20 min powodowało wzrost apoptozy, zmieniało morfologię tych komórek i ich żywotność. Interesujące przy tym jest to, że wymiana podłoża po działaniu plazmy znacznie obniżała destrukcyjne działanie procesu co jest dowodem na wpływ plazmy na środowisko wodne. Autorzy wykazali, że w podłożu tworzone są reaktywne formy tlenu, które odpowiedzialne są za efekt destrukcyjny [5].

Haertel i wsp. badali wpływ DBD z użyciem argonu i tlenu na apoptozę komórek HaCaT oraz na koncentrację integryn na ich powierzchni. Stwierdzili, że tlen wzmaga apoptozę komórek i zwiększa koncentrację wyżej wymienionych białek adhezyjnych na ich powierzchni [19]. Grupa tego samego badacza analizowała także działanie plazmy DBD na szczurze mononuklearne komórki śledzionowe. Autorzy zanotowali różną wrażliwość tych komórek na plazmę. W 24 godziny po naświetleniu najmniejszą żywotność wykazywały limfocyty T helper w przeciwieństwie do limfocytów B [20]. W dalszych badaniach prowadzonych na ludzkich komórkach CD4+ oraz monocytach linii THP-1 wykazano, że plazma zwiększa ilość komórek ulegających apoptozie wskutek aktywacji pro-apoptotycznych białek sygnałowych. Intrygującym było to, że dochodziło także do aktywacji pro-proliferacyjnych cząstek sygnałowych co może tłumaczyć pozytywne działanie plazmy w gojeniu się ran [7]. Analizując działanie mikrodysz plazmowych z zastosowaniem helu na mysie komórki nowotworowe TC-1 i fibroblasty CL.7 wykazano, że komórki nowotworowe są znacznie bardziej wrażliwe niżeli fibroblasty. Istotnym jest, że plazma indukowała apoptozę komórek nie działała natomiast bezpośrednio nekrotycznie [26]. Plazmowanie może także przyśpieszać rozmnażanie i migracyjność fibroblastów wskutek stymulacji wydzielania FGF 1 (czynnik wzrostu fibroblastów – *fibroblast growth factor*) [41]. Walk i wsp. badali wpływ zimnej plazmy na mysią neuroblastomę. W warunkach *in vitro* zanotowali zmniejszenie metabolicznej aktywności komórek nowotworowych i wzrost apoptozy. *In vivo* zanotowano zmniejszenie wielkości rozwijającego się guza oraz ponad dwukrotne przedłużenie życia zwierząt [58]. Zachęcające wyniki uzyskali również Brulle i wsp. zajmujący się nowotworem trzustki. Plazmowanie powodowało zahamowanie namnażania komórek nowotworowych trzustki MIA PaCa2 *in vitro* zaś *in vivo* efekt był wzmacniany poprzez zastosowanie gemcitabiny-antynowotworowego chemioterapeutyku [6]. Interesujące badania z użyciem nanosekundowej plazmy w układzie JET przeprowadzili Xiong i wsp. Materiałem badawczym były mysie komórki nerwowe, które poddane ekspozycji na plazmę wykorzystującą wyładowania impulsowe, wykazywały szybką proliferację – ulegały różnicowaniu z powstaniem dłuższych neurytów a także powstaniem komórek formujących sieci

neuronowe. Autorzy podają, że zastosowana plazma nanosekundowa w układzie JET była w stanie różnicować około 75 % komórek nerwowych w neurony, co ważne, z większą skutecznością niż przy zastosowaniu czynnika wzrostu nerwu [61].

Interesujące wyniki badań *in vitro* oraz *in vivo* na zwierzętach zaowocowały próbami wprowadzenia technologii zimnej plazmy do kliniki. Obecnie największe zainteresowanie wykazują dermatolodzy, chirurdzy, kosmetolodzy oraz stomatolodzy. Próbuje się ją stosować do leczenia przewlekłych ran w tym odleżyn oraz dezynfekcji kanałów korzeni zębowych [22]. Niewątpliwym zachęceniem wprowadzania techniki zimnej plazmy do klinik jest taka praca Ngo i wsp., którzy wykazali znaczne zwiększenie angiogenezy i odtwarzanie nabłonka w ranach oparzeniowych u myszy [40]. W celu ograniczenia zakażeń wewnątrzszpitalnych, sugeruje się także zastosowanie technologii plazmy nietermicznej do mikrobiologicznej dekontaminacji środowisk szpitalnych [43].

Plazma niskotemperaturowa znajduje już praktyczne zastosowanie w sterylizacji narzędzi medycznych. W urządzeniach tego typu wstępnie wytwarza się próżnię po czym następuje wypełnienie sterylizatora gazowym nadtlenkiem wodoru. Następnym etapem jest generowanie plazmy wskutek czego powstaje wysoka koncentracja aktywnych rodników. Do głównych zalet tego procesu należy zaliczyć bardzo niskie koszty eksploatacji, bezpieczeństwo procesu sterylizacji oraz ograniczenie korozji i uszkodzeń sterylizowanych przedmiotów.

4. Podsumowanie

Zimna plazma generuje w środowisku gazowym i wodnym powstawanie wolnych rodników tlenu, azotu oraz wysokoenergetycznych elektronów. Wywiera przez to działanie na komórki prokariotyczne jak i eukariotyczne. Uzyskiwane efekty zależą od źródła zimnej plazmy, mocy urządzenia, częstotliwości prądu, długości trwania pojedynczego impulsu wzbudzającego, czasu oddziaływania plazmy na komórki i tkanki oraz rodzaju użytego gazu. W przypadku prokariontów dochodzi do uszkodzenia struktur zewnętrznych jak ściany i błony komórkowej, DNA oraz aparatu enzymatycznego. W związku z tym większość badań skupia się na efektywności procesu sterylizacji. W medycynie badana jest możliwość eliminacji drobnoustrojów z zakażonych ran, kanałów zębowych oraz środowiska szpitalnego. W technologii żywności dekontaminacja patogenów i mikroflory zepsucia ma na celu zwiększenie trwałości i bezpieczeństwa żywności. Działanie plazmy na komórki eukariotyczne daje wielorakie efekty. W przypadku nowotworów zmniejsza angiogenezę i metastazy oraz zwiększa apoptozę, cytotoksyczność i chemiowrażliwość komórek nowotworowych. W przypadku komórek nienowotworowych wpływa na ich różnicowanie, tempo podziałów oraz produkcję cytokin. Z tego względu uznaję się tą technikę za nowe narzędzie w medycynie a w szczególności w onkologii. Technologia ta jednak wymaga wielu dalszych badań i optymalizacji przed wdrożeniem jej do rutynowego zastosowania w medycynie, przemyśle spożywczym jak i wielu innych dziedzinach nauki.

Piśmiennictwo

1. Alkawareek M.Y., Gorman S.P., Graham W.G., Gilmore B.F., Gorman S.P.: Eradication of marine biofilms by atmospheric pressure non-thermal plasma: A potential approach to control biofouling. *Int. Biodeter. Biodegr*. **86**, 14–18 (2014)
2. Bárdos L., Baránková H.: Cold atmospheric plasma: Sources, processes and applications. *Thin Solid Films*, **518**, 6705–6713 (2010)
3. Basaran P., Basaran-Akgul N., Oksuz L.: Elimination of *Aspergillus parasiticus* from nut surface with low pressure cold plasma (LPCP) treatment. *Food Microbiol.* **25**, 626–632 (2008)
4. Bermúdez-Aguirre D., Wemlinger E., Pedrow P., Barbosa-Cánovas G., Garcia-Perez M.: Effect of atmospheric pressure cold plasma (APCP) on the inactivation of *Escherichia coli* in fresh produce. *Food Control*, **34**, 149–157 (2013)
5. Blackert S., Haertel B., Wende K., Woedtke T., Lindequist U.: Influence of non-thermal atmospheric pressure plasma on cellular structures and processes in human keratinocytes (HaCaT). *J. Dermatol. Sci.* **70**, 173–181 (2013)
6. Brulle L., Alain P. i wsp.: Effects of a non thermal plasma treatment alone or in combination with gemcitabine in a MIA PaCa2-luc Orthotopic Pancreatic Carcinoma Model. *PloS one,* **7**, e52653 (2012)
7. Bundscherer L., Lindequist U. i wsp.: Impact of non-thermal plasma treatment on MAPK signaling pathways of humanimmune cell lines. *Immunobiology*, **218**, 1248–1255 (2013)
8. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Draft Risk Profile: Pathogens and Filth in Spices, Food and Drug Administration, U.S. Department of Health and Human Services, 38–40 (2013)
9. Cooper M., Fridman G., Fridman A., Joshi S.G.: Biological responses of *Bacillus stratosphericus* to floating electrode-dielectric barrier discharge plasma treatment. *J. Appl. Microbiol*. **6**, 2039–2048 (2010)
10. Daeschlein G., Junger M. i wsp.: *In vitro* susceptibility of multidrug resistant skin and wound pathogens against Low Temperature Atmospheric Pressure Plasma Jet (APPJ) and Dielectric Barrier Discharge Plasma (DBD). *Plasma Process. Polym.* **11**, 175–183 (2014)
11. Dzimitrowicz A., Jamróz P., Nowak P.: Sterylizacja za pomocą niskotemperaturowej plazmy generowanej, w warunkach ciśnienia atmosferycznego. *Post. Mikrobiol.* **54**, 195–200 (2015)
12. Elkin I.: Wpływ niskociśnieniowej plazmy na aktywność biologiczną immunocytów. Doniesienie wstępne. *Inż. Biomed.* **15**, 387–398 (2009)
13. Ermolaeva S.A., Gintsburg A.L.: Bactericidal effects of non-thermal argon plasma *in vitro*, in biofilms and in the animal model of infected wounds. *J. Med. Microbiol.* **60**, 75–83 (2010)
14. Fernández A., Noriega E., Thompson A.: Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on fresh produce by cold atmospheric gas plasma technology. *Food Microbiol*. **33**, 24–29 (2013)

15. Galvin S., Cahill O., O'Connor N., Cafolla A.A., Daniels S., Humphreys H.: The antimicrobial effects of helium and helium--air plasma on *Staphylococcus aureus* and *Clostridium difficile*. *Lett. Appl. Microbiol*. **57**, 83–90 (2013)
16. Grabowski M., Hołub M., Balcerak M., Kalisiak S., Dąbrowski W.: Decontamination of black pepper powder using dielectric barrier discharge systems in atmospheric pressure. *Jpn. J. Appl. Phys.* **1**, DOI: 10.13140/2.1.1798.5287 (2015)
17. Graves D.B.: Reactive species from cold atmospheric plasma: implications for cancer therapy. *Plasma Process. Polym*. **11**, 1120–1127 (2014)
18. Gurol C., Ekinci F.Y., Aslan N., Korachi M.: Low temperature plasma for decontamination of *E. coli* in milk. *Int. J. Food Microbiol.* **157**, 1–5 (2012)
19. Haertel B., Straßenburg S., Oehmigen K., Wende K., Woedtke T., Lindequist U.: Differential influence of components resulting from atmospheric-pressure plasma on integrin expression of human HaCaT keratinocytes. *BioMed. Research International.* **2013**, 1–9 (2013)
20. Haertel B., Volkmanna T., Woedtkeb U.: Differential sensitivity of lymphocyte subpopulations to non-thermal atmospheric--pressure plasma. *Immunobiology,* **217**, 628–633 (2012)
21. Helmke A., Grunig P., Fritz U.M., Wandke D., Emmert S., Petersen K., Viöl W.: Low-temperature plasma – a prospective microbicidal tool. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov*. **7**, 223–30 (2012)
22. Jiang C., Chen M.-T., Gorur A., Schaudinn C., Jaramillo D.E., Costerton J.W., Sedghizadeh P.P., Vernier P.T., Gundersen M.A.: Nanosecond pulsed plasma dental probe. *Plasma Process. Polym.* **6**, 479–483 (2009)
23. Julak J., Scholtz V., Kotucova S., Janouskova O.: The persistent microbicidal effect in water exposed to the corona discharge. *Phys. Medica*, **28**, 230–239 (2012)
24. Kim B., Yun H., Jung S., Jung Y., Jung H., Choe W., Jo C.: Effect of atmospheric pressure plasma on inactivation of pathogens inoculated onto bacon using two different gas compositions. *Food Microbiol.* **28**, 9–13 (2011)
25. Kim J.E., Lee D.-U., Min S.C.: Microbial decontamination of red pepper powder by cold plasma. *Food Microbiol.* **38**, 128–136 (2014)
26. Kim J.Y., Ballatob J., Foy P., Hawkins T., Wei Y., Li J., Kim S-O.: Apoptosis of lung carcinoma cells induced by a flexible optical fiber-based cold microplasma. *Biosens. Bioelectron.* **28**, 333–338 (2011)
27. Kim J.-S., Lee E.-J., Choi E.H., Kim Y.-J.: Inactivation of *Staphylococcus aureus* on the beef jerky by radio-frequency atmospheric pressure plasma discharge treatment. *IFSET.* **22**, 124 – 130 (2014)
28. Klämpfl T.G., Schmidt H.-U. i wsp.: Cold atmospheric air plasma sterilization against spores and other microorganisms of clinical interest. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 5077–5082 (2012)
29. Kojtari A., Ercan U., Smith J., Friedman G., Sensenig R.B., Tyagi S., Joshi S.G., Ji H-F, Brooks A.D.: Chemistry for antimicrobial properties of water treated with non-equilibrium plasma. *J. Nanomedine. Biotherapeutic Discov*. **4**, DOI: 10.4172/2155-983X.1000120 (2013)
30. Lackmann J.W., Bandow J.E.: Inactivation of microbes and macromolecules by atmospheric-pressure plasma jets. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 6205–6213 (2014)
31. Langmuir I.: Oscillations in ionized gases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **14**, 627–637 (1928)
32. Laroussi M., Mendis D.A., Rosenberg M.: Plasma interaction with microbes. *New J. Phys.* **5**, 41.1–41.10 (2003)
33. Laroussi M., Rader M., Dyer F., Dever M., Alexeff I.: Plasma--Aided Sterilization. *APS DPP Bull*. **41**, 1539–1540 (1996)
34. Lerouge S., Wertheimer M.R., Yahia L.H.: Plasma sterilization: A review of parameters, mechanisms and limitations. *Plasmas Polym*. **6**, 175–188 (2001)
35. Liu F., Sun P., Bai N., Tian Y., Zhou H., Wei S., Zhou Y., Zhang J., Fang J.: Inactivation of bacteria in an aqueous environment by a direct-current, cold atmospheric-pressure air plasma microjet. *Plasma Process. Polym.* **7**, 231–236 (2010)
36. Mai-Prochnow A., Murphya A.B., McLeanb K.M., Kongc M.G., Ostrikov K.: Atmospheric pressure plasmas: Infection control and bacterial responses. *Int. J. Antimicrob. Agents*, DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.01.025 (2014)
37. Moisan M., Barbeau J., Moreau S., Pelletier J., Tabrizian M., Yahia L.H.: Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *Int. J. Pharm*. **226**, 1–21 (2001)
38. Moreau M., Orange N., Feuilloley M.G.: Non-thermal plasma technologies: new tools for bio-decontamination. *Biotechnol. Adv.* **26**, 610–617 (2008)
39. Mystkowska J., Dąbrowski J.R., Kowal K., Nemirowicz K., Car H.: Physical and chemical properties of deionized water and saline treated with low-pressure and low-temperature plasma. *Chemik*, **67**, 719–724 (2013)
40. Ngo M-H.T., Liao J-D., Shao P-L., Weng C-C., Chang C-Y.: Increased fibroblast cell proliferation and migration using atmospheric N_2/Ar Micro-Plasma for the stimulated release of fibroblast growth factor-7. *Plasma Process. Polym.* **11**, 80–88 (2014)
41. Ngo M-H.T., Shao P-L., Liao J-D., Lin C-C. K., Yip H-K.: Enhancement of angiogenesis and epithelialization processes in mice with burn wounds through ROS/RNS signals generated by non-thermal N_2/Ar Micro-Plasma. *Plasma Process. Polym*. **11**, 1076–1088 (2014)
42. Noriega E., Shama G., Laca A., Díaz M., Kong M.G.: Cold atmospheric gas plasma disinfection of chicken meat and chicken skin contaminated with *Listeria innocua*. *Food Microbiol.* **28**, 1293–1300 (2011)
43. O'Connor N., Cahill O., Daniels S., Galvin S., Humphreys H.: Cold atmospheric pressure plasma and decontamination. Can it contribute to preventing hospital-acquired infections? *J. Hosp. Infect.* **88**, 59–65 (2014)
44. Ragni L., Berardinelli A., Vannini L., Montanari C., Sirri F., Guerzoni M.E., Guarnieri A.: Non-thermal atmospheric gas plasma device for surface decontamination of shell eggs. *J. Food Eng*. **100**, 125–132 (2010)
45. Rød S.K., Hansen F., Leipold F., Knøchel S.: Cold atmospheric pressure plasma treatment of ready-to-eat meat: Inactivation of *Listeria innocua* and changes in product quality. *Food Microbiol.* **30**, 233–238 (2012)
46. Russell N.J., Colley M., Simpson R.K., Trivett A.J., Evans R.I.: Mechanism of action of pulsed high electric field (PHEF) on the membranes of food-poisoning bacteria is an "all-or-nothing" effect. *Int. J. Food Microbiol.* **55**, 133–136 (2000)
47. Ryu Y.-H., Kim Y.-H., Lee J.-Y., Shim G.-B., Uhm H.-S., Park G., Choi E.H.: Effects of background fluid on the efficiency of inactivating yeast with non-thermal atmospheric pressure plasma. *PloS one*, **8(6)**: e66231, DOI:10.1371/journal.pone.0066231 (2013)
48. Selcuk M., Oksuz L., Basaran P.: Decontamination of grains and legumes infected with *Aspergillus* spp. and *Penicillum* spp. by cold plasma treatment. *Bioresource Technol*. **99**, 5104–5109 (2008)
49. Sharma A., Collins G., Pruden A.: Differential gene expression in *Escherichia coli* following exposure to nonthermal atmospheric pressure plasma. *J. Appl. Microbiol.* **107**, 1440–1449 (2009)

50. Stryczewska H.D.: Technologie plazmowe w energetyce i inżynierii środowiska. Wydawnictwo Politechniki Lubelskiej, Lublin (2009)
51. Surowsky B., Fischer A., Schlueter O., Knorr D.: Cold plasma effects on enzyme activity in a model food system. *IFSET*. **19**, 146–152 (2013)
52. Surowsky B., Fröhling A., Gottschalk N., Schlüter O., Knorr D.: Impact of cold plasma on *Citrobacter freundii* in apple juice: inactivation kinetics and mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.* **17**, 63–71 (2014)
53. Szałatkiewicz J.: Wytwarzanie plazmy i jej zastosowania. *PAR*. **3**, 9–12 (2010)
54. Terrier O., Moules V. i wsp.: Cold oxygen plasma technology efficiency against different airborne respiratory viruses. *J. Clin. Virol.* **45**, 119–124 (2009)
55. Thirumidas R., Sarangapani C., Annapure U.S.: Cold plasma: A novel non-thermal technology for food processing. *Food Biophy. S*. **10**, 1–11 (2015)
56. Tyczkowska-Sieroń E., Markiewicz J.: Inaktywacja grzybów z rodzaju *Candida* przy użyciu zimnej plazmy atmosferycznej – na drodze ku nowej metodzie eradykacji grzybic powierzchniowych. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **66**, 121–129 (2014)
57. Ulbin-Figlewicz N., Brychcy E., Jarmoluk A.: Effect of low-pressure cold plasma on surface microflora of meat and quality attributes. *J. Food Sci. Technol.* **52**, 1228–1232 (2015)
58. Walk R.M., Snyder J.A., Srinivasan P., Kirsch J., Diaz S.O., Blancom F.C., Shashurin A., Keidar M., Sandler A.D.: Cold atmospheric plasma for the ablative treatment of the ablative treatment of neuroblastoma. *J. Pediatr. Surg.* **48**, 67–73 (2013)
59. Weiyuan N., Longfei J., Jinhai N., Hongyu F., Ying S., Qi Z., Dongping L.: Plasma inactivation of *Escherichia coli* cells by atmospheric pressure air brush-shape plasma. *Surf. Coat. Tech.* **234**, 120–125 (2013)
60. Wiktor A., Śledź M., Nowacka M., Witrowa-Rajchert D.: Możliwości zastosowania niskotemperaturowej plazmy w technologii żywności. *Żywn. Nauka Technol. Jakość*, **5**, 5–14 (2013)
61. Xiong Z., Zhao S., Mao X., Lua X., Heb G., Yang G., Chenb M., Ishaqc M., Ostrikov K.: Selective neuronal differentiation of neural stem cells induced by nanosecond microplasma agitation. *Stem Cell Research*, **12**, 387–399 (2014)
62. Zhanga M., Oh J.K., Cisneros-Zevallos L., Akbulut M.: Bactericidal effects of nonthermal low-pressure oxygen plasma on *S. typhimurium* LT2 attached to fresh produce surfaces. *J. Food Eng*. **119**, 425–432 (2013)
63. Ziuzina D., Patil S., Cullen P.J., Keener K.M., Bourke P.: Atmospheric cold plasma inactivation of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* inoculated on fresh produce. *Food Microbiol*. **42**, 109–116 (2014)

POST. MIKROBIOL.,
2016, 55, 2, 182–194
http://www.pm.microbiology.pl

DROBNOUSTROJE RADIOTOLERANCYJNE – CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH GATUNKÓW ORAZ ICH POTENCJALNE ZASTOSOWANIE

Dominik Maciej Matusiak[1]*

[1] Zakład Mikrobiologii Ogólnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

Wpłynęło w sierpniu 2015 r.
Zaakceptowano w grudniu 2015 r.

1. Wprowadzenie. 1.1. Promieniowanie oraz jego wpływ na organizmy żywe. 1.2. Drobnoustroje radiotolerancyjne – definicja, teorie na temat pochodzenia, oporność na promieniowanie. 2. Charakterystyka wybranych organizmów radiotolerancyjnych. 2.1. Bakterie. 2.2. Archeony. 2.3. Grzyby mikroskopowe. 3. Podsumowanie

Radiotolerant microorganisms – characterization of selected species and their potential usage

Abstract: Ionizing radiation damages DNA, proteins and lipids in cells in a direct (10–20% DNA damage) and indirect manner (80–90%) – causing water radiolysis and a redox potential increase (oxido-reductive stress). For instance, hydrogen peroxide and ozone are generated. Hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$) is the most reactive and harmful reactive oxygen species (ROS). Radiotolerant microorganisms are extremophilic microbiota, sustaining high doses of radiation in a vegetative state. One of the most resistant and extensively studied species is *Deinococcus radiodurans*. This bacterium can reconstitute its genome shattered to dozens of fragments (double strand breaks) as a result of the exposure to radiation or dessication. Other examples include: bacteria: *Acinetobacter radioresistens*, *Rubrobacter radiotolerans*, *Kineococcus radiotolerans*, *Ralstonia* sp. and *Burkholderia* sp. (living in biofilm communities from spent fuel pools); archaea: *Thermococcus gammatolerans;* diverse microscopic, often melanized, presumably radiotropic fungi, e.g. *Cladosporium* spp., from the surrounding of the destroyed Chernobyl power plant. Many of such organisms can be found in desert areas as they are dehydratation-tolerant. Radioresistant species can be potentially utilized for bioremediation of radioactive environment contamination and for nuclear waste management (e.g. bioprecipitation, biosorption, bioaccumulation of uranium or other radioisotopes). For example, diverse molds isolated from the Chernobyl region can be used for mycoremediation due to their ability to decompose contaminated organic matter, adsorb, converse into a soluble form and accumulate radionuclides (e.g. caesium 137).

1. Introduction. 1.1. Radiation and its effect on organisms. 1.2. Radiotolerant microorganism – definition, theories about their origin, radioresistance. 2. Description of selected radiotolerant species 2.1. Bacteria. 2.2. Archaea. 2.3. Microfungi. 3. Summary

Słowa kluczowe: *Deinococcus radiodurans*, drobnoustroje radiooporne / radiotolerancyjne
Key words: *Deinococcus radiodurans*, radioresistant / radiotolerant microorganisms

1. Wprowadzenie

1.1. Promieniowanie oraz jego wpływ na organizmy żywe

Promieniowanie można zdefiniować jako strumień cząstek lub fal elektromagnetycznych emitowanych przez ciało fizyczne. Jest formą przekazywania energii. Najbardziej szkodliwe dla organizmów jest promieniowanie jonizujące i UV (ultrafioletowe). Promieniowanie jonizujące powoduje jonizację materii poprzez wybicie elektronów lub zjawisko Comptona. Wyróżniamy np. wysoce przenikliwe promieniowanie X (rtg – rentgenowskie) i γ oraz słabo przenikliwe promieniowanie α (strumień jąder helu) i β (strumień elektronów lub pozytonów) [13, 46].

Promieniowanie wykazuje właściwości mutagenne. Uszkadza DNA, białka i lipidy w komórkach na drodze bezpośredniego oddziaływania (teoria tarczy) oraz na drodze stresu oksydacyjnego – w tym poprzez radiolizę wody. Bezpośredniemu oddziaływaniu przypisuje się zaledwie ok. 10–20% uszkodzeń DNA [7, 12, 18, 46, 54]. Za stres oksydacyjny – nadmierny wzrost potencjału oksydoredukcyjnego – odpowiadają (wolne) rodniki i reaktywne formy tlenu (ROS – *reactive oxygen species*). Wolne rodniki to silnie reaktywne atomy lub cząsteczki zawierające niesparowane elektrony. Natomiast do ROS, powstających m.in. na skutek radiolizy wody, zalicza się rodniki, jak np. aniorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot -}$), rodnik hydroksylowy ($HO^{\cdot}$, silnie reaktywny), również niebędące rodnikami nadtlenki (np. nadtlenek wodoru – H_2O_2), tlen singletowy ($^1O_2$) i ozon (O_3, tritlen).

Nadtlenek wodoru łatwo ulega rozpadowi na wodę oraz na silnie reaktywny tlen atomowy (*in statu nascendi* – w trakcie tworzenia). Ponadto z jonami Fe^{2+} w reakcji Fentona tworzy rodnik hydroksylowy: $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^- + OH^{\cdot} + Fe^{3+}$. ROS są naturalnym produktem metabolizmu w komórkach, np. oddychania tlenowego [4, 12, 18, 38, 39, 55, 59].

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Ogólnej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-231 Łódź; tel. 42 6354469; e-mail: matusiak@acer.biol.uni.lodz.pl

Ekspozycja organizmu na promieniowanie jonizujące skutkuje m.in. modyfikacją zasad azotowych oraz błędnym podstawianiem zasad w DNA, depurynacją DNA, pękaniem wiązań fosfodiestrowych w DNA (SSBs – *single-strand breaks* i DSBs – *double-strand breaks*, odpowiednio jedno- i dwuniciowe pęknięcia); ponadto: delecją (utratą) fragmentów kwasów nukleinowych, tworzeniem wiązań krzyżowych w DNA oraz między DNA a białkami [16, 33, 58]. Dwuniciowe pęknięcia DNA, z uwagi na brak matrycy do naprawy, są trudno-odwracalne i silnie letalne. Mogą powstać np. gdy wystąpią obok siebie, na przeciwległych niciach DNA, dwa SSBs i zajdzie proces wycięcia zasad (BER – *base excision repair*) [12, 20, 33, 37, 40, 49]. Za dawkę sterylizującą promieniowania jonizującego przyjmuje się 10–30 kGy (8 lub 9 Gy śmiertelne dla człowieka) [4, 6, 46]. Grej (Gy) jest jednostką dawki pochłoniętej w układzie SI równą 1 J/kg.

Efekt biologiczny oraz wrażliwość mikroorganizmu na radiację zależą m.in. od rodzaju promieniowania, jego natężenia, czasu ekspozycji, gatunku czy szczepu drobnoustroju, jego fazy wzrostu, stanu metabolicznego; także od podłoża hodowlanego, warunków środowiskowych (np. czy te warunki są optymalne dla organizmu). W fazie stacjonarnej wzrostu drobnoustroje są zwykle bardziej oporne na radiację – z wyjątkiem *Halobacterium* sp. [20, 33].

1.2. Drobnoustroje radiotolerancyjne – definicja, teorie na temat pochodzenia, oporność na promieniowanie

Drobnoustroje radiotolerancyjne można zdefiniować, jako organizmy prokariotyczne – niebędące w formie przetrwalnej (spoczynkowej) – zdolne do przetrwania wysokiej dawki promieniowania jonizującego, w praktyce przyjętej, jako większej niż 1 kGy [50]. Definicja ta nie obejmuje grzybów, które są organizmami eukariotycznymi. W piśmiennictwie polskim rzadko stosuje się stosuje pojęcia „drobnoustrój radiooporny" lub „radiofilny". Cechę radiooporności przypisano wielu poznanym mikroorganizmom, które zaklasyfikowano do domen *Bacteria* (bakterie), *Archaea* (archeony) i *Eukarya* (eukarionty). Przykładowo dawka D10 promieniowania, czyli redukująca o 90% liczbę żywych komórek (LD_{90} – *lethal dose 90%*) dla średniowrażliwych szczepów *Escherichia coli* wynosi 0,25 kGy [33]. Generalnie uważa się, że bakterie Gram-dodatnie (np. *Bacillus* sp.) są mniej wrażliwe na radiację niż Gram-ujemne; także spory (przetrwalniki) bakterii wykazują wysoką oporność (dawka D10 3–4 kGy) [9]. Porównywanie dostępnych danych odnośnie do radiooporności drobnoustrojów stwarza problemy, ze względu na odmienne warunki przeprowadzania doświadczeń przez różnych badaczy, np. użyty typ promieniowania, źródło, natężenie, czas ekspozycji, medium hodowlane, gęstość hodowli, a także ze względu na posługiwanie się różnymi jednostkami pomiaru. Organizmy radiooporne można zaliczyć do ekstremofili – tolerujących lub wymagających skrajnych warunków środowiskowych do życia. Przykładami poliekstremofili są *Deinococcus radiodurans* (oporny na promieniowanie i wysuszenie), *Thermococcus gammatolerans* (oporny na radiację i wysoką temperaturę), *Chroococcidiopsis* spp. (oporny na promieniowanie, dehydratację, niską temperaturę i rozmrażanie) [5, 8, 30, 54]. Drobnoustroje żyjące w skrajnych warunkach środowiskowych, w tym organizmy tolerancyjne względem promieniowania, znajdują się w polu zainteresowań zwolenników teorii panspermii, która głosi, że życie na Ziemi ma pochodzenie kosmiczne [5, 42]. Interdyscyplinarną nauką zajmującą się wpływem promieniowania na organizmy jest radiobiologia.

Zastosowane skróty:

BER – *base excision repair*, naprawa przez wycinanie zasad,
BIR – *break-induced replication*, replikacja indukowana pęknięciem,
DPS – *DNA-binding protein from starved cells*, białko wiążące DNA pochodzące od głodzonych komórek,
DSBs – *double-strand breaks*, dwuniciowe pęknięcia,
DSM – *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen*, niemiecka kolekcja mikroorganizmów,
ECM – *extracellular matrix*, macierz zewnątrzkomórkowa,
EPS – *extracellular polymeric substances*, zewnątrzkomórkowe polimery,
ESDSA – *extended synthesis-dependent strand annealing*, łączenie nici zależne od rozszerzonej syntezy,
HGT – *horyzontal gene transfer*, horyzontalny transfer genów,
IS – *insertion sequence*, sekwencja insercyjna,
ISS – *international space station*, międzynarodowa stacja kosmiczna,
NER – *nucleotide excision repair*, naprawa przez wycinanie nukleotydów,
NHEJ – *non-homologous end joining*, łączenie niehomologicznych końców,
LD_{90} – *lethal dose 90%*, dawka śmiertelna 90%,
phoK – *alkaline phosphatase*, fosfataza alkaliczna,
phoN – *non-specific acid phosphatase*, niespecyficzna fosfataza kwaśna,
pz – para zasad,
ROS – *reactive oxygen species*, reaktywne formy tlenu,
R, rtg – rentgen,
SOD – *superoxide dismutase*, dysmutaza ponadtlenkowa,
SSA – *single-strand annealing*, jednoniciowe parowanie,
SSBs – *single-strand breaks*, jednoniciowe pęknięcia,
ssDNA – *single-strand* DNA, jednoniciowe DNA,
TCA – *tricarboxylic acid cycle*, cykl kwasów trikarboksylowych, cykl Krebsa,
UV – *ultraviolet*, ultrafiolet,
VBNC – *viable but not culturable*, żywe ale nie hodowalne.

Oporność na promieniowanie może być cechą typową dla danego gatunku (np. jak w przypadku *D. radiodurans*) lub może dotyczyć niektórych szczepów w obrębie gatunku. Organizmy w środowisku pochłaniają rocznie zazwyczaj niedużą dawkę promieniowania równą ok. 2,4 mSv/rok [4]. Ekspozycja na 2–10 Sv w krótkim czasie u człowieka powoduje poważną chorobę lub śmierć [64]. Radiacja może mieć źródło naturalne – kosmiczne (korpuskularne i elektromagnetyczne), także jest emitowana od złóż promieniotwórczych, np. uranu. Promieniowanie może mieć też pochodzenie antropogeniczne, np. od broni i energetyki jądrowej, przemysłu, odpadów medycznych. Przypuszcza się, że fenotyp z cechą oporności na promieniowanie mógł pojawić się w ewolucji pośrednio, jako efekt uboczny mechanizmów komórkowych chroniących przed innymi typami stresu środowiskowego. Przykładowo odwodnienie komórki, podobnie jak promieniowanie, powoduje dwuniciowe pęknięcia w kwasie deoksyrybonukleinowym. Bakteria *D. radiodurans* cechuje się bardzo wysoką opornością na promieniowanie jak i na dehydratację (występuje np. w glebach pustynnych). Szczepy tego gatunku wrażliwe na desykację tracą również oporność na radiację [19, 23, 28, 33, 37, 42, 44, 47, 50, 60]. Podobnie cyjanobakterie *Chroococcidiopsis* spp. tolerują wysokie dawki promieniowania i dehydratację [5, 8]. Jednakże teoria łącząca oporność na radiację z małą wrażliwością na odwodnienie poddawana jest w wątpliwość przez część badaczy, jako niedostatecznie potwierdzona. Przykładowo zaobserwowano, że tolerancja na radiację u badanych termofilnych archeonów, była zbliżona u szczepów opornych jak i wrażliwych na desykację [50]. Podobnie jak dehydratacja, wysoka temperatura uszkadza DNA. Powoduje hydrolityczną depurynację DNA, deaminację aminokwasów, SSBs i DSBs. Niektóre hipertermofile jak np. *T. gammatolerans*, cechują się opornością na promieniowanie. Przypuszcza się więc, że tolerancja na radiację może być efektem ubocznym adaptacji do wysokich temperatur, aczkolwiek ta teza również jest kwestionowana [12, 20, 58]. Rośliny w odpowiedzi na infekcje grzybicze wytwarzają ROS, które działają przeciwdrobnoustrojowo [29]. Wywiera to prawdopodobnie presję selekcyjną, faworyzującą szczepy lepiej znoszące stres oksydacyjny i pośrednio bardziej oporne na promieniowanie. Przypuszczalnie fenotyp z cechą oporności na promieniowanie powstał na drodze ewolucji niezależnie u różnych grup drobnoustrojów (zjawisko konwergencji), ale niewykluczone również, że pochodzi od wspólnych przodków z dawnych epok geologicznych [13, 50]. Bakterie nabywają również geny oporności na czynniki stresu środowiskowego na drodze horyzontalnego transferu genów (HGT – *horyzontal gene transfer*). Przykładowo *D. radiodurans* łatwo ulega naturalnej (w środowisku) jak i sztucznej (w laboratorium) transformacji genetycznej oraz charakteryzuje się chimerycznym genomem, tj. zawierającym wiele sekwencji pochodzących od innych organizmów (np. kodujących oporność na desykację) [37]. Ekspozycja organizmu na promieniowanie może indukować tolerancję u drobnoustrojów oraz selekcjonować szczepy radiooporne – często wytwarzające barwniki o właściwościach antyoksydacyjnych, np. melaninę. Taka sytuacja miała miejsce np. w regionie uszkodzonej elektrowni jądrowej w Czarnobylu na Ukrainie (po awarii w 1986 r.) [7]. Metodami laboratoryjnymi udało się wyselekcjonować szczepy *E. coli* o nadzwyczajnie dużej oporności na promieniowanie. Takie szczepy uzyskano na drodze wielokrotnych ekspozycji na wzrastające dawki promieniowania jonizującego [12, 42].

Rozróżnia się cztery podstawowe strategie przetrwania drobnoustrojów w odpowiedzi na niekorzystne czynniki środowiskowe: 1) działania mające na celu kompensowanie szkodliwego wpływu środowiska na komórkę – np. modyfikacja metabolizmu, wykorzystywanie alternatywnych szlaków metabolicznych, 2) wytwarzanie form przetrwalnikowych (egzo- i endospor), 3) działania mające na celu ochronę komórek przed stresem środowiskowym – np. formowanie otoczek czy biofilmu, 4) naprawa powstałych uszkodzeń w komórce – np. naprawa DNA, hydroliza zdegradowanych białek [28].

U każdego mikroorganizmu występuje, co najmniej kilka podstawowych mechanizmów, środków zaradczych, chroniących komórki przed stresem oksydacyjnym, przed uszkodzeniem DNA i białek oraz usuwających już powstałe defekty w DNA czy eliminujące uszkodzone białka. Są to np.: aktywacja białek szoku na dany czynnik stresogenny (w tym odpowiedź SOS u prokariontów na poważne uszkodzenie DNA – jak powstanie ssDNA), katalaza (oksydoreduktaza rozkładająca nadtlenek wodoru: $2\,H_2O_2 \rightarrow 2\,H_2O + O_2$), peroksydaza (oksydoreduktaza rozkładająca nadtlenek wodoru jednocześnie utleniając inny substrat), dysmutaza ponadtlenkowa (SOD – *superoxide dismutase*, unieczynnia aniorodnik ponadtlenkowy: $2\,O_2^{\cdot -} + 2\,H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$); ponadto: wycinanie uszkodzonych zasad w DNA (BER), wycinanie uszkodzonych nukleotydów (NER – *nucleotide excision repair*); również: naprawa rekombinacyjna, łączenie niehomologicznych zakończeń w DNA (NHEJ – *non-homologous end joining*). Rekombinacja homologiczna oraz NHEJ biorą udział w usuwaniu DSBs u *Prokaryota* i *Eukaryota*. Pierwszy mechanizm wymaga dwóch kopii DNA do naprawy, jednakże jest mniej podatny na błędy niż NHEJ [12, 16, 23, 25, 37, 38, 46, 51, 60, 65]. Większość gatunków drobnoustrojów (prokariotycznych i eukariotycznych) jest w stanie naprawić najwyżej kilka, kilkanaście DSBs DNA. Dla porównania *D. radiodurans* przywraca integralność DNA, w którym miało miejsce

ok. 200 lub wg innych źródeł ok. 100 dwuniciowych pęknięć DNA na chromosom (i jeszcze więcej SSBs) [12, 37, 40, 49]. Przed wolnymi rodnikami chronią komórki także takie przeciwutleniacze, jak np. barwniki karotenoidowe, melanina, flawonoidy, kwas askorbinowy (witamina C), tokoferole (witamina E), retinoidy (witamina A). Wydają się być zgodne z powyższym obserwacje, że wiele grzybów wyizolowanych z okolic uszkodzonej elektrowni w Czarnobylu wytwarza melaninę (np. *Cladosporium sphaerospermum*), a *D. radiodurans* produkuje czerwony barwnik karotenoidowy. Ponadto zarówno w przypadku grzybów jak i *D. radiodurans* szczepy bezbarwne są bardziej wrażliwe na promieniowanie [7, 15, 16, 38, 54, 55]. Przypuszcza się, że małe stężenie jonów żelaza, a wysokie jonów manganu, chroni komórkę przed stresem oksydacyjnym. Mn^{2+} w kompleksach z różnymi związkami inaktywuje różne typy ROS. Często drobnoustroje radiotolerancyjne mają w komórkach wyższy stosunek stężeń Mn^{2+} do Fe^{2+}, w porównaniu z gatunkami wrażliwymi na radiację. Wyjątkiem są sztucznie wyselekcjonowane szczepy *E. coli* oporne na promieniowanie, u których wspomniany stosunek stężeń jonów przyjmuje przeciętne wartości. *D. radiodurans* przy ograniczonym stężeniu manganu w medium hodowlanym wykazuje obniżoną tolerancję na promieniowanie. *Pyrococcus furiosus* po ekspozycji na radiację intensyfikuje ekspresję ferrytynowego białka DPS-podobnego (DNA-*-binding protein from starved cells*). Białko to chelatuje (wiąże) jony żelaza, aby ograniczyć powstawanie rodnika hydroksylowego w reakcji Fentona [3, 12, 13, 18, 21, 29, 38, 41, 55]. Nie tylko uszkodzenie DNA powoduje poważne skutki dla komórki. Ważne znaczenie ma również uszkodzenie białek, odpowiedzialnych m.in. za replikację kwasu deoksyrybonukleinowego i jego naprawę, transkrypcję, translację oraz inne procesy metaboliczne komórki [18, 31].

2. Opis wybranych organizmów radiotolerancyjnych

2.1. Bakterie

Bakterie z rodzaju *Deinococcus* to glebowe ziarniaki lub pałeczki, zwykle barwiące się Gram-dodatnio (jednakże ściana komórkowa jest o atypowej budowie). Optymalna temperatura do wzrostu poszczególnych gatunków mieści się w zakresie 9–50°C [1]. Wiele bakterii z rodzaju *Deinococcus* charakteryzuje się wysoką opornością na promieniowanie jonizujące. Przykładowo są to gatunki: *D. radiodurans*, *D. radiophilus*, *D. desertii*, *D. grandis*, *D. geothermalis*, *D. murrayi*, *D. proteolyticus* [17, 56, 59]; część występuje w glebach pustynnych i jest oporna na dehydratację, np.: *D. desertii*, *D. gobiensis*, *D. xinjiangensis*, *D. radiodurans* [28, 56]. *D. geothermalis* i *D. murrayi* to gatunki termofilne [13, 17, 37, 41]. Gatunki wrażliwe na promieniowanie to np.: *D. altitudinis*, *D. claudonis*, *D. radiomollis* [12].

Deinococcus radiodurans to jedna z najbardziej opornych (z poznanych) na promieniowanie bakterii; również najlepiej zbadana pod względem radiooporności. Drobnoustrój ten przeżywa ekspozycję na dawkę promieniowania 10–15 kGy [2]; według niektórych źródeł nawet 25 kGy – podobnie jak *Rubrobacter radiotolerans* [4]. Do dawki 5 kGy nie obserwuje się u większości komórek w populacji utraty żywotności [13]. Dawkę D10 (LD_{90}) promieniowania jonizującego oszacowano na 10 kGy [33]. *D. radiodurans* to kosmopolityczna – występuje np. w glebie, mezofilna, nieprzetrwalnikująca, nieruchliwa, niepatogenna oraz bezwzględnie tlenowa bakteria; wytwarza czerwony barwnik karotenoidowy – deinoksantynę. Po raz pierwszy została wyizolowana w 1956 r. w USA z puszkowanego mięsa poddanego sterylizacji radiacyjnej. *D. radiodurans* cechuje się również opornością na wysuszenie, stres oksydacyjny i chemiczne czynniki mutagenne. Oporność na radiację być może jest pośrednim skutkiem tolerancji na odwodnienie, które również powoduje uszkodzenia DNA. Komórki są morfologii kulistej, ułożone w tetrady. Sześciowarstwowa ściana komórkowa przypomina budowę bakterii Gram-ujemnych. W błonie komórkowej obecne są nietypowe względem innych bakterii fosfolipidy oraz kwasy tłuszczowe. Bakteria ta wytwarza otoczkę obejmującą grupę kilku komórek [13, 17, 37, 39, 40, 41, 47, 49, 57, 60].

Toroidalny (w kształcie pierścienia), silnie skondensowany oraz podatny na manipulacje genetyczne genom *D. radiodurans* (szczep R1) – obejmuje dwa koliste chromosomy (2,65 Mpz i 0,412 Mpz), kolisty megaplazmid (0,177 Mpz) oraz kolisty plazmid (46 kpz). Prawdopodobnie wiele genów, kodujących np. czynniki oporności na stres środowiskowy – w tym na dehydratację, bakteria ta nabyła na drodze horyzontalnego transferu genów od różnych grup organizmów – np. archeonów, bakterii, roślin. W genomie występuje dużo sekwencji insercyjnych (IS – *insertion sequence*). Procentowa zawartość par GC w DNA wynosi 66,6% [12, 13, 23, 37, 40, 47, 49, 50, 57, 60].

Mechanizmy oporności *D. radiodurans* na promieniowanie nie są jeszcze w pełni poznane. U bakterii tej występują: silnie skondensowany genom w od 4 (faza stacjonarna) do 10 (faza logarytmicznego wzrostu) kopiach (być może zapobiega to dyfuzji uszkodzonych fragmentów DNA oraz utrudnia dostęp czynników uszkadzających do DNA), wysoki współczynnik Fe^{2+}/Mn^{2+}, białko DPS-podobne (wiąże Fe^{2+} oraz odgrywa rolę w kondensacji DNA); ponadto: złożona, wielowarstwowa ściana komórkowa (prawdopodobnie właściwości ochronne), katalaza, SOD, peroksydazy, deinoksantyna (przeciwutleniacz), liczne glikozydazy

i hydrolazy Nudix (usuwające oksydacyjne uszkodzenia DNA), odpowiedź SOS. Również rolę w oporności na promieniowanie mogą odgrywać: liczne proteazy (rozkładające uszkodzone białka), szybka resynteza białek chaperonowych (opiekuńczych) oraz białek cyklu TCA (*tricarboxylic acid cycle*) po napromieniowaniu, mechanizm usuwania uszkodzonych nukleotydów z komórki (zapobiega ponownemu włączeniu do DNA). Obecność wielu kopii genomu niekoniecznie nadaje oporność na promieniowanie. Przykładowo u *E. coli* oraz *Azotobacter vinelandii* może występować odpowiednio 5–18 oraz ponad 100 kopii genomu w komórce, co nie czyni tych bakterii tolerancyjnymi na radiację. Jednakże mechanizm rekombinacji homologicznej do naprawy DSBs wymaga więcej niż jednej kopii genomu. Odnośnie ochronnego działania barwników w komórce – zaobserwowano, że deinoksantyna *D. radiodurans* wydajniej inaktywuje ROS (rodnik hydroksylowy, tlen singletowy, H_2O_2) niż likopen i β-karoten – karoteny czy zeaksantyna i luteina – ksantofile. Bezbarwne szczepy *D. radiodurans* cechują się większą wrażliwością na promieniowanie. Zmniejszenie ilości manganu w pożywce zwiększa ok. 1000-krotnie wrażliwość *D. radiodurans* na promieniowanie. Jony manganu być może ułatwiają kondensację DNA, neutralizując ujemnie naładowane grupy fosforanowe w nukleotydach, co pozwala na zbliżenie helis. Znaczenie systemu SOS nie jest do końca poznane. Nie wykryto polimeraz SOS podatnych na błędy. U *D. radiodurans* nie zaobserwowano nowych, nieznanych wcześniej nauce mechanizmów naprawy DNA. Omawiana bakteria prawdopodobnie dysponuje podobnymi, lecz może o wyższej skuteczności, mechanizmami naprawy kwasu deoksyrybonukleinowego, które występują u innych mikroorganizmów. *D. radiodurans* jest w stanie w ciągu kilku, kilkunastu godzin przywrócić (bez utrwalenia mutacji) integralność genomu, w którym powstało ok. 200 lub 100 dwuniciowych pęknięć DNA na chromosom i jeszcze więcej jedno-niciowych pęknięć. Większość drobnoustrojów jest w stanie naprawić najwyżej kilka-kilkanaście DSBs. Główną przyczyną dużej oporności *D. radiodurans* na radiację zdaje się być nie tyle zapobieganie degradacji DNA, ale szybka i skuteczna zdolność usuwania poważnych uszkodzeń w genomie. Zaproponowano kilka mechanizmów, które mogą przywracać integralność genomu *D. radiodurans* po ekspozycji na radiację i wystąpieniu DSBs. Są to:

- rekombinacja homologiczna: wg modelu Hollidaya, ESDSA (*extended synthesis-dependent strand annealing*), SSA (*single-strand annealing*, może prowadzić do mutacji), BIR (*break-induced replication*), *copy choice*,
- NHEJ (może prowadzić do mutacji).

Zdaniem badaczy najbardziej prawdopodobny jest mechanizm ESDSA. Istotnym białkiem biorącym udział w naprawie DNA – rekombinacji homologicznej, jest RecA. Mutanty *D. radiodurans* pozbawione tego białka cechują się bardzo dużą wrażliwością na promieniowanie. Poza ESDSA rolę w naprawie chromosomu bakteryjnego (genoforu) mogą odgrywać inne mechanizmy, np. BIR, NHEJ. Zaobserwowano, że RecA-zależna naprawa genomu dominuje u omawianej bakterii dopiero kilka godzin po ekspozycji na promieniowanie [13, 14, 18, 23, 31, 37, 40, 47, 49, 51, 54–56, 60].

D. radiodurans może być wykorzystany np. do bioremediacji (usuwania) odpadów radioaktywnych z wód. Zrekombinowane genetycznie szczepy omawianej bakterii, wyposażone w phoK (fosfataza alkaliczna) lub phoN (niespecyficzna fosfataza kwaśna), precypitują za pomocą jonów fosforanowych uran (adsorbowany również na powierzchni komórek). Oporność *D. radiodurans* na promieniowanie nie oznacza pełnej tolerancji względem radioizotopów. Istotna jest również toksyczność chemiczna metali ciężkich, na które wrażliwy jest omawiany drobnoustrój (słaba tolerancja względem $[UO_2]^{2+}$). Inna, potencjalna możliwość zastosowania *D. radiodurans* obejmuje kontrolę skuteczności sterylizacji radiacyjnej – np. preparatów medycznych, odpadów biologicznych [2, 34, 35, 52].

Rubrobacter radiotolerans to Gram-dodatni, nieurzęsiony, nieprzetrwalnikujący, tlenowy, halotolerancyjny, umiarkowanie termofilny gatunek promieniowca (*Actinobacteria*). Starsza nazwa tej bakterii to *Arthrobacter radiotolerans*. Komórki przyjmują kształt pleomorficznych pałeczek. Kolonie na podłożu stałym cechują się różową barwą ze względu na karotenoidowy barwnik (bakterioruberyna). *R. radiotolerans* charakteryzuje się bardzo dużą opornością na radiację (zbliżony poziom do *D. radiodurans*). Mechanizmy oporności na promieniowanie są słabo poznane. Ochronnie działają m.in. karotenoidowy barwnik, SOD, katalaza. U gatunku tego występuje kolisty chromosom (2,88 Mpz) oraz trzy koliste plazmidy (190,9 kpz, 149,8 kpz, 51 kpz). Procentowa zawartość par GC w DNA wynosi 66,91% – szczep RSPS-4 [21, 42, 53]. Innym radiotolerancyjnym gatunkiem z rodzaju *Rubrobacter* jest *R. xylanophilus* [42, 50]

Chroococcidopsis spp. są to szeroko-rozpowszechnione (kosmopolityczne), jednokomórkowe, ekstremofilne, fotosyntetyzujące sinice (*Cyanobacteria*). Występują np. na gorących i zimnych pustyniach w tym na pustyni Atakama w Chile, w Suchych Dolinach McMurdo na Antarktydzie, na pustyni Negew w Izraelu, na pustynnych obszarach Australii czy Półwyspu Synaj w Egipcie. Ten drobnoustrój izolowano również ze słonych i słodkich wód (też gorące źródła), skał, porostów (jako symbiont). Komórki są zazwyczaj o morfologii ziarniaków, koloru ciemno niebiesko-zielonego. *Chroococcidopsis* spp. nie tworzą heterocyst. Są w stanie wiązać azot cząsteczkowy w warunkach beztlenowych. Podobnie jak *D. radiodurans* tolerują

wysuszenie i ekspozycję na promieniowanie jonizujące – przeżywają dawkę 15 kGy. Jednakże mechanizmy oporności na radiację są słabo poznane. Sinice te wytwarzają grube, wielowarstwowe otoczki bogate w polisacharydy. Otoczkom tym przypisywana jest rola ochronna przed odwodnieniem. *Chroococcidopsis* spp. tworzą formy przetrwalne. Są w stanie przeżyć wysokie i niskie temperatury, skrajne wartości pH, duże zasolenie. Produkują neurotoksyczny aminokwas β-N-metylo-amino-L-alaninę oraz hepatotoksyczną mikrocystynę [5, 8, 22, 36].

Methylobacterium, w tym *M. radiotolerans*, to Gram-ujemne (lecz barwią się Gram-zmiennie), urzęsione monotrychalnie, ściśle tlenowe pałeczki. Występują np. w glebie, kurzu, wodzie, ściekach, na powierzchni liści, powietrzu; także w środowisku szpitalnym oraz jako zanieczyszczenie farmaceutyków. Są fakultatywnie metylotroficzne, tj. wykorzystują organiczne związki jednowęglowe jako źródła węgla i energii. Charakteryzują się powolnym wzrostem; optymalna temperatura do wzrostu to 25–30°C. Bakterie te wytwarzają różowy, karotenoidowy barwnik, ureazę oraz katalazę. Jako patogeny oportunistyczne są izolowane np. z przypadków bakteriemii związanej z cewnikowaniem dróg moczowych, infekcji układu nerwowego, skóry. Cechują się często opornością na różne antybiotyki. *M. radiotolerans* jest 10–40 razy bardziej oporny na radiację, niż przeciętne bakterie Gram-ujemne, jednakże dostępne informacje na ten temat są skąpe. Oporność na promieniowanie tej bakterii jest zbliżona do *D. radiodurans*. *M. radiotolerans* przeżywa ekspozycję na promieniowanie równą dawce 25 kGy. Postulowane jest zastosowanie tej bakterii do kontroli sterylizacji radiacyjnej żywności [11, 13, 26].

Kocuria jest rodzajem Gram-dodatnich, tlenowych, nieurzęsionych i nieprzetrwalnikujących ziarniaków, należących do typu *Actinobacteria* (promieniowce). Psychrotolerancyjny szczep *Kocuria* ASB 107, wyizolowany z naturalnie promieniotwórczego źródła Ab-e-Siah w Ramsar w Iraku, charakteryzuje się 40 razy większą opornością na promieniowanie jonizujące w porównaniu do pałeczki okrężnicy. W wodach źródła Ab-e-Siah zaobserwowano występowanie m.in. izotopów radu 226 oraz produktów jego rozpadu. Szczep *Kocuria* ASB 107 jest blisko spokrewniony z *Kocuria rosea* DSM 20447T (99,7% podobieństwa sekwencji 16 S rDNA). Rośnie w przedziale temperatur 0–37°C (optimum 29°C ± 1), w stężeniu chlorku sodu 0–10% (jest halotolerancyjny). Komórki układają się w dwoinki, tetrady albo sześcienne pakiety. Bakteria ta wytwarza katalazę oraz pomarańczowy barwnik. Mechanizm oporności tego drobnoustroju na promieniowanie nie jest poznany. Bakterię tą potencjalnie można by wykorzystać do bioremediacji odpadów radioaktywnych [4].

Serratia marcescens, zwana inaczej pałeczką krwawą, to fakultatywnie beztlenowa, urzęsiona, nieprzetrwalnikująca, Gram-ujemna bakteria; zaliczana jest do rodziny *Enterobacteriaceae* i wchodzi w skład flory bakteryjnej układu pokarmowego człowieka. Komórki tej bakterii wytwarzają czerwony barwnik – prodigiozynę. Drobnoustrój ten jest oportunistycznie chorobotwórczy, powoduje m.in. zakażenia szpitalne. Dużą opornością na radiację charakteryzuje się szczep *S. marcescens* ZF03 wyizolowany z gorących źródeł w Ramsar w Iranie. Region miasta Ramsar jest jednym z miejsc na Ziemi o najwyższym poziomie naturalnego promieniowania – z uwagi na złoża uranu oraz toru. Ze złóż tych, na drodze przemian izotopowych, powstają silnie karcynogenne izotopy radu 226 (ok. 10^6 razy bardziej radioaktywny niż uran) oraz ^{222}Ra. W odpowiedzi na ekspozycję na promieniowanie u tej bakterii dochodzi do różnych zmian metabolicznych. Na przykład zwiększonej ekspresji podlegają białka odpowiedzi na stres, białka chaperonowe (stabilizujące inne białka), proteiny naprawiające i chroniące DNA. Szczegółowe mechanizmy oporności tego drobnoustroju na promieniowanie wymagają poznania. Szczep *S. marcescens* ZF03 charakteryzuje się zdolnością do bioadsorpcji izotopów ^{226}Ra, przez co potencjalnie może być wykorzystywany do bioremediacji wód skażonych promieniotwórczo [61].

Acinetobacter są to szeroko rozpowszechnione, Gram-ujemne, nieurzęsione, nieprzetrwalnikujące, krótkie, pękate pałeczko-ziarniaki. Charakteryzują się małymi wymaganiami odżywczymi. Są bezwzględnie tlenowe, jednakże w komórce nie występuje oksydaza cytochromowa. Powodują oportunistyczne zakażenia szpitalne, w tym np. ran pooperacyjnych, układu nerwowego. Wytwarzają lotne substancje o nieprzyjemnym zapachu. Ich kolonie są bezbarwne i nie zawieszają się w wodzie ze względu na obecność na komórce silnie adhezyjnych fimbrii. Jak wiele organizmów tlenowych wytwarzają katalazę. *A. radioresistens* zaliczany jest do umiarkowanie radiotolerancyjnych drobnoustrojów, aczkolwiek informacje dostępne na temat tej bakterii są skąpe [13, 45, 50].

Kineococcus radiotolerans jest nowo opisaną (2002), Gram-dodatnią, tlenową (lecz w komórce nie występuje oksydaza cytochromowa), urzęsioną polarnie bakterią, oporną na promieniowanie i dehydratację. Zaliczana jest do typu *Actinobacteria* (promieniowce). Komórki mają morfologię ziarniaków. Ich średnica wynosi 1–1,5 μm. W bogatym podłożu hodowlanym tworzą kubiczne pakiety, otoczone ECM (*extracellular matrix*). Gatunek ten wykazuje dimorficzny cykl życiowy; w fazie stacjonarnej wzrostu wytwarza ruchliwe zoospory. *K. radiotolerans* syntetyzuje pomarańczowy barwnik – prawdopodobnie karotenoidowy. Na podłożu stałym tworzy okrągłe kolonie o szorstkich brzegach. Rośnie w temperaturze 11–41°C i toleruje

stężenie chlorku sodu do 5% (jest halotolerancyjny). Rośnie również w warunkach wysokiego stężenia metali i kationów alkalicznych. Bakteria ta przeżywa dawkę promieniowania 20 kGy. Genom *K. radiotolerans* obejmuje liniowy chromosomom (4,76 Mpz), liniowy plazmid (0,18 Mpz) oraz kolisty plazmid (12,92 kpz). Zawartość par GC w DNA wynosi 74,2%. Mechanizmy oporności na promieniowanie i inne czynniki stresu środowiskowego tej bakterii są mało poznane. Wiadomo, że w komórce występuje wyższe stężenie manganu w stosunku do stężenia żelaza. Takie zjawisko obserwuje się również u innych mikroorganizmów radiotolerancyjnych. W genomie omawianej bakterii występuje dużo kopii genów kodujących enzymy chroniące przed ROS (np. katalazę, peroksydazy) oraz kodujących system naprawy NER. W genomie prawdopodobnie nie występuje typowy mechanizmu naprawy źle sparowanych zasad w DNA. Przypuszczalnie rekompensuje to obecność polimerazy DNA o zwiększonej wierności replikacji DNA i zdolności do naprawy własnych błędów. Szczep SRS30216^T tego gatunku wyizolowano z wysoce radioaktywnych odpadów w Savannah River Site w USA (Południowa Karolina). Jest to obszar skażony radioaktywnie na skutek działalności człowieka, związanej z produkcją broni jądrowej. Sugeruje się, że *K. radiotolerans* mógłby być potencjalnie wykorzystany do bioremediacji odpadów nuklearnych [3, 6, 43].

Trupera radiovictrix jest nowo opisaną (2005), Gram-nieokreśloną, umiarkowanie termofilną (optymalna temperatura do wzrostu wynosi 50°C), nieruchliwą, nieprzetrwalnikującą bakterią tlenową, wyizolowaną z gorących źródeł na wyspie São Miguel (Archipelag Azorów). Nie rośnie w temperaturze 20°C ani 60°C. Sklasyfikowana została do typu *Deinococcus-Thermus*. Co dla omawianego typu niezwykłe – bakteria ta fermentuje laktozę bez wytworzenia gazu. *T. radiovictrix* jest drobnoustrojem halotolerancyjnym (optimum 1% NaCl, maksimum 6%). Nie rośnie poniżej pH 6,5 ani powyżej pH 11,2; optymalne pH jest nieco alkaliczne – 7,5–9,5. Wody, z których pochodzą izolaty, miały pH obojętne i niskie zasolenie. W trójwarstwowej ścianie komórkowej tego drobnoustroju nie wykryto peptydoglikanu. Komórki mają kształt kulisty o średnicy 1,25–2 µm; układają się często w pary albo tetrady. Kolonie są barwy pomarańczowej lub czerwonej. *T. radiovictrix* jak wiele bakterii tlenowych wytwarza katalazę. Cechuje się bardzo dużą opornością na promieniowanie (60% komórek przeżywa 5 kGy). Zawartość par GC w DNA wynosi 67,6–67,8% [1]. Mechanizmy oporności na radiację tego drobnoustroju nie są jeszcze odkryte.

Hymenobacter xinjiangensis to gatunek nowo opisanej (2007), Gram-ujemnej, tlenowej, nieptrzetrwalnikującej oraz nieruchliwej pałeczki wyizolowanej z piasków Pustyni Xinjiang w Chinach. Komórki tej bakterii wytwarzają różowy barwnik; mają 0,7 µm średnicy oraz 1-1,5 µm długości. Jak wiele drobnoustrojów tlenowych bakteria ta wytwarza katalazę. *H. xinjiangensis* charakteryzuje się bardzo dużą opornością radiacyjną – przeżywa ekspozycję na promieniowanie równą dawce 9 kGy. Optymalna temperatura do wzrostu dla tej bakterii wynosi 28°C. Zawartość par GC w genomie wynosi 54%. Przyczyny dużej oporności tego gatunku na promieniowanie wymagają zbadania [27].

Jednym z istotnych źródeł wysoce radioaktywnych odpadów są elektrownie jądrowe. Zużyte paliwo przechowuje się wiele lat w dużych, wykonanych z wysokiej jakości stali, zbiornikach wypełnionych ultraczystą wodą, celem ostudzenia zgromadzonego materiału. Na ścianie takiego zbiornika w Hiszpanii zaobserwowano występowanie biofilmu, w którym dominowały bakterie Gram-ujemne – najczęściej z rodzaju *Ralstonia*, np. *R. picketii*. Zaobserwowano również obecność bakterii sklasyfikowanych do następujących gatunków: Gram-ujemne: *Afipia* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Burkholderia cepacia*, *Cellulomonas* sp., *Chryseobacterium* sp., *Methylobacterium* sp., *Pseudomonas saccharophila*, *Rhizobium* sp., *Sphingomonas* sp., *Stenotrophomonas maltophila*, *Xylophilus* sp.; Gram-dodatnie: *Bacillus* sp., *Cordona terrae*, *Microbacterium* sp., *Nocardia seriolae*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saccharolyticus*, *Streptococcus* sp. Wyizolowano również grzyby np. *Aspergillus fumigatus*. Zidentyfikowane oraz hodowalne drobnoustroje stanowiły tylko ok. 1% mikroorganizmów występujących w tym środowisku (pozostałe VNBC – *viable but not culturable*). Biofilm na ścianach zbiornika absorbował występujące w wodzie radioizotopy (np. kobalt 60, cynk 65, chrom 51, cez 137), co potencjalnie może być wykorzystane do ich bioremediacji. Proces ten prawdopodobnie zachodził z udziałem EPS (*extracellular polymeric substances*) oraz ścian komórkowych. Drobnoustroje pokrywające ściany zbiorników powodują biokorozję powierzchni [9, 10, 48]. Inni badacze w podobnym zbiorniku zlokalizowanym we Francji również odnotowali występowanie biofilmu, z którego wyizolowano bakterie: Gram-ujemne: *Ralstonia* sp. oraz *Burkholderia* sp. (najwięcej), *Acinetobacter* sp., *Delftia* sp., *Pseudomonas* sp., Gram-dodatnie: *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Staphyloccoccus* sp. Badacze zaobserwowali występowanie autotrofizmu (samożywności) u większości *Ralstonia* sp. i *Burkholderia* sp., polegającego na wykorzystywaniu energii z utleniania wodoru cząsteczkowego (H_2), powstającego podczas radiolizy wody. Akceptorem elektronów był tlen, a jako źródło węgla drobnoustroje wykorzystywały dwutlenek węgla. Zjawisko to zachodziło w nietypowych warunkach – przy dużym natlenieniu środowiska, w którym normalnie wodór cząsteczkowy nie występuje [24].

3.2. Archeony

Archaea (archeony), nazywane dawniej archeobakteriami, są to drobnoustroje prokariotyczne, wykazujące wspólne cechy zarówno z bakteriami jak i eukariontami [12]. Często występują w skrajnych środowiskach, jak np. w gorących, zasolonych czy głębokich wodach.

Thermococcus gammatolerans to bezwzględnie beztlenowy, hipertermofilny, polarnie urzęsiony archeon, który charakteryzuje się bardzo dużą opornością na promieniowanie jonizujące. Mikroorganizm ten jest szeroko rozpowszechniony w głębokich, zasolonych wodach; można go wyizolować z gorących kominów hydrotermalnych, gdzie występuje duże stężenie metali ciężkich i wysoki poziom naturalnej promieniotwórczości. Rośnie w temperaturze 55–95°C (optimum 88°C). *T. gammatolerans* przeżywa ekspozycję na promieniowanie o dawce równej 5 kGy. Komórki tego drobnoustroju mają średnicę 0,6–1,4 µm, układają się pojedynczo lub w pary. Genom obejmuje kolisty chromosom o wielkości 2,045 Mpz; stosunek par GC do AT wynosi 53,6%. W genomie występują dwa prowirusy jako jedyne ruchome elementy genetyczne. U tego drobnoustroju występuje typowy zestaw mechanizmów naprawy uszkodzeń DNA. Przyczyny wysokiej oporności *T. gammatolerans* na radiację nie są znane. Przypuszcza się, że oporność ta pośrednio wynika z ewolucyjnego przystosowania do życia w wysokich temperaturach, które – podobnie jak promieniowanie – uszkadzają DNA i białka [12, 30, 65].

Pyrococcus furiosus to hipertermofilny (optymalna temperatura do wzrostu wynosi 100°C), beztlenowy, urzęsiony lofotrychalnie archeon. Występuje w środowisku głębokich, oceanicznych kominów hydrotermalnych. Gatunek ten charakteryzuje się znaczną opornością na promieniowanie, być może związaną z adaptacją do życia w wysokich temperaturach; 75% komórek przeżywa ekspozycję na dawkę 2,5 kGy. Przyczyny tolerancji *P. furiosus* na promieniowanie wymagają poznania, jednakże przypuszcza się, że działanie ochronne wykazują: różne enzymy oksydoredukcyjne chroniące przed ROS, część wytwarzana konstytutywnie (np. reduktaza ponadtlenkowa, eliminujące H_2O_2 peroksyredoksyna i tioredoksyna), białko DPS-podobne chelatujące żelazo. Po ekspozycji na radiację zwiększonej ekspresji podlegają np. białko RadA (homolog RecA), odgrywające rolę w naprawie DNA oraz wspomniane DPS. Przypuszcza się, że istotnym mechanizmem naprawy DNA u *P. furiosus* jest rekombinacja homologiczna. Genom omawianego archeona obejmuje chromosom o wielkości ok. 2 Mpz. Nie wykryto w nim mechanizmu odpowiedzi SOS [20, 58]. *P. furiosus* – podobnie jak *D. radiodurans* – skutecznie naprawia DSBs [33].

Halobacterium spp. to mezofilne, obligatoryjnie tlenowe, halofilne oraz nieptrzetrwalnikujące archeony. Komórki barwią się Gram-ujemnie i co typowe dla *Archaea* – nie zawierają peptydoglikanu. Na zewnątrz komórek obecna jest ochronna warstwa S zbudowana z glikoprotein. Drobnoustrój ten wytwarza błonę purpurową, w skład której wchodzi bakteriorodopsyna. Związek ten przetwarza energię świetlną do chemicznej, która jest wykorzystywana przez drobnoustrój w procesach metabolicznych. Przykładowe gatunki rodzaju *Halobacterium* to *H. halobium*, *H. salinarum*, *H. trypanicum*. Szczep *Halobacterium* sp. NRC-1 charakteryzuje się opornością na dehydratację, promieniowanie jonizujące oraz na działanie ultrafioletu; do wzrostu wymaga zasolenia dziesięć razy wyższego niż w wodzie słonej (tj. 250 g/l). 80% lub wg innego źródła 85% komórek tego szczepu przeżywa ekspozycję na dawkę radiacji równą 2,5 kGy. Szczep ten jest dziesięć razy bardziej oporny na promieniowanie jonizujące niż *H. salinarium*. Ochronne działanie przed promieniowaniem przypisuje się: wysokiemu stężeniu chlorku potasu w komórce, dużemu stężeniu bromku sodu (jony bromu wiążą rodniki hydroksylowe), wysokiemu stosunkowi stężeń manganu do żelaza; ponadto: bakterioruberynie w błonie (czerwony karotenoid, antyoksydant), SOD, tioredoksynie (białko inaktywujące wolne rodniki). Uważa się, że chlorek potasu łagodzi efekty oksydacyjne wolnych rodników powstających w czasie radiolizy wody, gdyż jony chlorkowe reagują z rodnikami hydroksylowymi, generując dużo mniej reaktywne rodniki chlorkowe ($Cl^{\cdot}$). Protekcyjny wpływ produkowanych barwników potwierdza obserwacja, że mutanty *H. salinarum* nie wytwarzające pigmentów, cechują się większą wrażliwością na promieniowanie. Do innych cech omawianego mikroorganizmu należy zdolność naprawy dużej liczby DSBs na drodze rekombinacji homologicznej. Natomiast w genomie nie wykryto SOS-podobnego mechanizmu naprawy DNA. Komórki omawianego drobnoustroju w fazie stacjonarnej cechują się większą wrażliwością na promieniowanie niż w okresie logarytmicznego wzrostu – to jest nietypowe. Tłumaczy się to zjawisko tym, że być może w fazie intensywnego wzrostu wydajniej usuwane są reaktywne formy tlenu. Genom *Halobacterium* sp. NRC-1 obejmuje jeden chromosom o wielkości 2,57 Mpz, ponadto dwa megaplazmidy. Procentowa zawartość par GC wynosi 65,9%. Przyczyny ponadprzeciętnej oporności na promieniowanie omawianego szczepu wymagają odkrycia [12, 33, 46, 53].

3.3. Grzyby mikroskopowe

Głownia kukurydzy (*Ustilago maydis*) jest fitopatogenem roślinnym powodującym chorobę guzowatą kukurydzy – śnieć zbożową. Należy do typu *Basidiomycota* (podstawczaki). Charakteryzuje się wysoką

opornością na promieniowanie jonizujące, jednakże mechanizm tej oporności nie jest poznany. Jest to grzyb dimorficzny, rosnący saprofitycznie w postaci drożdżoidalnej; po infekcji tkanek roślinnych rośnie w postaci mycelialnej – strzępków grzybni. Genom tego pasożyta obejmuje ok. 20 Mpz (23 chromosomy). Około 70% genów nie zawiera sekwencji intronowych [29].

26 kwietnia 1986 r. miała miejsca jedna z największych katastrof energetyki jądrowej – w Czarnobylu na Ukrainie. Tamtego dnia na skutek eksplozji został zniszczony czwarty blok elektrowni jądrowej; doszło do uwolnienia materiału promieniotwórczego i skażenia środowiska. Na skutek tego zdarzenia powstała sztuczna nisza ekologiczna o podwyższonym znacznie poziomie promieniowania – ponad 10^5 razy więcej niż naturalna dawka promieniowania (ok. 2,4 mSv/rok [4]). W regionie zniszczonej elektrowni, w tym z uszkodzonych budynków, gleby, nawet z grafitu stanowiącego element reaktora, wyizolowano ok. 200 gatunków radiotolerancyjnych grzybów strzępkowych (mycelialnych), wśród których często występowały grzyby wytwarzające melaninę. Wg różnych danych grzyby wytwarzające ten barwnik stanowiły 30–100% izolatów. Najczęściej izolowane gatunki to: *Cladosporium sphaerospermum* (także *C. cladosporioides*), *Penicillium hirsutum*; ponadto często izolowano: *Acremonium strictum*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus versicolor* (kropidlak różnobarwny), *Aureobasidium pullulans* (drożdżak), *Cladosporium herbarum*. Inne przykładowe gatunki to: *Aspergillus niger* (kropidlak czarny), *Botritis cinerea* (gronowiec szary), *Chrysposporium pannorum*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Mucor plumbeus*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium aurantiogriseum*, *P. lanosum*, *P. roseopurpureum*, *P. spinulosum*, *P. stecki*, *P. westlingii*, *Scopulariopsis* sp., *Stachybotrys chartarum*. W miejscach najsilniej skażonych promieniotwórczo (ok. 0,373–2,053 mSv/h, w artykule źródłowym posługiwano się jednostką mR/h) często izolowano: *Aspergillus flavus* (kropidlak żółty), *A. ochraceus* (kropidlak pomarańczowy), *Beauveria bassiana*, *Geotrichum candidum*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium citrinum*, *Phialophora melinii*. Wśród wymienionych gatunków dominowały drobnoustroje saprofityczne, fitopatogeny (np. *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *F. solani*), sporadycznie gatunki chorobotwórcze dla człowieka (np. *A. niger*, *Geotrichum candidum*). Wiele izolatów z obszaru uszkodzonej elektrowni sklasyfikowano tylko do rodzaju (łącznie ok. 92), należących do gromady *Ascomycota* (workowce), *Basidiomycota* (podstawczaki), Zygomycota (sprzężniowce, np. *Mucor*). Uważa się, że promieniowanie w tym regionie ograniczyło różnorodność gatunkową grzybów mikroskopowych oraz przyczyniało się do selekcji szczepów radiotolerancyjnych, często wytwarzających pigmenty. Zaobserwowano, że najwięcej „zmelanizowanych" grzybów wyizolowano z pozostałości pomieszczeń elektrowni, gdzie występowało największe skażenie radioaktywne. Przyczyny oporności omawianych grzybów na wysokie dawki promieniowania są słabo poznane. Przypuszcza się, że melanina chroni komórki przed wolnymi rodnikami – szczepy bezbarwne są bardziej wrażliwe na radiację. Melanina jest wysokocząsteczkowyn barwnikiem o budowie aromatycznej. Składa się z ciemnobrązowej do czarnej eumelaniny oraz z czerwonobrązowej fotomelaniny. Ponadto rozmnażanie bezpłciowe oraz wytwarzanie form przetrwalnych – sklerocjów, zdaniem badaczy są korzystne z punktu widzenia środowiska, w którym występują omawiane drobnoustroje. Grzyby poddane ekspozycji na promieniowanie często wykazywały również większą tendencję do formowania konidiów (zarodników konidialnych) [7, 15, 16, 19, 32, 62–64].

Ciekawym zjawiskiem, które zaobserwowano u części *Fungi* (cecha szczepowa) wyizolowanych z okolic uszkodzonej elektrowni w Czarnobylu, jest (pozytywny) radiotropizm, inaczej mówiąc (intensywniejszy) wzrost strzępki grzybów w kierunku źródła promieniowania. Zjawisko to występowało wg różnych autorów u 86% [19], 66,7% [16] bądź 19% [32] badanych szczepów. Wyizolowane grzyby, wykazujące kierunkowy wzrost ku źródle promieniowania, należały np. do gatunków: *C. cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *P. lilacinus*, *P. hirsutum*, *P. lanosum*, *P. roseopurpureum*, *P. westingii*. Radiotropizm najczęściej obserwowano na etapie wzrostu młodej strzępki. Grzyby radiotropowe przypuszczalnie wykorzystywały energię z radiacji do wzrostu, do procesów metabolicznych. Mechanizm sensorowy promieniowania nie jest znany, ale część badaczy przypisuje takie właściwości melaninie, która również być może pełni funkcję przekaźnika energii – na podobieństwo chlorofilu. „Zmelanizowane" grzyby *C. sphaerospermum*, *Cryptococcus neoformans* oraz *Wangiella dermatitidis* (drożdżak) wykazywały intensywniejszy, szybszy wzrost (większe CFU i biomasa) po ekspozycji na radiację niż kontrola ujemna (drobnoustroje nie poddane napromieniowaniu lub napromieniowane szczepy albinotyczne). Istnieją alternatywne hipotezy wyjaśniające zaobserwowane zjawisko, np. że nie bezpośrednio radiacja, a ciepło wydzielane do otoczenia, będące następstwem oddziaływania promieniowania z materią, stymuluje do wzrostu grzyby [7, 15, 16, 19, 32, 62, 64].

Występowanie radiooopornych, „zmelanizowanych" grzybów mikroskopowych np. *A. versicolor*, *Cladosporium* sp., *Penicillium expansum*, *Saccharomyces* sp., udało się również zaobserwować na stacjach kosmicznych Mir i ISS (*international space station*), gdzie brak ochronnego działania atmosfery ziemskiej, a także w wodzie chłodzącej reaktor w czynnych elektrowniach jądrowych. Grzyby wyizolowane z obiektów w kosmo-

Tabela I
Porównanie wrażliwości na radiację różnych drobnoustrojów

Mikroorganizm [źródło]	Dawka D10 (LD_{90}) [kGy]
D. radiodurans [33]	**10**
T. radiovictrix [1]	**>5** (60% komórek przeżywa 5 kGy)
T. gammatolerans [33]	4–6
Halobacterium sp. NR28 [33]	5
H. xinjiangensis [27]	4,8
Przetrwalniki bakterii [9]	3–4
P. furiosus [33]	3
Kocuria sp. ASB107 [4]	2
E. coli [33]	**0,25**

sie charakteryzowały się intensywniejszą produkcją barwników, obecnością grubszej otoczki polisacharydowej oraz występowaniem większej liczby wakuol i mitochondriów w komórkach [16]. Również po próbach broni atomowej na atolu Bikini, w archipelagu wysp Marshalla, zaobserwowano występowanie grzybów wytwarzających ciemne pigmenty [64].

Saprofityczne, radiotolerancyjne grzyby mikroskopowe, szczególnie te wykazujące pozytywny radiotropizm, mogą być wykorzystane do bioremediacji (mykoremediacji) środowiska skażonego pierwiastkami promieniotwórczymi. Zaobserwowano, bowiem zdolność grzybów (cecha szczepowa) do rozkładu materii organicznej skażonej pyłem radioaktywnym, adsorpcji izotopów promieniotwórczych na ścianie komórkowej (także zabita biomasa z mniejszą wydajnością), konwersji do formy rozpuszczalnej oraz inkorporacji do komórki. Przykładowo ^{137}Cs jest akumulowany, immobilizowany w komórce przez niektóre szczepy *A. alternata*, *C. cladosporioides*, *Fusarium solani*, *P. roseopurpureum*, *Trichoderma viridae* (szczegółowe informacje w tabeli II) [7, 19, 62].

Radiotolerancyjne grzyby mogą być również wykorzystane jako biomarkery (biowskaźniki) stopnia skażenia promieniotwórczego gleb środowisk leśnych:

- wysoki poziom zanieczyszczeń ($3{,}7 \times 10^6$–$3{,}7 \times 10^8$ Bq/kg) – częste występowanie gatunków: *Chaetomium aureum*, *P. liliacinus*,
- średni poziom ($3{,}7 \times 10^3$–$3{,}7 \times 10^5$ Bq/kg) – częste występowanie gatunków: *A. strictum*, *Arthrinium phaeospermum*,
- niski poziom ($< 3{,}7 \times 10^2$ Bq/kg) – częste występowanie gatunków: *Myrothecium roridum*, *Metarhizium anisioplia* [19].

W tabeli I, na podstawie dostępnych informacji, uszeregowano część omawianych drobnoustrojów pod względem ich wrażliwości na radiację.

4. Podsumowanie

Dyscypliną naukową zajmującą się wpływem promieniowania na organizmy jest radiobiologia. Promieniowanie jonizujące uszkadza DNA, białka, lipidy w komórkach na drodze bezpośredniego oddziaływania oraz na drodze pośredniej – wolnych rodników, ROS. Ekspozycja na promieniowanie może skutkować np. uszkodzeniem zasad azotowych oraz pękaniem wiązań fosfodiestrowych w DNA, delecją fragmentów kwasów nukleinowych, czego efektem mogą być mutacje lub śmierć komórki. Organizmy na drodze ewolucji wykształciły różne mechanizmy zapobiegające uszkodzeniom komórek oraz usuwające powstające defekty, np. enzymy inaktywujące wolne rodniki i ROS – w tym katalaza, wytwarzanie antyoksydantów, różne mechanizmy naprawy DNA (np. BER).

Tabela II
Akumulowanie przez komórki niektórych omawianych organizmów izotopów promieniotwórczych

Gatunek [źródło]	Pierwiastek akumulowany w komórce
A. alternata [19]	^{137}Cs, ^{60}Co
Arthrobacter sp. [52] za Sakaguchi	U (ok. 600 mg/1 g s.m.)
A. niger [62]	Th
Bacillus subtilis [52] za Sakaguchi	U (ok. 600 mg/1 g s.m.)
Candida utilis [19]	Rb
C. cladosporioides, *C. sphaerospermum* [19, 62]	^{137}Cs, ^{152}Eu (w mniejszym stopniu niż cez)
F. solani [19]	^{137}Cs, Rb
P. lilacinus [62]	^{137}Cs, ^{152}Eu (w mniejszym stopniu niż cez)
P. roseopurpureum [19, 62]	^{137}Cs, ^{152}Eu (w mniejszym stopniu niż cez)
Resinicium bicolor [19]	Sr
Rhizopus sp. [19]	^{14}C, ^{32}P, Th (*R. arrhizus*)
Stemphylium sp. [19]	^{14}C, ^{32}P
Trichoderma sp. [19]	^{137}Cs (*T. viridae*), ^{14}C, ^{32}P

Poznano wiele drobnoustrojów radiotolerancyjnych, które sklasyfikowano do domen: *Bacteria*, *Archaea* i *Eukarya*. Przykładowo odkryto grzyby mikroskopowe, występujące w rejonach uszkodzonej elektrowni w Czarnobylu na Ukrainie (np. *Cladosporium* spp.) czy bakterie rosnące w postaci biofilmu na ścianach zbiorników, w których przechowuje się zużyte paliwo z elektrowni jądrowych (np. *Ralstonia* sp., *Burkholderia* sp.). Organizmy na Ziemi pochłaniają rocznie niewielką dawkę promieniowania równą ok. 2,4 mSv. Stąd przypuszcza się, że fenotyp z cechą oporności na promieniowanie powstał w ewolucji pośrednio, jako efekt uboczny mechanizmów komórkowych chroniących przed innymi typami stresu środowiskowego (np. dehydratacją, wysoką temperaturą).

Najlepiej poznanym oraz jednym z najbardziej opornych na promieniowanie drobnoustrojów znanych nauce jest *D. radiodurans*, który przeżywa ekspozycję na promieniowanie równą dawce 10–15 kGy. Ta tlenowa, kulista, Gram-dodatnia, niewytwarzająca spor, nieruchliwa oraz łatwo ulegająca transformacji genetycznej (naturalnej i sztucznej) bakteria od lat budzi zainteresowanie różnych badaczy. Również dużą oporność na promieniowanie wykazują np. *R. radiotolerans*, *M. radiotolerans* czy *Chroococcidiopsis* spp.

W dostępnych pracach naukowych związanych z radiobiologią często pomijana jest kwestia definicji drobnoustrojów radiotolerancyjnych. Podana we wstępie definicja jest niepełna i wymaga uszczegółowienia. Zdaniem autora godne rozważenia jest uściślenie definicji mikroorganizmów radiotolerancyjnych (radiooopornych) jako np.: drobnoustroje (eukariotyczne i prokariotyczne) nieprzetrwalnikujące, zdolne do przetrwania (minimum 10% CFU z wyjściowej gęstości zawiesiny 0,5 w skali McFarlanda po 24–72 h inkubacji w optymalnych dla drobnoustroju warunkach) dawki promieniowania γ lub X równej 1,5 kGy, pochłoniętej w ciągu godziny; dla drobnoustrojów wytwarzających spory – dawka np. 4,5 kGy. W przypadku badania wrażliwości organizmów anaerobowych (beztlenowych) na radiację podłoże hodowlane nie powinno zawierać substancji obniżających potencjał redoks (np. kwas askorbinowy, tioglikolan sodu, siarczyn sodu, cysteina), aby nie zawyżać otrzymanego wyniku. W takim przypadku można zastosować np. aerostat.

Mikroorganizmy radiotolerancyjne potencjalnie mogą być wykorzystane do bioremediacji odpadów radioaktywnych, m.in. na drodze bioadsorpcji, bioakumulacji radioizotopów przez komórki (np. ^{137}Cs z udziałem *C. cladosporioides*, *Ralstonia* sp.) lub bioprecypitacji np. uranu za pomocą zmodyfikowanych genetycznie szczepów *D. radiodurans*. Jednakże oporność na promieniowanie nie oznacza pełnej niewrażliwości na radioizotopy. Istotna jest również toksyczność chemiczna metali ciężkich, na które wrażliwe jest wiele organizmów, w tym *D. radiodurans*. Drobnoustroje oporne na promieniowanie mogą być również wykorzystane do kontroli skuteczności sterylizacji radiacyjnej np. sprzętów medycznych.

Piśmiennictwo

1. Albuquerque L., Simoës C., Nobre M.F., Pino N.M., Battista J.R., Silva M.T., Rainey F.A., Costa M.S.: *Trupera radiovictrix* gen. nov., sp. nov., a new radiation resistant species and the proposal of *Truperaceae* fam. nov. *FEMS Microbiol. Lett.* **247**, 161–169 (2005)
2. Appukuttan D., Seetharam C., Padma N., Rao A.S., Apte S.K.: PhoN-expressing, lyophilized, recombinant *Deinococcus radiodurans* cells for uranium bioprecipitation. *J. Biotechnol.* **154**, 285–290 (2011)
3. Ardini M., Fiorillo A., Fittipaldi M., Stefanini S., Gatteschi D., Ilari A., Chiancone E.: *Kineococcus radiotolerans* Dps forms a heteronuclear Mn-Fe ferroxidase center that may explain the Mn-dependent protection against oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta*, **1830**, 3745–3755 (2013)
4. Asgarani E., Soudi M.R., Borzooee F., Dabbagh R.: Radio-resistance in psychotrophic *Kocuria* sp. ASB 107 isolated from Ab-e--Siah radioactive spring. *J. Environ. Radioactivity*, **113**, 171–176 (2012)
5. Bagué M., Vera J.P., Rettberg P., Billi D.: The BOSS and BIOMEX space experiments on the EXPOSE-R2 mission: endurance of the desert cyanobacterium *Chroococcidiopsis* under simulated space vaccum, Martian atmosphere, UVC radiation and temperature extremes. *Acta Astronaut.* **91**, 180–186 (2013)
6. Bagwell C.E., Bhat S. Hawkins G.M., Smith B.W., Biswas T., Hoover T.R., Saunders E., Han C.S., Tsodikov O.V., Shimkets L.J.: Survival in nuclear waste, extreme resistance, and potential applications gleaned from the genome sequence of *Kineococcus radiotolerans* SRS30216. PLoS ONE, **3**, 1–16 (2008)
7. Belozerskaya T., Aslanidi K., Ivanova A., Gessler N., Egorova A., Karpenko Y., Olishevskaya S.: Characteristics of extremophilic fungi from Chernobyl nuclear power plant (w) Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, red. A. Méndez-Vilas, Formatex, Badajoz, 2010, s. 88–94
8. Billi D., Friedmann E.I., Hoffer K.G., Caiola M.G., Ocampo--Friendman R.: Ionizing-radiation resistance in dessication-tolerant cyanobacterium *Chroococcidiopsis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1489–1492 (2000)
9. Chicote E., Garcia A.M., Moreno D.A., M.I. Sarró, Lorenzo P.I., Montero F.: Isolation and identification of bacteria from spent nuclear fuel pools. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 155–162 (2005)
10. Chicote E., Moreno D.A, Garcia A.M., Sarro M.I., Lorenzo P.I., Montero F.: Biofouling on the walls of a spent nuclear fuel pool with radioactive ultrapure water. *Biofouling*, **20**, 35–42 (2004)
11. Chih-Cheng L., Aristine C., Wei-Lun L., Che-Kim T., Yu--Tsung H., Kuei-Pin C., Meng-Rui L., Po-Ren H.: Infections caused by unusual *Methylobacterium* species. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 3329–3331 (2011)
12. Confalonieri F., Sommer S.: Bacterial and archaeal resistance to ionizing radiation. *J. Phys. Conf. Ser.* **261**, 1–15 (2005)
13. Cox M.M., Battista J.R.: *Deinococcus radiodurans* – the consummate survivor. *Nat. Rev. Mirobiol.* **3**, 882–892 (2005)
14. Cox M.M., Keck J.L., Battista J.R.: Rising from the ashes: DNA repair in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS Genet.* **6**, 1–2 (2010)

15. Dadachova E., Bryan R.A., Huang X., Moadel T., Schweitzer A.D., Aisen P., Nosanchuk J.D., Casadevall A.: Ionizing radiation changes the electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi. *PLoS ONE*, **5**, 1–13 (2007)
16. Dadachova E., Casadevall A.: Ionizing radiation: how fungi cope, adapt, and exploit with the help of melanin. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 525–531 (2008)
17. Daly M.J.: Engineering radiation-resistant bacteria for environmental biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 280–285 (2000)
18. Daly M.J., Fredrickson J.K. i wsp.: Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radioresistance. *PLoS Biol.* **5**, 769–779 (2007)
19. Dighton J., Tugay T., Zhdanova N.: Fungi and ionizing radiation from radionuclides. *FEMS Microbiol. Lett.* **281**, 109–120 (2008)
20. DiRuggiero J., Santangelo N., Nackerdien Z., Ravel J., Robb F.T.: Repair of extensive ionizing-radiation DNA damage at 95 degrees C in the hypertermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Bacteriol.* **179**, 4643–4645 (1997)
21. Egas C., Barroso C., Froufe H.J.C., Pacheco J., Albuqerque L., Costa M.S.: Complete genome sequence of the radiation-resistant bacterium *Rubrobacter radiotolerans* RSPS-4. *Stand. Genomics Sci.* **9**, 1062–1075 (2014)
22. Fewer D., Friedl T., Büdel B.: *Chroococcidiopsis* and heterocyst--differentiating cyanobacteria are each other's closest living relatives. *Mol. Phylogenetics Evol.* **23**, 82–90 (2002)
23. Frenkiel-Krispin D., Minsky A.: Nucleoid organization and the maintenance of DNA integrity in *E. coli*, *B. subtilis* and *D. radiodurans*. *J. Struct. Biol.* **156**, 311–319 (2006)
24. Galès G., Libert M.F., Sellier R., Cournac L., Chapon V., Heulin T.: Molecular hydrogen from water radiolysis as an energy source for bacterial growth in a basin containing irradiating waste. *FEMS Microbiol. Lett.* **240**, 155–162 (2004)
25. Galhardo R.S., Rosenberg S.M.: Extreme genome repair. *Cell*, **136**, 998–1000 (2009)
26. Green P.N.: *Methylobacterium*. *Prokaryotes*, **5**, 257–265 (2006)
27. Hang Q., Liu C., Tang Y., Zhou G., Shen P., Fang C., Yokota A.: *Hymenobacter xinjiangensis* sp. nov., a radiation-resistant bacterium isolated from the desert of Xinjiang, China. *Int. J. Systematic. Evol. Microbiol.* **57**, 1752–1756 (2007)
28. Heulin T., De Luca G., Barakat M., Groot A., Blanchard L., Ortet P., Achouak W.: Bacterial adaptation to hot and dry deserts (w) Adaptation of microbial life to environmental extremes, red. Stan-Lotter H., Fendrihan S., Springer-Verlag, Wiedeń, 2012, s. 69–85
29. Holloman W.K., Schirawski J., Holliday R.: Towards understanding the extreme radiation resistance of *Ustilago maydis*. *Trends Microbiol.* **15**, 527–528 (2007)
30. Jolivet E., L'Haridon S., Corre E., Forterre P., Prieur D.: *Thermococcus gammatolerans* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent that resists ionizing radiation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 847–851 (2003)
31. Joshi B., Schmid R., Altendorf K., Apte S.K.: Protein recycling is a major component of post-irradiation recovery in *Deinococcus radiodurans* strain R1. *Biochem. Bioph. Res. Commun.* **320**, 1112–1117 (2004)
32. Kerpenko Y.V., Redchitz T.I., Zheltonozhsky V.A., Dighton J., Zhdanova N.N.: Comparative responses of microscopic fungi to ionizing radiation and light. *Folia Microbiol.* **51**, 45–49 (2006)
33. Kottermann M., Kish A., Iloanusi C., Bjork S., DiRuggiero J.: Physiological responses of the halophilic archaeon *Halobacterium* sp. strain NR28 to desiccation and gamma irradiation. *Extremophiles*, **9**, 219–227 (2005)
34. Kulkarni S., Ballal A., Apte S.K.: Bioprecipitation of uranium from alkaline waste solutions using recombinant *Deinococcus radiodurans*. *J. Hazard. Mater.* **262**, 853–861 (2013)
35. Lloyd J.R, Renshaw J.C.: Bioremediation of radioactive waste: radionuclide-microbe in interactions in laboratory and field--scale studies. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 254–260 (2005)
36. Magana-Araccchchi D.N., Wanigatunbge R.P.: First report of genus *Chroococcidiopsis* (cyanobacteria) from Sri Lanka: a potential threat to human health. *J. Nat. Sci. Found. Sri Lanka*, **41**, 65–68 (2013)
37. Makarova K.S., Aravind L., Wolf Y.I., Tatusov R.L., Minton K.W., Koonin E.V., Daly M.J.: Genome of the extremely radiation--resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 44–79 (2001)
38. Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A, Rodwell V.W.: Biochemia Harpera. Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, 2006
39. Melin A.M., Perromat A., Déléris G.: Sensitivity of *Deinococcus radiodurans* to γ-irradiation: a novel approach by Fourier transform infrared spectroscopy. *Arch. Biochem Bioph.* **394**, 265–274 (2001)
40. Narumi I.: Unlocking radiation resistance mechanism: still a long way to go. *Trends Microbiol.* **11**, 422–425 (2003)
41. Omelchenko M.V., Wolf Y.I., Gaidamakova E.K., Matrosova V.Y., Vasilenko A., Zhai M., Daly M.J., Koonin E.V., Makarova K.S.: Comparative genomics of *Thermus thermophilus* and *Deinococcus radiodurans*: divergent routes of adaptation to termophyly and radiation resistance. *BMC Evol. Biol.* **5**, 109–120 (2005)
42. Pavlov A.K., Kalinin V.L., Konstantinov A.N., Shelegedin V.N., Pavlov A.A.: Was Earth ever infected by Martian biota? Clues from radioresistant bacteria. *Astrobiol.* **6**, 911–918 (2002)
43. Philips R.W., Wiegel J., Berry C.J., Fliermans C., Peacock A.D., White D.C., Shimkets L.J.: *Kineococcus radiotolerans* sp. nov., a radiation-resistant, Gram-positive bacterium. *Int. J. Systematic. Evol. Microbiol.* **52**, 933–938 (2002)
44. Rainey F.A., Costa M.S. i wsp.: Extensive diversity of ionizing--radiation-resistant bacteria recovered form Sonoran Desert soil and description of nine new species of the genus *Deinococcus* obtained from a single soil sample. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 5225–5235 (2005)
45. Różalska M.: Tlenowe pałeczki Gram-ujemne (w) Diagnostyka bakteriologiczna, red. Szewczyk E.M., Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2009, s. 101–110
46. Różalski A.: Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej. Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź 2004
47. Sale J.E.: Radiation resistance: resurrection by recombination. *Curr. Biol.* **17**, 12–13 (2007)
48. Sarró M.I., Moreno D.A., Chicote E., Lorenzo P.I., Garcia A.M., Montero F.: Biofouling on austentic stainless steels in spent nuclear fuel pools. *Mater. Corros.* **54**, 535–540 (2003)
49. Seipp R.: *Deinococcus radiodurans*: does this bug wear a lead vest or what? *BioTeach J.* **1**, 57–62 (2003)
50. Sghaier H.: DNA repair: lessons from the evolution of ionizing--radiation-resistant prokaryotes – fact and theory (w) Selected Topics in DNA Repair, red. Chen C., INTECH Open Access Publisher, 2011, San Diego, s. 145–156
51. Slade D., Lindner A.B., Paul. G., Radman M.: Recombination and replication in DNA repair of heavily irradiated *Deinococcus radiodurans*. *Cell*, **136**, 1044–1055 (2009)
52. Suzuki Y., Banfield J.F.: Resistance to, and accumulation of, uranium by bacteria from uranium-contaminated site. *Geomicrobiol. J.* **21**, 113–121 (2004)
53. Terato H., Suzuki K., Nishioka N., Okamoto A., Shimazaki--Tokuyama Y., Inoue Y., Saito T.: Characterization and radio--resistant function of manganese superoxide dismutase *Rubrobacter radiotolerans*. *J. Radiat. Res.* **52**, 735–742 (2011)
54. Tian B., Hua Y.: Carotenoid biosynthesis in extremophilic *Deinococcus-Thermus* bacteria. *Trends Microbiol.* **18**, 512–520 (2010)

55. Tian B., Xu Z., Sun Z., Lin J., Hua Y.: Evaluation of the antioxidant effects of carotenoids from *Deinococcus radiodurans* through targeted mutagenesis, chemiluminescence and DNA damage analyses. *Biochim. Bioph. Acta*, **1770**, 902–911 (2007)
56. Toueille M., Armengaud J. i wsp.: A comparative proteomics approach to better define *Deinococcus* nucleoid specificities. *J. Proteomics*, **75**, 2588–2600 (2012)
57. Wan P., Yue Z., Xie Z., Gao O., Yu M., Yang Z., Huang J.: Mechanisms of radiation resistance in *Deinococcus radiodurans* R1 revealed by the reconstruction of gene regulatory network using Bayesian network approach. *J. Proteomics Bioinform.* **6**, 1–5 (2013)
58. Williams E., Lowe T.M., Savas J., DiRuggiero J.: Microarray analysis of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* exposed to gamma irradiation. *Extremophiles*, **11**, 19–29 (2007)
59. Yun Y.S., Lee Y.N.: Production of superoxide dismutase by *Deinococcus radiophilus*. *J. Biochem. Mol. Biol.* **36**, 282–287 (2003)
60. Zahradka K., Slade D., Bailone A., Sommer S., Averbeck D., Petranovic M., Lindner A.B., Radman M.: Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*. *Nature*, **443**, 569–573 (2006)
61. Zakeri F., Sadeghizadeh M., Kardan M.R., Zahiri H.S., Ahmadian G., Masoumi F., Sharafi H., Rigi G., Vali H., Noghabi K.A.: Differential proteome analysis of a selected bacterial strain isolated from a high background radiation area in response to radium stress. *J. Proteomics*, **75**, 4620–4832 (2012)
62. Zhdanova N.N, Redchits T.I., Zheltonzhsky V.A., Sadovnikov L.V., Gerzabek M.H., Olsson S., Strebl F., Mück K.: Accumulation of radionuclides from radioactive substrata by some micromycetes. *J. Environ. Radioactivity*, **67**, 119–130 (2003)
63. Zhdanova N.N., Tugay T., Dighton J., Zheltonzhsky V., Mcdermott P.: Ionizing radiation attracts soil fungi. *Mycol. Res.* **108**, 1089–1096 (2004)
64. Zhdanova N.N., Zakharczenko V.A., Vember V.V., Nakonechnaya L.T.: Fungi from Chernobyl: mycobiota of the inner regions of the containment structures of the damaged nuclear reactor. *Mycol. Res.* **104**, 1421–1426 (2000)
65. Zivanovic Y., Armengaud J., Lagorce A., Leplat C., Guérin P., Dutertre M., Anthouard V., Forterre P., Wincker P., Confalonieri F.: Genome analysis and genome-wide proteomics of *Thermococcus gammatolerans*, the most radioresistant organism known amongst the *Archaea*. *Genome Biol.* **10**, 1–23 (2009)

POST. MIKROBIOL.,
2016, 55, 2, 195–204
http://www.pm.microbiology.pl

WPŁYW STRESU KWASOWEGO I OSMOTYCZNEGO NA WYTWARZANIE METABOLITÓW PRZY UŻYCIU MIKROORGANIZMÓW

Jan Fiedurek[1]*, Mariusz Trytek[1]

[1] Zakład Mikrobiologii Przemysłowej, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Uniwersytet M. Curie-Skłodowskiej

Wpłynęło we wrześniu 2015 r.
Zaakceptowano w styczniu 2016 r.

1. Wstęp. 2. Stresy abiotyczne. 2.1. Stres kwasowy. 2.2. Stres osmotyczny. 3. Podsumowanie

The efect of acid and osmotic stress onmetabolite production by microorganisms

Abstract: The efficiency of the overall biotechnological processes is strongly dependent on the interaction between the microbial biocatalyst and the stressful environment. Microorganisms have evolved to survive constant fluctuation in their external surroundings by special adaptation systems, including the reorganization of genomic expression by activation of transcriptional factors under stress conditions and the production of suitable metabolites. There is some evidence that more active microbial cells may be obtained by using abiotic stresses, such as osmotic and acidic stress, before or during the process. Also, changes in the conditions of stress application, for example its duration or simultaneous increase in temperature, may improve the yield, probably as a result of changes in the metabolic pathway of the microorganisms used. In this review, we have summarized the most important information from available literature on the effect of acid and osmotic stress on the production of useful metabolites by microorganisms.

1. Introduction. 2. Abiotic stresses. 2.1. Acidic stress. 2.2. Osmotic stress. 3. Conclusions

Słowa kluczowe: stres kwasowy i osmotyczny, metabolity
Key words: acid and osmotic stress, metabolites

1. Wstęp

Reakcje komórek na nagłe zmiany w środowisku i mechanizmy ochrony ich przed uszkodzeniami powodowanymi przez warunki stresowe, przeżywają prawdziwy rozkwit zainteresowania. Pojawia się coraz więcej doniesień naukowych poświęconych tym zjawiskom. Wzrost zainteresowania związany jest z pogłębieniem wiedzy na temat wpływu stresu na metabolizm drobnoustrojów wykorzystywanych w wielu gałęziach przemysłu, między innymi: w przemyśle fermentacyjnym, mleczarskim, farmaceutycznym, biotechnologicznym, chemicznym, tekstylnym i wielu innych. W przypadku organizmów jednokomórkowych warunki stresowe mogą być określane jako czynniki środowiska, które powodują hamowanie tempa wzrostu drobnoustrojów [30, 52, 66].

Odpowiedź organizmu na zmieniające się warunki środowiska zewnętrznego jest złożona i wymaga skoordynowanych mechanizmów percepcji, przekazywania oraz amplifikacji sygnału. Prowadzi to do zahamowania, bądź stymulacji ekspresji odpowiednich genów, zmian metabolizmu komórkowego oraz innych aspektów fizjologii. Drobnoustroje posiadają wiele mechanizmów umożliwiających przetrwanie w warunkach stresów środowiskowych [22]. Są one zależne od rodzaju organizmu, na który stres oddziałuje, rodzaju działającego stresu, od jego intensywności, a także od tego czy dany stres występuje pojedynczo, czy synergistycznie z innym czynnikiem stresowym. Często występuje stres wieloczynnikowy, w którym nakładają się na siebie stresy jednoczynnikowe, mogące mieć negatywny wpływ na warunki fermentacji np. podczas produkcji bioetanolu [30]. Znaczącą rolę w odpowiedzi bakterii na stresy środowiskowe odgrywają system SOS, reakcja chemotaksyjna i odpowiedź ścisła (*stringent responce*), polegająca na adaptacyjnej reakcji organizmu na zmiany w dostępie pożywienia (np. głód aminokwasowy) i inne stresy środowiskowe [18, 50].

W ochronę komórek przed działaniem stresów środowiskowych zaangażowany jest mechanizm genetyczny. U drożdży określono ok. 499 genów CER (*common enviromental response*) – 216 indukowanych i 283 represjonowanych. Grupa genów indukowanych stresem dotyczy: metabolizmu węglowodanów, generowania energii, metabolizmu kwasów tłuszczowych, fałdowania i degradacji białek a także stresu komórkowego (białka szoku cieplnego, detoksyfikacja reaktywnych form tlenu, naprawa uszkodzeń DNA), podczas gdy geny represjonowane stresem powiązane są z procesami wzrostu, metabolizmem RNA, metabolizmem nukleotydów i białkami rybosomalnymi [30, 42].

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Przemysłowej, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Uniwersytet M. Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin; tel. 81 5375933; e-mail: janek@poczta.umcs.lublin.pl

Potencjalne korzyści wynikające ze wspólnej natury mechanizmów odpowiedzialnych za adaptację komórki do różnorodnych zmian zachodzących w otoczeniu (np. ekspozycja komórki na warunki podwyższonego ciśnienia osmotycznego) może przygotować ją również do przetrwania w warunkach podwyższonej temperatury i odwrotnie. Wiele danych wskazuje, że mechanizm ten ma o wiele szerszy wymiar praktyczny, a tego typu zabieg adaptacyjny może pozwolić na zabezpieczenie komórki przed szerokim spektrum warunków stresowych [1, 48, 60]. Znajomość mechanizmów adaptacyjnych do określonych stresów może zminimalizować ich negatywne skutki, przez co zwiększyć wydajność określonych metabolitów. Ponadto poznanie genów ulegających aktywacji pod wpływem określonego bodźca stresowego może pozwolić na modyfikacje genetyczne bakterii, pod kątem ich zastosowań aplikacyjnych. Z pewnością wiedza dotycząca odpowiedzi komórkowej na poziomie genomu pozwoli usprawnić selekcję szczepów pod względem cech wrażliwości lub odporności na dany stres. W związku z tym coraz częściej mówi się o stosowaniu zabiegów adaptacji stresowej stającej się nowym, atrakcyjnym narzędziem w rękach biotechnologów [30].

Znajomość czynników warunkujących odpowiedzi drobnoustrojów chorobotwórczych na stres może mieć znaczenie w zapobieganiu lekooporności. Szlaki odpowiedzi komórek na warunki stresowe mogą być odpowiednimi celami dla interwencji terapeutycznej [52].

Wiele gałęzi przemysłu spożywczego wykorzystuje działalność wyselekcjonowanych drobnoustrojów. Szerokie zastosowanie, zwłaszcza w produkcji żywności fermentowanej, znajdują bakterie fermentacji mlekowej, które uznaje się za niezmiernie ważne dla zdrowia człowieka. Rozszerzenie zakresu badań odpowiedzi LAB na stres pozwala przeprowadzić kompleksową analizę wrażliwości bakterii na czynniki niekorzystne, wynikające z kryteriów stawianym bakteriom przeznaczonym do zastosowania przemysłowego i probiotycznego [46, 57].

Istnieje wiele badań dotyczących wpływu stresów abiotycznych na wydajność metabolitów syntetyzowanych przez mikroorganizmy (tab. II i III). Dotyczy to zarówno biosyntezy metabolitów pierwszorzędowych, takich jak aminokwasy [32, 67], drugorzędowych, np. enzymy [24–27, 43, 29, 31, 49, 60], drobnoustrojowe toksyny [19, 21, 63] i innych substancji np. karnityna [7], erytrytol [72], kwas α-ketoglutarowy [44], kwas poli-γ-glutaminowy [68]. Czasami lepszy efekt można uzyskać stosując dwa lub więcej czynników stresowych równocześnie, np. w wyniku zastosowania szoku temperaturowego, osmotycznego i alkalicznego w hodowli *Bacillus licheniformis* zwiększono wydajność biosyntezy kwasu poli-γ-glutaminowego o ok. 185% [68].

2. Stresy abiotyczne

Stresem abiotycznym nazywamy wszelkie czynniki nieożywione, które mogą powodować szkodliwe skutki dla mikroorganizmów. Do stresu abiotycznego możemy zaliczyć: stres temperaturowy (podwyższenie lub obniżenie temperatury), stres osmotyczny, stres oksydacyjny, stres pH (zasadowość lub kwasowość środowiska), stres mechaniczny, stres ciśnieniowy, stres pokarmowy, stres wynikający z akumulacji toksycznych metabolitów (np. stres etanolowy), stres synergistyczny (wieloczynnikowy).

2.1. Stres kwasowy

Bardzo istotnym czynnikiem środowiska warunkującym wzrost drobnoustrojów jest wartość stężenia jonów wodorowych wyrażona wartością pH. Nie może być ona, ani za niska, ani za wysoka. Optymalna wartość pH do wzrostu mikroorganizmów oscyluje wokół odczynu obojętnego. Do najbardziej opornych drobnoustrojów na ten rodzaj stresu należą termofilne archeony z rodzaju *Picrophilus,* które znoszą spadek pH nawet do zera. Z kolei za najbardziej wytrzymałe z pośród alkalofili uważa się bakterie *Clostridium paradoxum*, której górna granica tolerownego pH wynosi 11 i alkalofilną sinicę *Leptolyngbya nostocorum* rosnącą nawet przy pH 13. Niezależnie od tego, czy organizm występuje w środowisku silnie kwaśnym, czy silnie zasadowym, pH wewnątrz jego komórki zbliżone jest do obojętnego. Utrzymanie obojętnego odczynu cytoplazmy możliwe jest dzięki nieprzepuszczaniu jonów wodorowych do wnętrza komórki, a gdy istnieje taka potrzeba, jony wodorowe są natychmiast z niej wydalane. Jony wodorowe jak i wodorotlenowe, występujące w nadmiarze mogą doprowadzić do wielu zaburzeń metabolicznych. Nadmiar jonów wodorowych prowadzi do zaburzeń działania pomp protonowych, jak choćby syntazy ATP, która jest jednym z kluczowych enzymów dla prawidłowego funkcjonowania komórki. Z kolei wysokie stężenie jonów wodorotlenowych może skutkować zahamowaniem syntezy białek i aktywności oddechowej. Powyższe przykłady dotyczą bezpośredniego wpływu odczynu środowiska na metabolizm drobnoustrojów, ale wartość pH środowiska może także pośrednio wpływać na żywotność organizmów. Wartość pH środowiska wpływa na stopień dysocjacji słabych zasad i słabych kwasów, które znajdują się w tym środowisku. Forma niezdysocjowana może łatwiej przenikać do wnętrza komórek i powodować silne działanie toksyczne. Znajomość wpływu wartości pH na metabolizm i wzrost drobnoustrojów jest bardzo ważna w wielu gałęziach przemysłu, a w szczególności podczas procesu utrwalania żywności. Obniżenie pH

niektórych produktów może zmniejszyć możliwość ich zakażenia bakteryjną mikroflorą bez znaczących zmian w smaku tych produktów [40].

Stres kwasowy definiuje się jako łączny biologiczny efekt niskiego pH i słabych organicznych kwasów obecnych w środowisku. Słabe kwasy obejmują lotne kwasy tłuszczowe (VFAs) jak masłowy, propionowy i octowy wytworzone w następstwie fermentacji. Słabe kwasy w formie cząsteczkowej mogą dyfundować przez błonę komórkową i dysocjować wewnątrz komórki, obniżając wewnętrzną wartość pH (pHi). Przy obniżeniu zewnętrznej wartości pH (pHo), niezdysocjowany słaby kwas będzie dyfundować przez membranę (oparty na wartości pKa) i wpływać na pHi. To oznacza, że wystarczy mniej kwasu organicznego do zabicia komórek przy pHo 3,5 niż przy pHo 4,4. Uważa się również, że wewnątrzkomórkowe nagromadzenie się słabych kwasów, oprócz zakwaszania, ma także negatywny wpływ na komórki [4].

W procesie fermentacji przy użyciu drożdży często ustalana wartość pH różni się od optymalnego dla wzrostu organizmu gospodarza. Wynika to z faktu większej ich stabilności i produktywności [58], albo zmniejszonej proteolizy [12]. Proces fermentacji przy niskich wartościach pH często jest stosowany przy produkcji białek rekombinowanych. Shi i wsp. [58] określili optimum pH dla biosyntezy przeciwciał w zakresie pH 7,5–8,0, który nie jest skorelowany z inhibicją proteazy ani z optimum wzrostu. W przeciwieństwie do tego kilku autorów stwierdziło znaczącą poprawę sekrecji produktu w pH ok. 3,0, która wynikała z zahamowania aktywności proteaz komórek gospodarza [15, 16, 36]. Efekt ten ma znaczenie jedynie w przypadku, gdy produkt jest wrażliwy na rozkład w wyniku hydrolizy. Dla produkcji heterologicznych białek przy użyciu drożdży *Pichia pastoris* wielu badaczy sugeruje użycie niskich wartości pH (około 3,0) [12, 16, 36]. W typowych hodowlach z zasilaniem pożywki, drożdże równie dobrze rosną w pH około 5,0. Jednakże, Hohenblum i inni [34] wykazali, że przeżywalność komórek zmniejsza się drastycznie z chwilą, gdy wartość pH pożywki spada do pH 3,0 i wzrasta w dalszym etapie podczas przedłużającej się fermentacji, zależnie od czasu trwania stresu kwasowego. W tych warunkach obserwowano zmniejszoną produktywność i wydajność białka rekombinowanego, jako efekt znacznego i stałego przyrostu nieaktywnej metabolicznie biomasy. Z tego wynika, że optymalna wartość pH jest zależna od rodzaju wytwarzanego metabolitu, warunkując zarówno proces biosyntezy jak też jego stabilność, często zależną od proteolitycznej hydrolizy produktu. Jednakże, próba zapobieżenia proteolizie przy niskich wartościach pH jest kontrowersyjna, z uwagi na fakt zwiększonej śmierci komórek w środowisku kwaśnym i w konsekwencji wzrostu w płynie pohodowlanym uwolnionych proteaz w wyniku lizy komórek. Interesujące podejście dla uniknięcia tego problemu proponują Branduardi i wsp. [6], które polega na użyciu tolerancyjnych na stres kwasowy drożdży *Zygosaccharomyces bailii* posiadających system ekspresji białek aktywny przy niskich wartościach pH.

Drożdże wykształciły różne strategie umożliwiające im tolerancję stresu kwasowego [38, 39 51] (tab. I). Podczas gdy wiedza o molekularnym mechanizmie oporności na stres kwasowy (tolerancja pH) pozostaje fragmentaryczna, to jest oczywiste, że niektóre gatunki drożdży, jak te z rodzaju *Zygosaccharomyces* są bardziej tolerancyjne od innych [61]. Causton i wsp. [8] zidentyfikowali pięć genów u *Saccharomyces cerevisiae*, które są specyficznie regulowane zależnie od pH. Gen

Tabela I
Wpływ warunków stresowych na odpowiedź metaboliczną drobnoustrojów

Rodzaj stresu	Czynnik wywołujący stres	Skutek działania stresu	Mechanizm ochrony komórki	Literatura
Stres osmotyczny	– Podwyższone stężenie soli w środowisku – Wysokie stężenie cukru lub etanolu	– Zaburzenie równowagi jonowej – Spadek turgoru komórki – Zagęszczenie cytoplazmy	– Osmotaksja – Transport lub wypływ jonów – Synteza i transport osmoprotektantów – Zmiana superskręcenia DNA – Osmotyczna regulacja ekspresji genów – Synteza tzw. związków zgodnych i osmogennych, np. glicerolu – Synteza trehalozy – Synteza białek Hsp – Obkurczenie komórki, zmniejszające powierzchnię, na którą działa stres	[1, 11, 13, 14, 30, 33, 35, 41, 50, 53, 69]
Stres pH	– Spadek lub wzrost wartości pH poza zakres tolerancji mikroorganizmu	– Zaburzenia działania pomp protonowych – Zahamowanie syntezy białek i aktywności oddechowej	– Nieprzepuszczanie jonów wodorowych do wnętrza komórki – Usuwanie nadmiaru jonów wodorowych na zewnątrz komórki	[38 – 40, 51]

Tabela II
Wpływ warunków stresu pH (kwasowego/alkalicznego) na wydajność użytecznych metabolitów wytwarzanych przez drobnoustroje

Mikroorganizm	Czynnik stresu kwasowego	Produkt	Skutek działania stresu	Literatura
P. pastoris	Obniżenie pH podłoża z 5,5 do 3,0	Rekombinowany chymotrypsynogen B	Zahamowanie aktywności proteaz komórek gospodarza i wzrost produktywności białka z 2,1 na 5,3 mg/L/h	[15]
P. pastoris	Obniżenie pH podłoża z 5,0 do 4,0–3,0 Obniżenie pH z 5.0 na 4.0 i temp. z 30 na 22°C	Białko heterologiczne CBM-CALB	Wzrost stężenia białka w podłożu z 40 do 90%; 3,3-Krotny wzrost stężenia białka	[36]
A. niger	Inkubacja konidiów w pH 2 i 3	Katalaza	1,5 i 1,8-krotny wzrost wydajności biosyntezy enzymu	[26]
C. pannorum	1-h inkubacja grzybni w pH 2 i 10	Werbenol i werbenon	1,4 i 1,5-krotny przyrost wydajności terpenoidów w przeliczeniu na 1 g biomasy w procesie biokonwersji α-pinenu	[64]
B. licheniformis	Stres alkaliczny; pH pożywki hodowlanej – 8,5	Kwas poli-γ-glutaminowy	Wyższa o 133% wydajność produktu (23,63 g/L), w stosunku do kontroli o pH 7; 5,4-Krotny wzrost ekspresji genu syntetazy *PgsC*	[68]
Y. lipolytica 212	Obniżenie pH z 4.5 na 3,5 – na początku fazy produkcji kwasu, między 72 a 144 h (po końcowej fazie wzrostu)	Kwas α-ketoglutarowy	1,7-Krotny wzrost wydajności produkcji	[44]

PDR12, kodujący transporter błonowy zależny ATP, jest indukowany przy niskich i hamowany przy wysokich wartościach pH. Istnieją różnice w fizjologicznej odpowiedzi drożdży na słaby stres kwasowy między różnymi gatunkami drożdży, np. *S. cerevisiae* gromadzi w tych warunkach trehalozę, co wiąże się faktem ich dodatkowej oporności na stres osmotyczny. Tego typu zjawisko nie występuje jednak u drożdży *Z. bailii* [9].

Chociaż istnieje wiele danych na temat mechanizmów regulacji w odpowiedzi na stres pH, niewiele z nich jednak dotyczy wytwarzania ważnych metabolitów w warunkach stresu kwasowego [37] (tab. I, II). Wymierne efekty w tym względzie obserwowano w procesie biosyntezy enzymów. W procesie fermentacji glukonowej przy użyciu *Aspergillus niger* w warunkach stabilizacji odczynu środowiska hodowlanego przy użyciu węglanu wapnia na poziomie pH 5–6,5 fermentacja przebiega w kierunku wytwarzania kwasu glukonowego z uwagi na stabilność oksydazy glukozowej przy tych wartościach pH. Brak neutralizacji podłoża powoduje wzrost jego kwasowości, która może osiągnąć poziom ok. pH = 2,0, co jest przyczyną inaktywacji oksydazy glukozowej [3, 27, 31]. Często stosowane podłoża do biosyntezy tego enzymu są słabo zbuforowane. W podłożu o końcowej wartości pH 5,7, aktywność oksydazy glukozowej była 18-krotnie wyższa w porównaniu z jej wartością w pH 3,7 [27]. Niska wartość pH podłoża powoduje zahamowanie wytwarzania kwasu glukonowego i zwiększenie wydajności kwasu cytrynowego [23].

W podobnych badaniach konidia *A. niger* AM-11 inkubowano w warunkach stresu kwasowego (pH 2 i 3, oraz pH 7 i 8 w ciągu 12 godzin). Najwyższą aktywność katalazy uzyskano w hodowli tego grzyba, którego konidia poddano stresowi kwasowemu w pH 2 i 3, co umożliwiło uzyskanie przyrostu aktywności tego enzymu odpowiednio, 1,8 i 1,5-krotnie w porównaniu z hodowlą kontrolną bez czynnika stresowego [26]. W tych warunkach przyczyną wzrostu aktywności katalazy prawdopodobnie był nieznaczny spadek wewnątrzkomórkowego pH, który pociągał za sobą aktywację cyklazy adenylowej i w konsekwencji wzrost poziomu cAMP [20].

Yáñez i wsp. [71] wykazali zahamowanie rozwoju *Lactobacillus rhamnosus* i produkcji mleczanu przez komórki poddane stresowi kwasowemu [71]. Obniżenie wydajności mleczanu w wyniku toksycznego stresu kwasowego jest wynikiem spadku żywotności komórek, a nie pośrednim efektem wpływu na metabolizmu mleczanu [71].

Aktywniejszą formę biokatalizatora w postaci grzybni *Chrysosporium pannorum* dla procesu biotransformacji α-pinenu uzyskano przez poddanie jej działaniu stresu kwasowego. W tym celu trzydniową hodowlę tego grzyba inkubowano w środowisku o pH 2,0 i 10,0 w ciągu 1 godziny. Wykorzystanie takiej grzybni w procesie biotransformacji umożliwiło znaczący przyrost wydajności głównych produktów. Po stresie w pH 2,0 i pH 10,0 aktywność grzybni *C. pannorum* wzrosła odpowiednio 1,4 oraz 1,5-krotnie, w porównaniu do grzybni kontrolnej (pH 5,6) nie poddanej stresowi. Podobną wydajność (1,5-krotny przyrost w przeliczeniu na 1 g biomasy) otrzymano dla głównych produk-

tów biotransformacji tj. *trans*-werbenolu i werbenonu. Na uwagę zasługuje fakt, że stresy abiotyczne mogą zwiększyć zarówno wydajność powstających produktów biotransformacji, jak też stwarzają możliwość otrzymywania nowych. Może świadczyć o tym fakt znacznego wzrostu koncentracji *trans*-pinokarweolu osiągnięty z wykorzystaniem jednego z rozpuszczalników organicznych np. dioksanu, etanolu lub chloroformu jako czynnika stresowego, któremu towarzyszył równoczesny spadek stężenia głównych produktów reakcji [64].

Singh i wsp., [59] badając wpływ zmian w kwasowości środowiska na drożdże *S. cerevisiae* stwierdzili wzrost stopnia nasycenia kwasów tłuszczowych we frakcji fosfolipidowej, który spowodował obniżenie płynności dwuwarstwy lipidowej. Turk i wsp. [65] sugerują, że zahamowanie szybkości podziału komórek *Debaryomyces hansenii* może być efektem zwiększenia sztywności błony komórkowej. Autorzy wykazali, że podczas adaptacji drożdży do zmian kwasowości środowiska w czasie ich inkubacji w pH alkalicznym lub kwasowym, wydłużał się czas generacji komórek. Jednakże znacznie większy skutek występował w warunkach stresu kwasowego [65].

2.2. Stres osmotyczny

Drobnoustroje w różnym stopniu adoptowały się do zmian środowiska osmotycznego. Maksymalne, tolerowane przez większość bakterii stężenie NaCl w środowisku wynosi ok. 0.7 M. Wyższe stężenia tolerują tylko gatunki halofilne.

Stres osmotyczny może być generowany przez:

a) cukry – szczególnie wtedy, gdy mamy do czynienia z dużą gęstością zacieru. VHG (*very high gravity*) to technologia, w której stosuje się zaciery zawierające nawet do 40% suchej substancji;
b) etanol – gdy stężenie cukrów utrzymywane jest na niskim poziomie etanol jest głównym czynnikiem generującym stres osmotyczny w zacierze. Silniej zwiększa ciśnienie osmotyczne od cukrów, ponieważ ma mniejszą masę cząsteczkową;
c) sole mineralne – akumulowane sole mineralne w wyniku recyrkulacji frakcji ciekłej w zacierach stanowią poważne zagrożenie dla komórek drożdżowych [30].

Drobnoustroje, aby mogły rosnąć, muszą być spełnione dwa warunki. Po pierwsze musi być zapewniony turgor w komórce, po drugie, cytoplazma (jej gęstość i skład jonów) musi stwarzać określone mikrośrodowisko, pozwalające na stabilizację aktywności białek – w tym enzymów. Stres osmotyczny są to warunki, w których następuje zwiększenie lub zmniejszenie ciśnienia osmotycznego w środowisku w stosunku do fizjologicznego ciśnienia komórki. Wywołuje on wiele różnych odpowiedzi komórki, między innymi:

- osmotaksje – bakterie na zmiany osmotyczne środowiska reagują ruchem. Wzrost osmolarności podłoża oraz podwyższona temperatura powodują odwracalne zahamowania syntezy flagelin;
- transport lub wypływ jonów;
- transport osmoprotektantów;
- zmianę superskręcenia DNA;
- osmotyczną regulację ekspresji genów.

Mechanizmy odpowiedzi bakterii na działanie stresu osmotycznego przedstawiono w pracach przeglądowych: [35, 41 i 50] (tab. I).

Działanie stresu hyperosmotycznego powoduje akumulowanie jonów potasu, które zapewniają odpowiednie ciśnienie turgoru. Stężenie K^+ we wnętrzu komórek jest proporcjonalne do osmolarności środowiska. Aktywność osmotyczna jonów K^+ jest bardzo duża, porównywalna z aktywnością K^+ w wolnym roztworze. Dotyczy to tylko jonów potasu, które są związane z niskocząsteczkowymi anionami. Jony potasu związane z białkami albo DNA cechują się słabą aktywnością. Poziom K^+ w komórkach *Escherichia coli* utrzymywany jest dzięki dwóm systemom transportu: trk oraz kdp. System trk cechuje umiarkowane powinowactwo do K^+, natomiast system kdp posiada duże powinowactwo i działa tylko wtedy, gdy system trk nie jest w stanie zapewnić komórce odpowiedniego stężenia jonów potasowych. ATP-zależny system trk odgrywa szczególną rolę w przeciwdziałaniu skutkom stresu osmotycznego [35].

W badaniach drożdży *S. cerevisiae* wykazano, że nadekspresja genu HAL1 zwiększa tolerancję na NaCl poprzez wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów potasu i zmniejszenie wewnątrzkomórkowego stężenia jonów sodu [55]. Odpowiedź drożdży na stres osmotyczny jest ściśle zależna od temperatury wzrostu. W warunkach szoku cieplnego, czas aktywacji szlaku HOG (*high osmolarity glicerol*), aktywowanego w stresie hiperosmotycznym, jest krótki. Konsekwentnie, w podwyższonej temperaturze, w stresie hiperosmotycznym, drożdże akumulują znacznie mniej glicerolu. Stwierdzono ponadto dodatkowe funkcje glicerolu w adaptacji drożdży na stres osmotyczny. Zmiany w jego stężeniu mogą warunkować aktywację szlaków przekazywania sygnałów komórkowych w warunkach stresowych. Istnieje zależność między metabolizmem glicerolu w komórce, a prawidłowym funkcjonowaniem ściany komórkowej drożdży [2, 70].

Drobnoustroje syntetyzują również tzw. związki zgodne – niektóre z nich są akumulowane w procesie adaptacji do stresu osmotycznego, jaki wywiera środowisko. Nie powodują znacznej zmiany w szybkości wzrostu bakterii, należą do nich: jony potasu, glutaminian, γ-aminomaślan i trehaloza. Trehaloza uwalniana podczas stresu osmotycznego akumulowana jest w cytoplazmie i ma za zadanie ochronę komórek

przed jego zgubnym wpływem. W warunkach stresu zewnętrzna trehaloza może stanowić dodatkowe źródło węgla dla bakterii *E. coli*. Jest ona rozkładana przez trehalazę do glukozy, która jest następnie transportowana do komórki bakteryjnej. Trehalaza może także indukować własny system transportu. Trehaloza w tym wypadku pełni funkcję osmoprotektanta. Związki zgodne, które mogą stymulować wzrost nazywamy osmoprotektantami, należą do nich prolina, betaina glicynowa oraz cholina [14, 35].

Stres osmotyczny może zmieniać stopień superskręcenia DNA, który wpływa na transkrypcję wielu genów. Czynnikiem mającym wpływ na superskręcenie DNA może być nagła zmiana stosunku ATP do ADP [35]. Ilość dostępnej wody w środowisku mikroorganizmów wpływa na wzrost, oddychanie, syntezę enzymu, sporulację i inne fizjologiczne funkcje [63]. Odpowiedzi komórek na środowiska o zmniejszonej aktywności wody (a_w) został opisany w pracach wielu autorów [11, 13, 14, 33, 35, 41, 53, 69].

Zmiany energetyczne w komórce są bardzo ważne i wpływają na wiele procesów metabolicznych. Komórki drożdży *S. cerevisiae* traktowano 0,7 M NaCl. W tych warunkach ponad 150 białek wykazało przejściowe zmiany w modelu ekspresji. Spośród tej znacznej liczby białek, 18 wykazało 8-krotny wzrost tempa syntezy. Jednym z nich było białko Hsp104p. Badania te sugerują, że w wyniku działania stresu osmotycznego następuje wzmożona synteza białek szoku cieplnego – Hsp. Świadczy to o prawdopodobnym powiązaniu szlaków odpowiedzi komórek na oba rodzaje stresów. Niektóre z tych białek mają za zadanie np. usztywniać ścianę komórkową [1]. Istnienie relacji pomiędzy obydwoma rodzajami stresów potwierdzają również inne badania. W doświadczeniach japońskich naukowców wykorzystano nową metodę skriningu szczepów produkujących duże ilości glicerolu, w tym celu poddawano drożdże szokowi cieplnemu. W ten sposób otrzymano mutanty produkujące dużo większe ilości glicerolu niż komórki rodzicielskie [48]. Drożdże oprócz zagęszczenia cytoplazmy syntetyzują związki osmogenne np. glicerol, którego zadaniem jest zwiększenie turgoru komórki. Wykazano, że stężenie glicerolu i trehalozy w komórkach jest najwyższe w 0,75 M NaCl i temperaturze 44°C [30]. Strategie gromadzenia glicerolu w odpowiedzi na szok osmotyczny różnią się w znacznym stopniu od gatunku drożdży. Najważniejszą drogą akumulacji glicerolu przez *S. cerevisiae* w warunkach stresu osmotycznego jest wzrost tempa jego produkcji. Za stymulację syntezy glicerolu podczas stresu osmotycznego jest odpowiedzialny szlak HOG [48]. Komórki inkubowane w pożywce zawierającej 0,7 M NaCl przez 40 min. produkowały trzy razy więcej glicerolu, w porównaniu z komórkami pozbawionymi oddziaływania szoku osmotycznego. Kluczowym enzymem biorącym udział w tworzeniu glicerolu jest NAD-zależna dehydrogenaza 3-fosfoglicerolu (ctGPD). Aktywność tego enzymu wzrasta ok. 6-krotnie w warunkach inkubowania komórek w 0,7 M NaCl przez 60 min. [45].

Nasilenie stresu osmotycznego zależy również od rodzaju substancji osmoaktywnej. Hiszpańscy naukowcy porównali tolerancję drożdży *Candida tropicalis* i *S. cerevisiae* na szok osmotyczny wywołany przez Na^+ i Li^+. *C. tropicalis* wykazały lepszą do nich adaptację i utrzymywały wyższy wewnątrzkomórkowy stosunek jonów K+ do Na+ i Li+ niż *S. cerevisiae*, w podłożu z glukozą. Jednakże *C. tropicalis* charakteryzowały się słabszą adaptacją na stres osmotyczny (wywołany przez KCl i sorbitol) i wytwarzały mniejszą ilość glicerolu w porównaniu do *S. cerevisiae*. W podłożach z galaktozą, która nie powoduje represji jako źródło węgla, *S. cerevisiae* syntetyzowały obniżoną zawartość glicerolu i wykazały zwiększoną wrażliwość na stres osmotyczny. W tych warunkach drożdże te wykorzystywały trehalozę jako istotniejszy czynnik osmoregulacyjny (osmolit) niż glicerol. Wyniki tych badań sugerują, że tolerancja drożdży na szok osmotyczny i toksyczność jonów oraz związana z nimi synteza osmolitów i transport kationów modulowane są przez kontrolę kataboliczną wywołaną przez glukozę [28].

Stres osmotyczny nie musi być kojarzony tylko z ujemnymi skutkami. Okazuje się, że może być on przydatny do syntezy wielu użytecznych metabolitów (tab. III), w tym leków. Meksykańscy naukowcy wykorzystali szok osmotyczny do ekstrakcji aminohydrolazy penicyliny – PA (EC: 3.5.1.11) z komórek *E. coli*. PA jest używana do produkcji kwasu 6-aminopenicylinowego (6-APA), ważnego intermediatu w produkcji półsyntetycznej penicyliny. Komórki *E. coli* były wystawiane na wysokie stężenie sacharozy, przez co następował wzrost ciśnienia osmotycznego, następnie wirowano je i zatrzymywano działanie stresu osmotycznego poprzez dodanie do wody. Stres osmotyczny indukował uwalnianie materiału cytoplazmatycznego. Uwolnione cytoplazmatyczne białka odseparowano przez wirowanie zdezintegrowanych komórek. W tych doświadczeniach stres osmotyczny został użyty do częściowego oczyszczenia PA, która następnie została wykorzystana w przemysłowej produkcji 6-APA [56].

Wiele podłoży dla hodowli drobnoustrojowych ma a_w powyżej 0,90. Ocena wpływu a_w na wzrost mikroorganizmów wykazała, że maksymalny jego poziom i nadprodukcja metabolitów często obserwowano przy a_w w granicach od 0,9 do 1,0. Bakterie kwasu mlekowego wykazały 10-krotny przyrost biosyntezy diacetylu, kiedy obniżono a_w do poziomu 0,95 [62]. W fermentacji etanolowej prowadzonej przy użyciu *S. cerevisiae*, zużycie substratu i biosynteza glicerolu są wyższe przy a_w 0,971 niż przy 0,994. Obniżenie a_w poniżej 0,990, zazwyczaj zmniejsza tempo wzrostu i koncentracji

Tabela III
Wpływ warunków stresu osmotycznego na wydajność użytecznych metabolitów wytwarzanych przez drobnoustroje

Mikro-organizm	Czynnik stresu osmotycznego	Produkt	Skutek działania stresu	Literatura
E. coli	Wysokie (22,1%) stężenie sacharozy +1,47% EDTA, odwirowanie i przeniesienie komórek do r-ru H_2O	Aminohydrolaza penicyliny	Indukcja wzmożonego uwalniania białek cytoplazmatycznych; 85,6% wydajność ekstrakcji enzymu z komórek	[56]
E. coli	10-min wytrząsanie komórek w r-rze hipertonicznym (18% sacharoza) i następnie w r-rze hipotonicznym (zimna H_2O, 4°C)	Rekombinowany ludzki interferon-α2b	Zwiększenie uwalniania białka peryplazmatycznego z $452{,}9 \times 10^{-6}$ (dla 2,5% sacharozy) do $2472{,}5 \times 10^{-6}$ mg/g (dla 25% sacharozy)	[54]
P. notatum	Podwyższone do 0,4 M stężenie NaCl w podłożu hodowlanym; 1-h inkubacja wyhodowanej grzybni w 0,4 M roztworze NaCl w pH 6	β-Galaktozydaza	1,6-Krotny wzrost aktywności enzymu w stosunku do podłoża bez NaCl; 1,9-Krotny wzrost sekrecji enzymu do podłoża	[25]
S. cerevisiae	40 min inkubacja komórek w pożywce z 0,7 M NaCl	Glicerol	3-Krotny wzrost biosyntezy glicerolu	[48]
A. niger	Dodanie 1,2 M NaCl do 6-h hodowli konidiów grzyba	Katalaza	2,8-Krotny przyrost aktywności enzymu w porównaniu z hodowlą kontrolną bez czynnika stresowego	[26]
A. niger	Zawieszenie 72-h grzybni w środowisku 1,2 M NaCl w pH 6,0 (przez 2 h)	Oksydaza glukozowa	Zwiększenie sekrecji enzymu do podłoża i 2,1-krotny przyrost aktywności w porównaniu z kontrolą	[24]
E. coli BW25993	Jonowy 0,6 M NaCl (1,2 Osm) oraz niejonowy – 1,2 M sacharoza, 2-h stres wobec komórek w fazie wzrostu logarytmicznego	β-galaktozydaza	3,6-Krotny wzrost aktywności enzymu w porównaniu z podłożem bez NaCl. 1,2-Krotny wzrost produkcji enzymu po zwiększeniu osmolarności z 0,6 na 1,2 Osm	[10]
Yarrowia lipolytica	Wzrost ciśnienia osmotycznego z 0,68 do 3,21 osmol/kg wraz ze wzrostem stężenia glicerolu z 5 do 20%; Dalszy wzrost ciśnienia osmotycznego do 4,92 osmol/kg w wyniku dodatku NaCl w stężeniu 50 g/L (przy 20% stężeniu glicerolu)	Erytrytol	25-Krotny wzrost wydajności erytrytolu oraz wzrost stosunku erytrytol/mannitol (z 0,14 do 1,11) w procesie biokonwersji glicerolu; Dalszy, 10-krotny wzrost współczynnika wydajności erytrytol/mannitol (do 11,0); wzrost wydajności erytrytolu o 57,5%	[72]
E. coli O44 K74 – komórki spoczynkowe	Dodatek 0,5 M NaCl do 50 mM buforu fosforanowego o pH = 7,5, zawierającego zawieszone spoczynkowe komórki i krotonobetainę jako substrat. Inkubacja w bioreaktorze przez 72 h w temp. 37°C	L-karnityna (osmoprotektant)	1,7-Krotny wzrost wydajności produkcji (z 40 na 68,5 %) karnityny w procesie biotransformacji krotonobetainy w porównaniu z kontrolą bez NaCl; spadek współczynnika dehydrogenaza/liaza izocytrynianowa z 8 do 2,5 i wzrost współczynnika fosfotransferaza/ syntetaza acetylo-CoA z 2,1 na 5,2	[7]

biomasy [47]. Dane dotyczące wpływu stresu osmotycznego na syntezę i sekrecję enzymów nie są jednoznaczne [5, 17, 29, 43]. Szczep grzyba *Penicillium notatum* hodowany w warunkach stresu osmotycznego (0,4 M NaCl) charakteryzował się zwiększoną aktywnością β-galaktozydazy, która znacznie wzrosła (około 1,6-krotnie) wraz ze zwiększaniem stężenia NaCl. W tych warunkach wzrost biomasy był hamowany. W celu zwiększenia sekrecji β-galaktozydazy zlokalizowanej w przestrzeni peryplazmatycznej, 72-godz. grzybnię zawieszono w roztworze NaCl (0,2–1,6 M) w środowisku o pH 3,0–7,0. Najwyższą aktywność β-galaktozydazy uzyskano w środowisku 0,4 M NaCl w pH 6,0, co umożliwiło uzyskanie 1,9-krotnego przyrostu aktywności tego enzymu w porównaniu z hodowlą kontrolną bez czynnika stresowego [25]. W podobnych badaniach konidia *A. niger* hodowano w warunkach stresu osmotycznego. Najwyższą aktywność katalazy uzyskano po dodaniu do 6-godz. hodowli tego grzyba 1,2 M NaCl, co umożliwiło uzyskanie 2,8-krotny przyrost aktywności tego enzymu w porównaniu z hodowlą kontrolną bez czynnika stresowego. Aktywność oddechowa grzybni *A. niger* wykazała istotne zahamowanie wraz ze wzrostem stresu osmotycznego [26]. Cheung i wsp. [10] badali, wpływ stresu osmotycznego zarówno jonowego i niejonowego (przy użyciu sacharozy) na wytwarzanie β-galaktozydazy. Znaczący, ponad 3,6-krotny przyrost aktywności enzymu w porównaniu

z kontrolą uzyskali w warunkach stresu NaCl. Był to 3-krotnie wyższy wzrost produkcji β-galaktozydazy, niż w przypadku stresu niejonowego. Zwiększona biosynteza tego enzymu była prawdopodobnie efektem wzmożonej syntezy cAMP.

Zdecydowana większość oksydazy glukozowej wytwarzanej przez *A. niger* związana jest ze strukturami wewnątrzkomórkowymi komórki, dlatego też istotnym zagadnieniem z biotechnologicznego punktu widzenia jest opracowanie efektywnej metody ekstrakcji tego enzymu. W celu zwiększenia sekrecji oksydazy glukozowej zlokalizowanej w przestrzeni peryplazmatycznej, 72-godz. grzybnię zawieszano w środowisku NaCl (0,4–2,8 M). Najwyższą aktywność oksydazy glukozowej uzyskano w środowisku 1,2 M NaCl w pH 6,0, dzięki czemu uzyskano 2,1-krotny przyrost aktywności tego enzymu w porównaniu z hodowlą kontrolną bez czynnika stresowego [24].

3. Podsumowanie

Drobnoustroje wykształciły wiele mechanizmów oporności na stres i wszystkie te przystosowania mają określone cechy wspólne. Zatem można przypuszczać, że niektóre z nich ewoluowały z jednego mechanizmu oporności, który wraz z pojawianiem się nowych czynników stresowych ulegał drobnym zmianom. Możliwe, że z tego powodu, synteza trehalozy lub białek Hsp jest indukowana przez kilka różnych rodzajów stresów. Podobna natura mechanizmów odpowiedzialnych za adaptację drobnoustrojów do określonych stresów często może pozwolić na zabezpieczenie komórki przed szerokim spektrum warunków stresowych. Poznanie mechanizmów adaptacyjnych do określonych stresów może zminimalizować ich negatywne skutki, a nawet przyczynić się do zwiększenia wydajności syntetyzowanych przez drobnoustroje ważnych metabolitów. Z pewnością znajomość odpowiedzi komórkowej na poziomie genomu umożliwi usprawnienie selekcji szczepów pod względem cech wrażliwości lub odporności na dany stres. Może też mieć znaczenie w zapobieganiu lekooporności, gdy szlaki odpowiedzi komórek na warunki stresowe będą odpowiednimi celami dla interwencji terapeutycznej.

Piśmiennictwo

1. Akhtar N., Blomberg A., Adler L.: Osmoregulation and protein expression in a pbs2delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to hypersaline stress. *FEBS Lett.* **403**, 173–180 (1997)
2. Alonso-Monge R., Real E., Wojda I., Bebelman J.P., Mager W.H., Siderius M.: Hyperosmotic stress response and regulation of cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae* share common functional aspects. *Mol. Microbiol*. **41**, 717–730 (2001)
3. Anastassiadis S., Aivasidis A., Wandrey C., Rehm H.J.: Process optimization of continuous gluconic acid fermentation by isolated yeast-like strains of *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnol Bioeng.* **91**, 494–501 (2005)
4. Bearson S., Bearson B., Foster J.W.: Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **147**, 173–180 (1997)
5. Bobowicz-Lassociska T., Grajek W.: Changes in protein secretion of *Aspergillus niger* caused by the reduction of the water activity by potassium chloride. *Acta Biotechnol.* **15**, 277–287 (1995)
6. Branduardi P., Valli M., Brambilla L., Sauer M., Alberghina L., Porro D.: The yeast *Zygosaccharomyces bailii*: a new host for heterologous protein production, secretion and for metabolic engineering applications. *FEMS Yeast Res.* **4**, 493–504 (2004)
7. Cánovas M., Bernal V., Sevilla A., Iborra J.L.: Salt stress effects on the central and carnitine metabolisms of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **96**, 722–37 (2007)
8. Causton H.C., Ren B., Koh S.S., Harbison C.T., Kanin E., Jennings E.G., Lee T.I., True H.L., Lander E.S., Young R.A.: Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell,* **12**, 323–337 (2001)
9. Cheng L., Moghraby J., Piper P.W.: Weak organic acid treatment causes a trehalose accumulation in low-pH cultures of *Saccharomyces cerevisiae,* not displayed by the more preservative-resistant *Zygosaccharomyces bailii*. *FEMS Microbiol. Lett.* **170**, 89–95 (1999)
10. Cheung C., Lee J., Lee J., Shevchuk O.: The effect of ionic (NaCl) and non-ionic (sucrose) osmotic stress on the expression of β-galactosidase in wild type *E. coli* BW25993 and in the isogenic BW25993 Δ lacI mutant. *J. Exp. Microbiol. Immunol.* (JEMI), **13**, 1–6 (2009)
11. Cochet N., Demain L.: Effect of water activity on production of β-lactam antibiotics by *Streptomyces clavuligerus* in submerged culture. *J. Appl. Bacteriol*. **80**, 333–337 (1996)
12. Cregg J.M., Cereghino J.L., Shi J., Higgins D.R.: Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol*. **16**, 23–52 (2000)
13. Csonka L.N., Hanson A.D.: Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**, 569–606 (1991)
14. Csonka L.N.: Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53**, 121–147 (1989)
15. Curvers S., Brixius P., Klauser T., Thömmes J., Weuster-Botz D., Takors R., Wandrey C.: Human chymotrypsinogen B production with *Pichia pastoris* by integrated development of fermentation and downstream processing. Part 1. *Ferm. Biotechnol. Prog.* **17**, 495–502 (2001)
16. Curvers S., Linnemann J., Klauser T., Wandrey C., Takors R.: Recombinant protein production with *Pichia pastoris* in continuous fermentation – Kinetic analysis of growth and product formation. *Eng. Life Sci*. **2**, 229–235 (2002)
17. Davis L.L., Baudoin A.M.: Effect of osmotic potential on synthesis and secretion of polygalacturonase and cellulase by *Geotrichum candidum. Can. J. Microbiol.* **33**, 138–141 (1987)
18. Dąbrowska G., Prusińska J., Goc A.: Odpowiedź ścisła – mechanizm adaptacyjnej odpowiedzi bakterii na warunki stresowe. *Post. Biochem*. **52**, 87–93 (2006)
19. Doughari J.H., Ndakidemi P.A., Human I.S., Benade S.: Effect of oxidative and temperature stress on viability and toxin production of environmental isolates of *Escherichia coli. Afr. J. Pharm. Pharmacol.* **61**, 264–75 (2012)
20. Erazo P., Mazon M.J., Gancedo J.M.: Internal acidification and c-AMP increase are not correlated in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **165**, 671–674 (1987)
21. Errera R.M., Campbell L.: Osmotic stress triggers toxin production by the dinoflagellate *Karenia brevis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 10597–10601 (2011)

22. Feehily C., Karatzas K.A.: Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. *J. Appl. Microbiol.* **114**, 11–24 (2013)
23. Fiedurek J.: Podstawy wybranych procesów biotechnologicznych. Wydawnictwo UMCS, Lublin, 2004
24. Fiedurek J.: Effect of osmotic stress on glucose oxidase production and secretion by *Aspergillus niger*. *J. Basic Microbiol.* **38**, 107–112 (1998)
25. Fiedurek J.: Enhancement of β-galactosidase production and secrection by high osmotic stress in *Penicillium notatum*. *Microbiol. Res.* **153**, 65–69 (1998)
26. Fiedurek J.: Production of *Aspergillus niger* catalase under various stress conditions. *Acta Microbiol. Polon.* **49**, 43–49 (2000)
27. Fiedurek J.: Wytwarzanie oksydazy glukozowej przez *Aspergillus niger*. Rozprawa habilitacyjna Wydz. BiNoZ, XLVI, Wyd. UMCS. Lublin, (1992)
28. García M.J., Ríos G., Ali R., Bellés J.M., Serrano R.: Comparative physiology of salt tolerance in *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, **143**, 1125–1131 (1997)
29. Grajek W., Gervais P.: Influence of water activity on the enzyme biosynthesis and enzyme activities produced by *Trichoderma viride* TS in solid state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* **9**, 658–662 (1987)
30. Grajek W., Szymanowska D.: Stresy środowiskowe działające na drożdże *Saccharomyces cerevisiae* w procesie fermentacji alkoholowej. *Biotechnologia*, **3**, 46–63 (2008)
31. Gromada A., Fiedurek J.: Influence of medium components and metabolic inhibitors on glucose oxidase production. *Acta Microbiol. Polon.* **45**, 37–43 (1996)
32. Guillouet S., Engasser J.: Growth of *Corynebacterium glutamicum* in glucose-limited continuous cultures under high osmotic pressure. Influence of growth rate on the intracellular accumulation of proline, glutamate and trehalose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 496–500 (1995)
33. Hahn-Hagerdal B.: Water activity: a possible external regulator in biotechnical processes. *Enzyme Microb. Technol.* **8**, 322–327 (1986)
34. Hohenblum H., Borth N., Mattanovich D.: Assessing viability and cell-associated product of recombinant protein producing *Pichia pastoris* with flow cytometry. *J. Biotechnol.* **102**, 281–290 (2003)
35. Hrebenda J.: Odpowiedzi bakterii na działanie stresu osmotycznego. *Post. Mikrobiol.* **33**, 31–53 (1994)
36. Jahic M., Gustavsson M., Jansen A.K., Martinelle M., Enfors S.O.: Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. *J. Biotechnol.* **102**, 45–53 (2003)
37. Kapteyn J.C., ter Riet B., Vink E., Blad S., de Nobel H., van den Ende H., Klis F.M.: Low external pH induces HOG1-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol. Microbiol.* **39**, 469–479 (2001)
38. Krebs H.A., Wiggins D., Stubbs M., Sols A., Bedoya F.: Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochem. J.* **214**, 657–663 (1983)
39. Kren A., Mamnun Y.M., Bauer B.E., Schüller C., Wolfger H., Hatzixanthis K., Mollapour M., Gregori C., Piper P., Kuchler K.: War1p, a novel transcription factor controlling weak acid stress response in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 1775–1785 (2003)
40. Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z.: Mikrobiologia techniczna. PWN, Warszawa, 2008
41. Małek W., Wdowiak-Wróbel S., Targońska M., Kalita M., Gnat S.: Osmoadaptacja i systemy transportu potasu w bakteriach Gram-ujemnych. *Post. Mikrobiol.* **51**, 93–98 (2012)
42. Mattanovich D., Gasser B., Hohenblum H., Sauer M.: Stress in recombinant protein producing yeasts. *J. Biotechnol.* **113**, 121–135 (2004)
43. Mildenhall P., Prior B.A., Trollope L.A.: Water relations of *Erwinia chysanthemi*: growth and extracellular pectic acid lyase production. *J. Gen. Microbiol.* **127**, 27–34 (1981)
44. Morgunov I.G., Kamzolova S.V., Samoilenko V.A.: Enhanced α-ketoglutaric acid production and recovery in *Yarrowia lipolytica* yeast by effective pH controlling. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 8711–8718 (2013)
45. Nevoigt E., Stahl U.: Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.* **3**, 231–241 (1997)
46. Olszewska M., Łaniewska-Trokenheim Ł.: Odpowiedź bakterii fermentacji mlekowej na stres – stadium vbnc. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, **5**, 15–28 (2013)
47. Olz R., Larsson K., Adler L., Gustafsson L.: Energy flux and osmoregulation of *Saccharomyces cerevisiae* grown in chemostat under NaCl stress. *J. Bacteriol.* **175**, 2205–2213 (1993)
48. Omori T., Kiyoshi O., Umemoto Y., Yuki K., Kajihara Y., Shimoda M., Wada H.: Enhancement of glycerol production by brewing yeast *(Saccharomyces cerevisiae*) with heat shock treatment. *J. Ferment. Bioeng.* **82**, 187–190 (1996)
49. Pandey A., Ashakumary L., Selvakumar P., Vijayalakshmi K.S.: Influence of water activity on growth and activity of *Aspergillus niger* for glucoamylase production in solid-state fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 485–486 (1994)
50. Piecuch A., Obłąk E.: Mechanizmy oporności drożdży na stres środowiskowy. *Post. Hig. Med. Dosw.* (online). **67**, 238–254 (2013)
51. Piper P., Calderon C.O., Hatzixanthis K., Mollapour M.: Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiol.* **147**, 2635–2642 (2001)
52. Poole K.: Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 2069–2089 (2012)
53. Purvis J.E., Yomano L.P., Ingram L.O.: Enhanced trehalose production improves growth of *Escherichia coli* under osmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3761–3769 (2005)
54. Ramanan R.N., Tan J.S., Mohamed M.S., Ling T.C., Tey B.T., Ariff A.B.: Optimization of osmotic shock process variables for enhancement of the release of periplasmic interferon-a2b from *Escherichia coli* using response surface method. *Process Biochem.* **45**, 196–202 (2010)
55. Rios G., Ferrando A., Serrano R.: Mechanisms of salt tolerance conferred by overexpression of the HAL1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **13**, 515–528 (1997)
56. Rodrìguez M., Güereca L., Valle F., Quintero R., López-Munguìa A.: Penicillin acylase extraction by osmotic shock. *Proc. Biochem.* **27**, 217–223 (1992)
57. Serrazanetti D.I., Guerzoni M.E., Corsetti A., Vogel R.F.: Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli. *Food Microbiol.* **26**, 700–711 (2009)
58. Shi X., Karkut T., Chamankhah M., Alting-Mees M., Hemmingsen S.M., Hegedus D.: Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*. *Protein Expres. Purif.* **28**, 321–330 (2003)
59. Singh B., Oberoi G.K., Sharma S.C.: Effect of pH stress on lipid composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Ind. J Exp. Biol.* **28**, 430–433 (1990)
60. Skowronek M., Fiedurek J.: Selection of biochemical mutants of *Aspergillus niger* resistant to some abiotic stresses with increased inulinase production. *J. Appl. Microbiol.* **95**, 686–692 (2003)
61. Sousa M.J., Miranda L., Côrte-Real M., Leão C.: Transport of acetic acid in *Zygosaccharomyces bailii*: effects of ethanol and their implications on the resistance of the yeast to acid environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3152–3157 (1996)

62. Troller J.A., Stinson J.V.: Moisture requirements for growth and metabolite production by lactic acid bacteria. *Appl. Environm. Microbiol.* **42**, 682–687 (1981)
63. Troller J.A.: Influence of water activity on microorganisms in foods. *Food Technol.* **29**, 76–82 (1980)
64. Trytek M., Fiedurek J., Gromada A.: Effect of some abiotic stresses on the biotransformation of α-pinene by a psychrotrophic *Chrysosporium pannorum*. *Biochem. Eng. J.* w druku (2016)
65. Turk M., Montiel V., Zigon D., Plemenitas A., Ramos J.: Plasma composition of *Debariomyces hansenii* adapts to changes in pH and external salinity. *Microbiol.* **153**, 3586–3592 (2007)
66. Turkiewicz M.: Drobnoustroje psychrofilne i ich biotechnologiczny potencjał. *Kosmos*, **273**, 307–320 (2006)
67. Varela C.A., Baez M.E, Agosin E.: Osmotic stress response: quantification of cell maintenance and metabolic fluxes in a lysine-overproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol*. **70**, 4222–4229 (2004)
68. Wei X., Tian G., Ji Z., Chen S.: A new strategy for enhancement of poly-γ-glutamic acid production by multiple physicochemical stresses in *Bacillus licheniformis*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **90**, 709–713 (2015)
69. Witter L.D., Anderson C.B.: Osmoregulation by microorganisms at reduced water activity (w) Food microbiology, vol. I. Concepts in physiology and metabolism, red. T.J. Montville, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1987, s. 1–34
70. Wojda I., Alonso-Monge R., Bebelman J.P., Mager W.H., Siderius M.: Response to high osmotic conditions and elevated temperature in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by intracellular glycerol and involves coordinate activity of MAP kinase pathways. *Microbiology*, **149**, 1193–1204 (2003)
71. Yáñez R., Marques S., Gírio F.M., Roseiro J.C.: The effect of acid stress on lactate production and growth kinetics in *Lactobacillus rhamnosus* cultures. *Process Biochem*. **43**, 356–361 (2008)
72. Yang L.B., Zhan X.B., Zheng Z.Y., Wu J.R., Gao M.J., Lin C.C.: A novel osmotic pressure control fed-batch fermentation strategy for improvement of erythritol production by *Yarrowia lipolytica* from glycerol. *Bioresour Technol.* **151**, 120–127 (2014)

POST. MIKROBIOL.,
2016, 55, 2, 205–214
http://www.pm.microbiology.pl

FILOWIRUSY – WIRUSY OBECNE OD MILIONÓW LAT – DLACZEGO TERAZ WYBUCHŁA TAK WIELKA EPIDEMIA?

Katarzyna Pancer[1]*, Włodzimierz Gut[1], Bogumiła Litwińska[1]

[1] Zakład Wirusologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego, Państwowy Zakład Higieny w Warszawie

Wpłynęło we wrześniu 2015 r.
Zaakceptowano w styczniu 2016 r.

1. Rys historyczny i charakterystyka. 2. Struktura i zmienność EBOV. 3. Rezerwuar zwierzęcy filowirusów. 4. Podstawowe etapy cyklu życiowego wirusa Ebola w komórce. 5. Wybrane mechanizmy patogenności wirusa Ebola. 6. Paleowirusologia. 7. Podsumowanie

***Filoviruses* – viruses existing for millions of years – why do we have such a big outbreak now?**

Abstract: Ebola virus, discovered in 1976, caused the largest epidemic among humans in 2014. In this paper, we have discussed the systematic position of *Ebolavirus*, the ecology of these viruses, the essential elements of pathogenesis of infections as well as comparative characteristics of *Filoviruses* infectious biology. According to the paleovirological data, these features were developed during millions of years of the co-evolution process and co-existence of pathogens and hosts. It is likely that changes of Ebola virus biology are not the reason for such substantial changes in the epidemiology of Ebola virus infections. Analysis of factors associated with the characteristics of the present epidemic (size, region) indicate that the main reason for such big epidemic may be the changes related to both humans activity, mainly transformation of the environment, and the ability of bats (natural hosts of *Filoviruses*) to adapt to the new ecological conditions. These processes may cause more outbreaks in the future, also on a large scale, and require taking appropriate actions to reduce the risks.

1. History and characteristics of filoviruses. 2. The structure and variability of EBOV. 3. Animal reservoir of *Filoviruses*. 4. Basics of the Ebola virus life cycle in the cell. 5. Selected mechanisms of pathogenicity of Ebola virus. 6. *Filovirus* paleovirology. 7. Summary

Słowa kluczowe: rezerwuar i ekologia filowirusów, budowa wirusa a patogeneza zakażeń wirusem Ebola, paleowirusologia filowirusów
Key words: reservoir and ecology of *Filoviruses*, *Ebolavirus* structure and pathogenesis of infection, *Filovirus* paleovirology

1. Rys historyczny i charakterystyka

W 1967 r. opisano pierwsze ognisko gorączki krwotocznej wywołanej przez filowirusy, w tym przypadku przez wirus Marburg [10]. Ognisko gorączki Marburg (MVD) wystąpiło w 3 miastach w Niemczech (Frankfurt, Hamburg, Marburg) oraz w Belgradzie (obecnie Serbia), a źródłem były zakażone małpy (*Chlorocebus aethiops*) przywiezione z Ugandy. Kolejne zachorowania/ogniska MVD obserwowane były głównie w Afryce, szczególnie w Ugandzie oraz Demokratycznej Republice Konga [10, 49]. Najczęściej w ogniskach MVD odnotowywano niewielką liczbę chorych. Wyjątek stanowi ognisko w Angoli w 2005 r., w którym u 374 chorych potwierdzono MDV, a umieralność wynosiła aż 88% [10].

Pierwsze ognisko zachorowań wywołanych przez wirus Ebola (EVD) opisano w 1976 r. w Zairze (obecnie Demokratyczna Republika Konga; DRC); czynnik etiologiczny nazwano *Zaire ebolavirus* (ZEBOV). Kolejne ognisko EVD stwierdzono w tym samym roku w Sudanie wywołane przez *Sudan ebolavirus* (SEBOV/SUDV[1]). W 1989 r. opisano kolejny gatunek należący do rodzaju Ebola – *Reston ebolavirus* (REBOV/RSTV), który wywoływał zachorowania u świń i małp, ale nie u ludzi [10]. Kolejnym gatunkiem był *Ivory Coast ebolavirus* (CIEBOV), obecnie zwany *Tai Forest ebolavirus* (TEBOV/TAFV), który spowodował zachorowania wśród szympansów w rezerwacie Tai Forest na Wybrzeżu Kości Słoniowej w 1994 r., oraz pojedyncze zachorowania u ludzi [30, 49]. Ostatnim opisanym gatunkiem rodzaju Ebola jest *Bundibugyo ebolavirus* (BEBOV/BDBV), który w 2007 r. był przyczyną zachorowań w Ugandzie [42]. Łącznie, do 2013 r. WHO zanotowało 23 ogniska EVD, a spośród 2329 zgłoszonych zachorowań 1562 zakończyły się zgonem pacjenta czyli średnia umieralność wynosiła 67% [31, 49].

W Europie, w XX wieku, wystąpiły nieliczne i wyłącznie importowane zakażenia filowirusami. Jednak w 2002 r. stwierdzono, że w Południowej Europie występuje wirus zaliczany do filowirusów, *Lloviu cuevavirus* (LLUV), który w Południowej Francji wywołał zachorowania u nietoperzy *Miniopterus schreibersii* [34]. Do tej pory nie stwierdzono u ludzi zakażeń wywołanych tym wirusem.

Aktualnie do rodziny *Filoviridae* zaliczanych jest 7 gatunków wirusów. Aktualna systematyka filowirusów przedstawia się następująco:

[1] Obecnie brak jest ujednoliconych skrótów nazw gatunkowych filowirusów. W pracy przedstawiono 2 najczęściej stosowane przez naukowców z ośrodków referencyjnych.

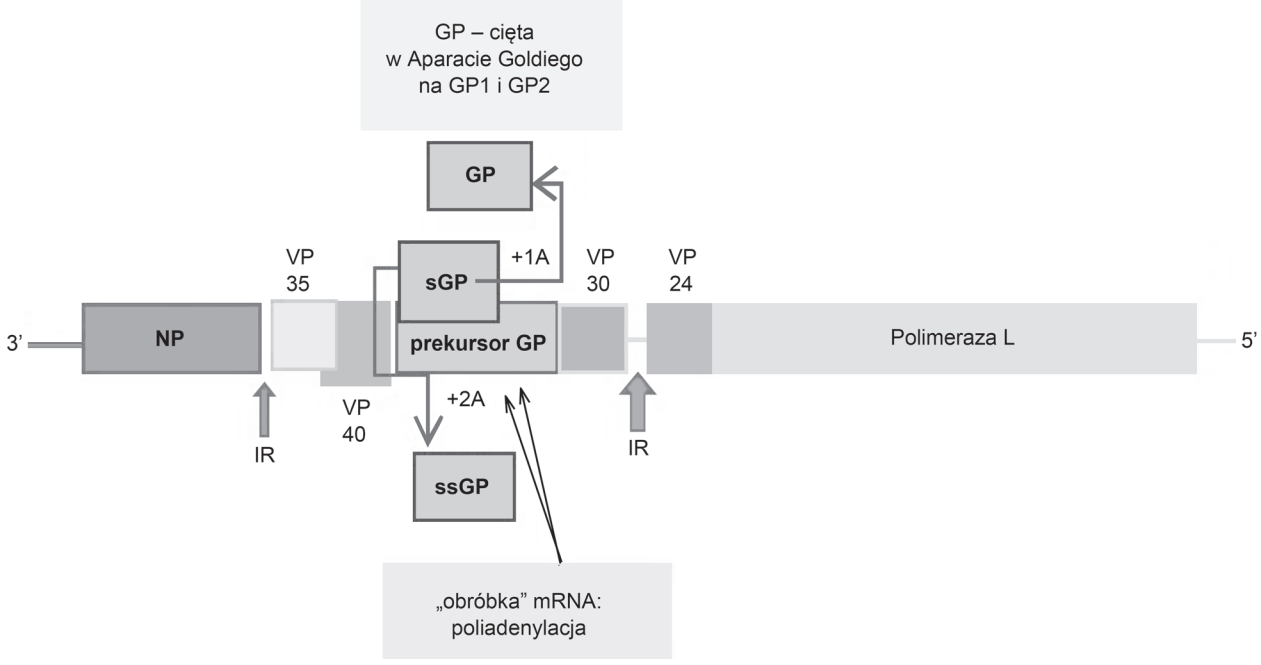
* Autor korespondencyjny: Laboratorium BSL3 oraz Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, Chocimska 24, 00-791 Warszawa; tel. 22 5421308; e-mail: kpancer@pzh.gov.pl

Rząd: ***Mononegavirales***
Rodzina: ***Filoviridae***
Rodzaj: *Ebolavirus*
Gatunek: *Zair ebolavirus* (ZEBOV),
Gatunek: *Sudan ebolavirus* (SEBOV),
Gatunek: *Tai Forest ebolavirus* (TAFV) dawniej *Coted'Ivoire ebolavirus* (CIEBOV)
Gatunek: *Bundibugyo ebolavirus* (BEBOV)
Gatunek: *Reston ebolavirus* (REBOV)
Rodzaj: *Marburgvirus*
Gatunek: *Marburg marburgvirus* (MARV)
Rodzaj: *Cuevavirus*
Gatunek: *Lloviu Cuevavirus* (LLUV)

2. Struktura i zmienność EBOV

W mikroskopie elektronowym filowirusy widoczne są jako charakterystyczne, nitkowate formy. Długość cząstki wirusa może być różna (od 900 nm do 14 000 nm), ale średnica jest stała: ok. 80 nm dla *Ebolavirus* oraz 100 nm – dla *Marburgvirus*. Filowirusy są to wirusy osłonkowe, a ich genom stanowi pojedyncza, niesegmentowana, ujemnie spolaryzowana nić RNA o długości ok. 19 000 nukleotydów. W genomie filowirusów zawarta jest informacja dla 7 białek strukturalnych: nukleoproteiny (NP), białek matriksu (VP40 i VP24), kofaktora polimerazy (VP35), aktywatora transkrypcji (VP30), glikoproteiny (GP1 i GP2) oraz na końcu 5' – duży gen kodujący RNA-zależną polimerazę RNA (L). Geny VP35 i VP40 nakładają się na siebie. Ponadto wyróżnia się dwie sekwencje międzygenowe (IR): długą, 144 nukleotydową pomiędzy VP30/VP24 oraz krótką (4–5 nukleotydów) pomiędzy genami NP/VP35. Skrócenie długiego odcinka sekwencji IR nie wpływa na transkrypcję wirusa, ale znacząco redukuje liczbę powstałych cząstek potomnych. Ponadto, kodowana jest informacja dla białka niestrukturalnego, tzw. wolnej (rozpuszczalnej) glikoproteiny (sGP oraz ssGP) [9, 31] (Rys. 1).

Badania sekwencji nukleotydowej wirusów wyizolowanych podczas epidemii EBOV w 2014 r. w Afryce Zachodniej wykazały, że wirus ten jest najbardziej zbliżony do wirusa, który wywołał zachorowania w 2004 r. w Demokratycznej Republice Konga (DRC) [7]. W czasie ostatniej epidemii wykazano również, że występują różnice w sekwencjach nukleotydowych wirusów pochodzących od różnych chorych, jak również pochodzących z różnych tkanek od tego samego pacjenta, co obrazuje zmienność wirusa. Ta cecha wirusów, zaobserwowana w 2014 r., odbiega od uprzednio opisywanych i może być wynikiem zadziałania kilku czynników. Jako jeden z nich rozważana jest zmiana charakteru epidemii z „leśnej" na „miejską", czyli występowanie zakażeń w populacji ludzi znacznie bardziej zróżnicowanych pod względem genetycznym w porównaniu do osób żyjących w małych osadach [18]. Innym powodem obserwacji wzrostu zmienności wirusa podczas epidemii w 2014 r. może być izolowanie kwasu nukleinowego wirusa i badanie sekwencji nukleotydo-



Rys. 1. Schemat genomu wirusa Ebola; białka strukturalne i niestrukturalne (opracowanie własne)

Objaśnienia: białka strukturalne: NP – nukleoproteina; VP 35 – kofaktor polimerazy; VP 40 – białko matriks; GP – transbłonowa glikoproteina; VP 30 – kofaktor transkrypcji; VP 24 – białko matriks; L – polimeraza RNA zależna od RNA. Białka niestrukturalne: sGP – rozpuszczalna glikoproteina, ssGP – bardzo mała glikoproteina. IR – sekwencje międzygenowe.

wej bezpośrednio z próbek materiału klinicznego, a nie z zastosowaniem etapu preselekcji jakim jest izolacja wirusa w liniach komórkowych.

Ze względu na biologię RNA wirusów, charakteryzują się one bardzo wysoką zmiennością genetyczną, jednak nie wszystkie zmiany mają istotne znaczenie dla przeżycia wirusa. Ze względu na właściwości kodu genetycznego, niektóre zmiany w sekwencji nukleotydów nie prowadzą do zmiany aminokwasu w sekwencji powstającego w procesie translacji białka – są to mutacje synonimiczne. Ponadto, także pośród zmian aminokwasu w syntezowanej cząsteczce białka (mutacje niesynonimiczne), możliwe są zmiany nie mające wpływu na właściwości tego białka (np. zamiana leucyny na izoleucynę w obszarze hydrofobowym). Analiza sekwencji wykazała, że w stosunku do szczepów wirusa Ebola Zair izolowanych podczas poprzednich epidemii, występuje 341 mutacji punktowych, w tym 35 mających wpływ na kodowany aminokwas (tzw. niesynonimicznych), 173 nie mających wpływu (tzw. synonimiczne) oraz 133 w sekwencjach niekodujących. Ponadto wśród izolatów wirusa Ebola uzyskanych od tego samego pacjenta, ale w różnym okresie choroby, stwierdzono występowanie polimorfizmu dotyczącego 55 nukleotydów (15 niesynonimicznych, 25 synonimicznych i 15 w obszarach niekodujących). Dokładna analiza zmian pozwoliła na ustalenie, że liczba dozwolonych zmian, które nie mają znaczenia dla przeżycia wirusa, wynosi 263 w tym 73 niesynonimiczne, 108 synonimiczne, 70 w obszarach niekodujących i 12 zmian ramki odczytu. Zaobserwowano także kumulację zmian w przebiegu zakażenia w obrębie genu glikoproteiny (GP). Szybkość mutacji obliczona dla EBOV wynosi $0{,}8 \times 10^{-3}$ na nukleotyd/na rok [18].

Niejednoznaczność kodu genetycznego, w którym większość aminokwasów może być związana z więcej niż jednym kodonem, oferuje ewolucyjną możliwość dostrojenia wydajności i dokładności wytworzenia białka, przy jednoczesnym zachowaniu tej samej sekwencji aminokwasów. Różne kodony odpowiadające tym samym aminokwasom są często uważane za „synonimiczne" (analogicznie do pojęcia mutacji synonimicznych). Należy zauważyć. że odpowiadające „synonimicznym kodonom" tRNA mogą występować w danej komórce w różnych stężeniach, a zatem wpływać na dynamikę syntezy białka. Wykorzystanie przez wirusa kodonów nie zmieniających właściwości białka często odzwierciedla wynik doboru naturalnego, służącego głównie do dostrajania wydajności i dokładności translacji. W badaniach wykazano istnienie różnych preferencji kodonów w genach EBOV i genach człowieka. Stwierdzono, że ZEBOV nie wykorzystuje tRNA występującego w ludzkich komórkach w najwyższych stężeniach, co sugeruje uniknięcie konkurencji o tRNA podczas syntezy aminokwasów wirusa [12].

3. Rezerwuar zwierzęcy filowirusów

Poszukiwania rezerwuaru zwierzęcego dla filowirusów ciągle trwają. Prowadzone są badania serologiczne w celu wykazania kontaktu badanych zwierząt z filowirusami, badania metodą RT-PCR (PCR z etapem odwrotnej transkrypcji) w celu poszukiwania genomu wirusa (RNA) w tkankach żywych lub padłych zwierząt, a także poszukuje się wirusa w tkankach zakażonych zwierząt (izolacja wirusa). Za najbardziej wiarygodne uznaje się wyniki poszukiwania genomu filowirusów metodą RT-PCR oraz izolację aktywnego wirusa. Obecnie uważa się, że obecność przeciwciał w surowicy zwierząt wskazuje na kontakt z filowirusami [35, 37, 41], ale z uwagi na możliwość występowania reakcji krzyżowych, konieczne są dalsze oznaczenia umożliwiające potwierdzenie i/lub różnicowanie zakażenia wywołanego przez poszczególne filowirusy. Krzyżowe reakcje są często obserwowane gdy stosuje się testy do poszukiwania przeciwciał przeciw VP40 oraz nukleoproteinie (NP) [26]. Stosując te antygeny można uzyskać informację o zakażeniu filowirusem, ale nie można określić którym. Prawdopodobnie zjawisko to jest także przyczyną wykrycia przeciwciał IgG skierowanych przeciw nukleoproteinie EBOV w surowicy niektórych nietoperzy owocożernych (*Rousettus leschenaultii*) w Bangladeszu, z jednoczesnym brakiem izolacji genomu wirusa Ebola lub samego wirusa [35].

Dane epidemiologiczne, wyniki badań molekularnych oraz serologicznych wskazują na nietoperze owocożerne, jako najbardziej prawdopodobnego gospodarza filowirusów [33, 36, 43]. W tabeli I przedstawiono gatunki nietoperzy owocożernych najczęściej wskazywane jako rezerwuar tych wirusów. Należy zwrócić uwagę, że osobniki należące do jednego gatunku mogą być rezerwuarem dla więcej niż jednego gatunku filowirusów. Ponadto, zasięg występowania poszczególnych gatunków nietoperzy jest bardzo różny, począwszy od niewielkiego obszaru dla *Rhinolophus eloquens*, aż do bardzo szerokiego, obejmującego kilka kontynentów, dla *Rousettus aegyptiacus*. Niektóre gatunki nietoperzy występują w ściśle określonych warunkach terenowych np. *Epomos franqueti* występuje w niewielkich grupach w nizinnych i wilgotnych lasach tropikalnych oraz terenach trawiastych niedaleko zbiorników wodnych, a inne zamieszkują bardzo różnorodne środowiska – np.: *Hypsignathus monstrosus* występujący począwszy od nizinnych, wilgotnych lasów tropikalnych, poprzez łęgi, lasy bagienne namorzynowe czy palmowe do wilgotnej sawanny, aż do wysokości terenu 1800 m npm. Innym ważnym czynnikiem ryzyka jest ekologia tych zwierząt. Niektóre występują w małych grupach, inne, jak np. *Eidolon helvum,* w ogromnych koloniach liczących co najmniej 100 tys. osobników. Ponadto, niektóre nietoperze wędrują w poszukiwaniu pożywienia

Tabela I
Nietoperze owocożerne jako rezerwuar filowirusów [3, 26, 33, 35, 37, 40, 50]

Gatunek nietoperza	Rezerwuar wirusa	Występowanie nietoperzy
Hypsignathus monstrosus,***	EBOV +++ MARV ++	Szeroko rozpowszechniony w Zachodniej i Centralnej Afryce
*Epomops franqueti***	EBOV +++ MARV ++	Szeroko rozpowszechniony w Afryce Zach. i Centr. z nielicznymi stanowiskami w Afryce Wschodniej
Rousettus aegyptiacus,#* (Rudawka nilowa)	EBOV +++ MARV +++ REBOV+	Bardzo szeroki zasięg występowania: Afryka, (z wyj. Sahary), Bliski Wschód, aż po Pakistan i Płn. Indie. Cypr, Śródziemn. Turcja, Liban, Izrael; Płw. Arabski
*Myonycteris torquata***	EBOV +++	Rozpowszechniony w Zach. Afryce oraz w Afryce Środkowej. Także Angola, Płn. Zambia, Rwanda
Epomorphorus gambianus	EBOV +	Afryka: pas począwszy od Senegalu na zachodzie poprzez obszary Afryki Centralnej aż do Etiopii na wschodzie
Eidolon helvum	EBOV+	Znaczne obszary Afryki od sub-saharyjskiej oraz Zach i Centr. aż po Pd-Wschodnią. Także Płw. Arabski i Madagaskar
*Rhinolophus eloquens**	MARV++	niewielki obszar Centr. i Wsch.Afryki
*Miniopterus inflatus**	MARV++	Afryka sub-saharyjska oraz Zach., Centr. Wsch. i Południowa (Namibia, Zimbabwe i Mozambik)
*Miniopterus schreibersii****	LLUV++ REBOV+	Począwszy od Pd-Zach. Europy, poprzez Płn. i Zach. Afrykę aż po Bliski Wschód i Kaukaz

* wykrycie genomu MARV; ** wykrycie genomu EBOV; *** wykrycie genomu LLUV; # izolacja wirusa MARV

pokonując duże odległości (np. *Epomorphorus gambianus*), a u innych charakterystyczną cechą jest migracja młodych samców (np. *Myonycteris torquata*). Większość spośród badanych gatunków nietoperzy owocożernych wykazuje znaczne zdolności adaptacyjne i spotykane są także na terenach rolniczych lub w parkach miejskich (np. *H. monstrosus*, *E. franqueti*, *R. aegyptiacus*, *M. torquata*, *E. gambianus* oraz *Miniopterus schreibersii* w Europie) [33, 34]. Oznacza to, że można spodziewać się zwiększonej liczby kontaktów między tymi zwierzętami a człowiekiem, a tym samym wzrostu ryzyka zakażeń. Niektórzy autorzy szacują, że ok. 2,5% osobników danej kolonii nietoperzy może być zakażonych filowirusami, a najbardziej narażone na zakażenie są młode osobniki, które nie posiadają odporności na infekcje wywołane tymi wirusami. Zaobserwowano związek między cyklem rozwojowym nietoperzy a występowaniem zakażeń wirusem Marburg u ludzi. Ogniska u ludzi były związane w czasie z pojawianiem się na danym terenie młodych nietoperzy [26, 34, 36, 40, 41, 50].

Obecnie uważa się, że do pierwotnego zakażenia wirusem Ebola dochodzi przede wszystkim poprzez kontakt z wydalinami zakażonego nietoperza. Zakażeniu mogą ulec zarówno małpy naczelne, jak i afrykańskie antylopy leśne (dujkery) żywiące się owocami. Istotnym problemem, na który wielu autorów zwraca uwagę jest fakt, że wiele zwierząt, w tym szympansy i goryle są nieraz dziesiątkowane w wyniku zakażenia wirusem Ebola [23, 37, 40]. W przeglądowej pracy, która ukazała się w 2012 r. autorzy przeprowadzili staranną analizę danych dotyczących zakażeń filowirusami u zwierząt [37]. W analizie uwzględniano nie tylko metodę badania, wykrycie wirusa czy badanie obecności przeciwciał, ale również brano pod uwagę czy materiał do badań pochodził od odłowionych żywych zwierząt czy też były to znalezione zwłoki. Łącznie przeanalizowano informacje o 13 440 zwierzętach należących do 158 gatunków. W grupie żywych zwierząt najczęściej badano nietoperze i gryzonie i u 0,2% badanych (13/5309) stwierdzono genom wirusa EBOV. Przeciwciała dla tego wirusa wykryto u 2,2% badanych zwierząt (u 180/8050 badanych), przy czym były to przede wszystkim zwierzęta domowe, a gatunkiem u którego najczęściej wykrywano obecność przeciwciał były psy. W przypadku badań martwych zwierząt większość stanowiły zwłoki naczelnych, a w okresach epidemii u ludzi obecność wirusa Ebola stwierdzono u ponad 32% badanych zwierząt [37]. Zarówno analiza epidemiologiczna jak i badania genomu wirusów wykazały istotną rolę nietoperzy jako głównego źródła pierwotnych zakażeń człowieka [17, 43], chociaż do zakażenia człowieka dochodzi prawdopodobnie rzadziej i dość przypadkowo np. poprzez kontakt ze skażonymi owocami, zakażonymi zwierzętami lub padliną [3, 33, 36, 40]. Wykazano, że po przekroczeniu bariery międzygatunkowej, choroba rozprzestrzenia się między ludźmi na drodze bezpośredniego kontaktu z osobą zakażoną. Jednak już w 1976 roku zauważano, że w trakcie epidemii leś-

nych w Sudanie ok. 5% chorych nie miało bezpośredniego kontaktu fizycznego z chorym na EVD ani z ciałami zakażonych zwierząt. Podobnie, w trakcie epidemii „miejskiej" w Kikwicie w 1995 roku (Demokratyczna Republika Kongo, dawniej Zair) zaobserwowano, że odsetek takich przypadków sięgał 17,4%. Te obserwacje sugerowały możliwość innej, niż bezpośredni kontakt, drogi transmisji wirusa. Zaczęto analizować możliwość transmisji zakażenia drogą kropelkową lub poprzez kontakt z zakażonym zwierzęciem z innych gatunków niż naczelne i antylopy leśne. W badaniach eksperymentalnych udało się w pewnych, określonych warunkach uzyskać transmisję zakażenia drogą kropelkową, ale nie potwierdzono jej nigdy wśród ludzi [33, 38, 49].

Analizując możliwość przeniesienie zakażenia przez inne zwierzęta zwrócono uwagę na psy, które towarzyszą ludziom a żywią się często resztkami i padliną. Do tej pory u psów nie udokumentowano zachorowań wywołanych przez wirusa Ebola, natomiast badania serologiczne wskazują na możliwość zakażenia psów filowirusami oraz sugerują, że psy mogłyby być wskaźnikiem zagrożenia. Oznaczono obecność przeciwciał klasy IgG dla EBOV u psów w Afryce na terenach, na których sporadycznie występowały zakażenia u ludzi oraz tam gdzie odnotowano ogniska EVD oraz u 100 psów we Francji. Stwierdzono wysoce znamienną zależność między obecnością IgG swoistych dla filowirusów u psów oraz częstością zakażeń u ludzi. Najwyższy odsetek wyników dodatnich u psów stwierdzono na terenach, na których odnotowano epidemie EVD (ok.25%), następnie wśród psów na terenie gdzie występowały pojedyncze zachorowania u ludzi (15%) oraz u 9% psów z miast gdzie nie odnotowano zachorowań. U psów badanych we Francji, gdzie spodziewano się uzyskać wynik bliski 0% – u 2% zwierząt wykryto przeciwciała dla EBOV [2]. Wynik ten można wytłumaczyć odkryciem w 2002 r. *Lloviu cuevavirus* na południu Francji i występowaniem reakcji krzyżowych pomiędzy przeciwciałami skierowanymi przeciw różnym filowirusom [34].

Zespół Pigott i wsp. przeanalizował zgłoszone przypadki zakażeń wirusem Ebola wśród ludzi i zwierząt (naczelne i nietoperze) w okresie 1976–2014 w Afryce w celu określenia niszy zoonotycznej dla EVD – czyli obszaru na którym może wystąpić ryzyko zakażeń/zachorowań [40]. Wykazali oni, że zachorowania wśród ludzi często poprzedzone były przypadkami zachorowań wśród zwierząt lub występowały one równocześnie na tym samym obszarze. Analiza zasięgu występowania gatunków zwierząt, które podatne są na zakażenie (np. goryle czy szympansy) oraz gatunków nietoperzy uważanych za rezerwuar wirusa pozwoliła autorom na stwierdzenie, że w obszarze istotnego ryzyka zamieszkuje obecnie 22 miliony ludzi. Obszar ryzyka obejmuje przede wszystkim Afrykę Środkową oraz Zachodnią. Do tej pory ogniska EVD u ludzi zgłaszano w Sudanie, DRC, Kongu, Gabonie, Ugandzie oraz na Wybrzeżu Kości Słoniowej, Liberii, Gwinei i Sierra Leone. Zgodnie z analizą Pigotta i wsp. do krajów ryzyka należy także zaliczyć: Etiopię, Tanzanię, Mozambik, Angolę, Rep. Środkowej Afryki, Kamerun, Nigerię, Togo i Ghanę oraz Madagaskar [40]. Z tej perspektywy epidemia w Zachodniej Afryce jest zaledwie początkiem problemów [33].

4. Podstawowe etapy cyklu życiowego wirusa Ebola w komórce

Podobnie jak w przypadku innych wirusów w procesie replikacji wirusa Ebola można wyróżnić szereg etapów. Pierwszym z nich jest adsorpcja EBOV do receptorów komórki poprzez wirusową glikoproteinę GP1. Receptory komórkowe mogą być różne w zależności od typu komórek, ale istotną rolę w procesie wnikania wirusa do komórki odgrywają lektyny oraz mucyny. Uważa się, że na szerzenie się wirusa w zakażonym organizmie ma wpływ ekspresja lektyn wiążących wirusową GP [14, 22]. Obecność lektyn jest zależna od typu komórek. Ich obecność została potwierdzona na makrofagach i komórkach dendrytycznych (DC-SIGN, hMGL), hepatocytach (ASGPR-1) oraz komórkach endotelium wątroby i węzłów chłonnych (DC-SIGNR, LSECtin). Cząsteczki TIM-1 (T cell Ig mucin 1), czyli trans-membranowej glikoproteiny zawierającej domeny IgV i mucyno-podobne, wchodzą w reakcję z glikoproteiną wirusa Ebola w procesie wnikania wirusa do komórki [22, 24, 28, 48]. Zaobserwowano, że stężenie TIM-1 na powierzchni różnych komórek jest wyraźnie skorelowane z podatnością tych komórek na zakażenie filowirusami [28].

Kolejnym etapem replikacji EBOV jest internalizacja wirusa na drodze mikropinocytozy. Proces ten jest zależny od katepsyny L i B oraz wymaga niskiego pH [13], GP1 ulega w nim cięciu do małych, 19-kDa fragmentów co z kolei pozwala na wiązanie GP1 do NPC1 (białko Niemann-Picka typu C, związane z transportem cholesterolu). Jest to szczególnie istotne w przypadku namnażania EBOV w komórkach dendrytycznych [22, 45, 49].

Następnie, w warunkach niskiego pH oraz po związaniu GP1 z NCP1, dochodzi do fuzji błony komórkowej endosomu z osłonką wirusa. Powoduje to zmianę konformacyjną GP2, co prowadzi do uwolnienia genomu wirusa oraz związanych z nim białek do cytoplazmy komórki gospodarza. Od tego momentu obserwuje się supresorowe działanie VP35 i VP24 na system odpornościowy gospodarza, polegające przede wszystkim na hamowaniu syntezy IFN [16, 22].

Uwolniony kompleks rybonukleoproteinowy (polimeraza L, nukleoproteina, VP35 i VP30) wirusa rozpoczyna transkrypcję mRNA na bazie wirusowego RNA [47]. Wirusowa polimeraza RNA zależna od RNA przeprowadza proces poliadenylacji wirusowego mRNA. Przyłączenie przy kodonach stop fragmentów poliA umożliwia tworzenie na tej samej sekwencji genomu różnych białek wirusowych. Insercja +2A prowadzi do powstania z sGP bardzo małej tzw. ssGP (super small secreted glycoprotein), insercja +1A – do utworzenia transbłonowej glikoproteiny (GP) o pełnej długości, natomiast brak insercji adeniny powoduje powstanie sGP czyli małej rozpuszczalnej glikoproteiny (small secreted glycoprotein). Obie glikoproteiny, ssGP oraz sGP, ogrywają istotną rolę w patogenezie zakażeń EBOV [16].

Regulacja poziomu procesu transkrypcji i replikacji następuje poprzez fosforylację VP30. W utrzymaniu równowagi między transkrypcją a replikacją biorą także udział białka matriksu: VP24 i VP40. Replikacja rozpoczyna się w momencie gdy jest odpowiednia liczba cząsteczek nukleoproteiny i innych białek chroniących nowo syntezowany kwas rybonukleinowy [25].

W kolejnym etapie z nukleoproteiny, VP40, VP24 oraz VP35 formowany jest nukleokapsyd w postaci ciasno zwiniętej spirali, o stałej średnicy ok. 80 nm (*Ebolavirus*) lub 100 nm (*Marburgvirus*) [1, 32]. Po utworzeniu nukleokapsydów potomne cząstki wirusa są uwalnianie z komórki na drodze pączkowania. W tym procesie istotną rolę pełnią białka matriksu, szczególnie białko VP40, które na drodze mechanizmu ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) wchodzi w reakcję z błoną plazmatyczną [1]. Mechanizm ESCRT w niezakażonej komórce jest wykorzystywany do pełnienia takich funkcji biologicznych jak: odtwarzanie błon komórkowych, tworzenie pęcherzyków, procesów fagocytozy oraz dojrzewania cytokin.

5. Wybrane mechanizmy patogenności wirusa Ebola

Proces patogenezy u osób zakażonych wirusem Ebola stanowi doskonały przykład wykorzystywania przez wirusa wzajemnych relacji gospodarz – patogen. W czasie cyklu replikacyjnego wirusa wybrane procesy obrony organizmu przed zakażeniem są modulowane w taki sposób aby maksymalnie „oszukać" układ immunologiczny gospodarza. Ich celem jest wypracowanie warunków ułatwiających wirusowi zakażanie kolejnych komórek, tkanek i narządów, zanim uruchomione będą skuteczne mechanizmy swoistej obrony [6, 13, 14, 16, 25].

Jednym z bardzo istotnych czynników, który ułatwia rozprzestrzenianie się wirusa w zakażonym organizmie, jest zdolność wirusowego białka VP35 do hamowania syntezy i działania interferonu IFN typu I (beta/alfa). Zjawisko to pozwala na intensywne namnażanie wirusa Ebola. Oddziaływanie białka VP35 dotyczy przede wszystkim mechanizmu zależnego od RIG-1 związanego z produkcją IFN typu I oraz cytokin. RIG-1 wykazuje aktywność helikazy i należy do grupy cytoplazmatycznych receptorów (m.in. Mda-5, LGP-2) wykrywających RNA wirusowe [6, 16, 45, 46]. Po związaniu dwuniciowego RNA przez RIG-1 następuje transkrypcja IFN typu I oraz IL-6 i IL-12. Poprzez wiązanie z kompleksem replikacyjnym wirusa białko VP35 maskuje obecność dwuniciowego RNA, a tym samym nie dopuszcza do degradacji genomu przez RNAazy rozpoznające dsRNA. Ponadto VP35 ogranicza ekspresję genów związanych z produkcją małych interferujących cząstek RNA będących kolejnym mechanizmem obronnym komórki eukariotycznej przed wirusowym RNA. Białko VP35 blokując aktywność kinazy PKR (aktywowanej przez dsRNA) o przeciwwirusowej aktywności, oddziałuje ujemnie także na systemy fosforylacji np. na IRF-3, IRF-7 (interferon regulatory factor) stanowiące jeden z mechanizmów obrony komórki po aktywacji interferonem. Natomiast zjawisko supresji IFN typu I oraz II wywołane jest oddziaływaniem białka VP24, które hamuje akumulację fosforylowanego STAT 1 (aktywator transkrypcji) w jądrze zakażonej komórki. W ten sposób dochodzi do ogólnego zablokowania powstawania interferonu alfa/beta oraz gamma. W przypadku *Marburgvirusa* zdolność do supresji interferonów wykazuje VP40 [25].

Równolegle do zablokowania produkcji interferonu typu I oraz II przez oddziaływania białek VP35 i VP24, dochodzi do akumulacji GP1 i GP2 w retikulum endoplazmatycznym. To z kolei prowadzi do aktywacji NFkappaB oraz ROS. W końcowych etapach zakażenia wirusem Ebola, wysokie stężenia GP1 i GP2 są czynnikiem obniżającym stężenie wielu białek na powierzchni komórek gospodarza, istotnych dla odpowiedzi immunologicznej i adhezji komórek. Proces ten dotyczy szeregu integryn w tym ITGA1, ITGA2, ITGA3, ITGA4, ITGA5, ITGA6, ITGAV i ITGB1. Szczególnie istotne jest oddziaływanie GP1,2 na integryny $\alpha_V\beta_3$ (receptora dla wironektyny), które pełnią ważną rolę jako receptory przy fagocytozie przez komórki makrofagowe i dendrytyczne [6].

W wyniku namnażania się wirusa w makrofagach i monocytach dochodzi do wysokiej produkcji prozapalnych cytokin i chemokin oraz ROS, co z kolei, prowadzi do dysfunkcji komórek śródbłonka, wykrzepiania wewnątrznaczyniowego i zapaści krążeniowej. ROS są to cząstki zawierające w swoim składzie atomy tlenu z niesparowanym elektronem (rodniki) lub wiązania O-O, które biorą udział w reakcjach che-

micznych odgrywających znaczącą rolę w metabolizmie i tarzeniu się organizmów żywych. Namnażanie wirusa w komórkach dendrytycznych prezentujących antygen oraz apoptoza limfocytów w wyniku aktywacji (tzw. trans infection) powoduje natomiast zaburzenia odporności, szczególnie przy wytwarzaniu EBOV-specyficznych CD8+ i CD4+ limfocytów T [4].

Niezwykle interesującą rolę w procesach patogenezy związanej z zakażeniem wirusem Ebola pełni białko sGP [4, 14] Białko to powstaje jako dodatkowy produkt genu kodującego wirusową glikoproteinę. U wszystkich gatunków Ebola sGP powstaje w formie prekursora przekształcanego w formę dojrzałą poprzez potranslacyjne modyfikacje w systemie Golgiego.

W rezultacie tych procesów z zakażonych komórek uwalniana jest glikoproteina w postaci wolnego i niezwiązanego z wirionem homodimeru. W porównaniu do innych białek powstających w wyniku ekspresji genu glikoproteiny ($GP_{1,2}$ i ssGP) białko to powstaje w niezwykle dużych ilościach. W warunkach replikacji w hodowli Vero proporcja powstającego sGP do $GP_{1,2}$ i ssGP wynosi odpowiednio 74 do 24 do 5. Pod względem antygenowości białko indukuje powstawanie i reaguje z większością przeciwciał dla $GP_{1,2}$ z wyjątkiem przeciwciał neutralizujących wirusa Ebola [14, 16]. Można więc powiedzieć, że białko sGP stanowi swego rodzaju „cel pozorny" przekierowując odpowiedź humoralną zakażonego w kierunku przeciwciał nieefektywnych dla procesu eliminacji wirusa i zdrowienia. Inne funkcje przypisywane białku sGP to działanie na funkcjonalność systemu naczyniowego, aktywacja limfocytów niezakażonych, indukcja apoptozy limfocytów, czy blokowanie aktywności neutrofili. Związana z receptorami dla wirusa Ebola na powierzchni wrażliwych komórek sGP, poprzez blokowanie wnikania cząstek wirusowych, może być czynnikiem regulującym szybkość rozprzestrzeniania się wirusa w zakażonym organizmie. Większość z tych oddziaływań pozostaje w sferze hipotez wymagając szczegółowego rozpracowania mechanizmów tych zjawisk [4, 6, 44].

W wyniku wszystkich przedstawionych w tym rozdziale działań wirusa dochodzi do hamowania procesów fagocytozy i zablokowania wytwarzania cytokin stanowiących ważny element nieswoistej odpowiedzi przeciwwirusowej. Cytokiny te (głównie IFN typu I i II, IL-6, IL-12) biorą udział zarówno w indukcji swoistej odpowiedzi przeciwwirusowej poprzez aktywację limfocytów B oraz T jak również w stymulacji nieswoistych czynników przeciwwirusowych. W wyniku rozregulowania systemu wytwarzania cytokin dochodzi do nadmiernej produkcji prozapalnych cytokin, co prowadzi do uszkodzenia naczyń i wykrzepiania wewnątrznaczyniowego, a tym samym do uszkodzenia narządów i zapaści krążeniowej, często prowadzących do śmierci chorego [4].

6. Paleowirusologia

Paleowirusologia jest to nauka, która w historii ewolucji życia zajmuje się badaniem relacji świata wirusów i ich gospodarzy. Wykorzystuje ona między innymi informacje zawarte w endogennych wirusowych elementach (EVE), dziedziczonych przez genom gospodarza powstałych w wyniku transferu fragmentów genów wirusowych (HGT-horizontal gene transfer). Dzięki zsekwencjonowaniu licznych genomów gospodarzy oraz technikom bioinformatycznym, EVE można obecnie identyfikować i przypisywać do odpowiednich grup taksonomicznych gospodarzy i wirusów. Najnowsze badania pokazują, że niektóre EVE zostały dokooptowane jako geny komórkowe, których produkty działają często jako inhibitory namnażania się wirusów. Stanowią one pozostałość historycznych „bitew" pomiędzy patogenem a gospodarzem, których strategia doprowadziła do możliwości wykorzystywania w przyszłości informacji genetycznej wirusa w walce przeciwko spokrewnionemu wirusowi [11, 15, 21, 22, 27, 39].

Szczególnie interesującym kierunkiem badań jest poszukiwanie odpowiedzi na pytanie jakie są korzyści dla gospodarzy wynikające z obecności EVE i jakie są mechanizmy, które pozwalają na uzyskanie tych korzyści. Dowodem na ich istnienie jest fakt, że w niektórych przypadkach, długie otwarte ramki odczytu dla genów wirusowych zostały zachowane w genomie gospodarza przez miliony lat, a ich obecność koreluje z bezobjawowym przebiegiem zakażenia wywołanego przez dany gatunek/rodzaj wirusa u gospodarza posiadającego konkretny gen wirusowy. Przykład może stanowić zakażenie nietoperzy wywołane przez filowirusy. W przyszłości dalsze badania pozwolą nie tylko na wyjaśnienie dlaczego niektóre gatunki nietoperzy wydają się być „odporne na zakażenie", ale mogą również pozwolić na identyfikację nowych, nieznanych jeszcze filowirusów [8].

Znaczenie EVE dla procesów ewolucyjnych zostało niezwykle interesująco przedstawione w pracy Aswada i Katzorakis'a, którzy z punktu widzenia patogenezy zakażenia wirusowego, przedstawili udział EVE pochodzących z filowirusów w tym procesie [5]. Wskazali oni, że prawie wszystkie EVE wskazujące homologię z genomem RNA wirusów o jednoniciowym genomie odpowiadają wirusowemu genowi nukleoproteiny, a więc genowi odpowiadającemu za syntezę białka zabezpieczającego genom wirusa przed degradacją.

W popularnej literaturze homologi genów wirusa zawarte w genomach gospodarzy określa się jako wirusowe skamieniałości [21]. Najbardziej zaskakujące skamieniałości wirusowe nie dotyczą DNA wirusów czy retrowirusowego RNA, ale RNA wirusów, które w swoim cyklu replikacyjnym nie są zdolne do

przeprowadzenia odwrotnej transkrypcji. W genomie gospodarzy stwierdzono odcinki cDNA odpowiadające genom RNA wirusów zakwalifikowanych do różnych rodzin takich jak: *Bornaviridae* [8, 15], *Flaviviridae* [8], *Orthomyxoviridae* [8], *Bunyaviridae* (Phleboviruses) [7] oraz *Rhabdoviridae* [8]. Dotyczy to również filowirusów, dla których naturalnymi gospodarzami są nietoperze. Zakażenie u tych zwierząt ma łagodny lub bezobjawowy charakter. Cechą charakterystyczną nietoperzy jest posiadanie wbudowanego w genom fragmentu cDNA przepisanego z RNA genomu filovirusów. Obserwacja ta nie tylko potwierdziła hipotezę o roli nietoperzy w przenoszeniu zakażeń wywoływanych przez różne gatunki *Mononegavirales*, ale otworzyła dwa niezwykle ciekawe kierunki badań. Pierwszy z nich to analiza udziału cząsteczek mikro-RNA w obronie gospodarza przed patogenem [5]. Drugi nowy kierunek badań to analiza naturalnej historii wirusów i ich relacji z gospodarzami [39].

W badaniach prowadzonych na układzie nietoperze – filowirusy okazało się, że relacja ta oparta jest na wbudowaniu do genomu nietoperzy fragmentu cDNA homologicznego do fragmentu genomu filowirusów. Wbudowany fragment cDNA odpowiada genowi białka nukleoproteiny (NP) lub białka VP35. Są to więc fragmenty cDNA homologiczne do części genomu filowirusów kodującej białka związane z hamowaniem odpowiedzi immunologicznej gospodarza na zakażenie. W przypadku cDNA wbudowanego w genom gospodarza komplementarnego do wirusowego genu VP35, transkrypt tego genu jest antagonistą wirusowego genu białka VP35, które odpowiedzialne jest za hamowanie produkcji interferonu u gospodarza we wczesnym okresie zakażenia. Zablokowanie syntezy białka VP35 powoduje, że wirus nie może hamować syntezy interferonu, a wysoki poziom interferonu we wczesnym okresie zakażenia powoduje, że w znacznym stopniu hamowana jest replikacja wirusa. Wydaje się, że dzięki temu zakażenie nietoperzy filowirusami jest znacznie ograniczone i złagodzone do postaci bezobjawowej ale połączonej z wydalaniem zakaźnego wirusa. Uważa się, że istotną rolę odgrywają tu cząsteczki mikroRNA interferujące z produktami genomu wirusa [25, 34, 45].

Wyjątkowe EVE występuje u torbaczy i odpowiada fragmentowi kodującemu polimerazę RNA zależną od RNA (L). Niezależnie od mechanizmu działania taki dobór EVE wskazuje na tendencję do opóźniania procesów namnażania wirusa aż do momentu uruchomienia swoistych mechanizmów obrony pozwalających na uzyskanie przez gospodarza ochrony przed powtórnymi zakażeniami. Odbiega to w istotny sposób od strategii użycia interferujących RNA zastosowanej w leczeniu zakażeń wirusem Ebola, gdzie lekiem jest homolog wirusowej glikoproteiny [52].

7. Podsumowanie

Podsumowując, wypracowany poprzez miliony lat system współistnienia filowirusów i ich gospodarzy opiera się na hamowaniu tempa replikacji patogenu poprzez antagonistyczne oddziaływanie zintegrowanych z genomem gospodarza homologów genów wirusa, szczególnie istotnych dla procesu replikacji wirusa w zakażonych komórkach gospodarza. Taki układ daje czas gospodarzowi na wytworzenie swoistej odpowiedzi immunologicznej przeciwko określonemu wirusowi, która nie tylko eliminuje bieżące zakażenie, ale również zabezpiecza przed konsekwencjami przyszłych kontaktów z danym patogenem.

W przypadku człowieka oraz małp naczelnych, nie stwierdzono w ich genomach obszarów homologicznych dla genów filowirusów. Powoduje to, że wymienione patogeny mogą bez przeszkód namnażać się we wrażliwych komórkach gospodarza. Taka intensywna replikacja wirusa, poprzedzająca wytworzenie skutecznej, swoistej odpowiedzi na zakażenie prowadzi, w wielu przypadkach, do zgonu gospodarza. Przykładem tego jest wyjątkowych rozmiarów epidemia EVD w Afryce Zachodniej, która rozpoczęła się najprawdopodobniej w grudniu 2013 roku i do końca 2015 r. nie została wygaszona [20, 44, 51]. Na tak duży rozmiar epidemii niewątpliwie wpłynęło wiele czynników, ale głównych przyczyn można dopatrywać się w połączeniu kulturowych i społecznych zachowań, nie pomijając uwarunkowań gospodarczych. Przeprowadzona przez Grotto i Ricci metaanaliza wskazuje, że głównymi czynnikami wpływającymi na powstanie aktualnej epidemii są zarówno zmiany populacyjne wśród zwierząt, jak i wyniki takich działalności człowieka jak deforestacja, łowiectwo oraz formy sprawiania i wykorzystania pozyskanej zwierzyny do celów spożywczych [19]. Obserwowane przekształcenia ekosystemu wpływają na większe prawdopodobieństwo kontaktu człowieka z wirusem, a nakładające się na te zmiany słabość służby zdrowia i czynniki kulturowe [31] powodują nie tylko rozległość aktualnej epidemii EVD, ale wskazują na zwiększanie się ryzyka powstawania nowych ognisk. Sygnałem ostrzegawczym była epidemia zakażeń wirusem Marburg w Angoli, która wielkością odpowiadała epidemiom gorączki Ebola [49]. Zasięg epidemii EVD w Afryce Zachodniej wskazuje na konieczność uruchomienia czułych systemów umożliwiających identyfikację i przerwanie szerzenia się choroby w bardzo krótkim okresie od momentu zakażenia przypadku „0", niezależnie od charakteru źródła tego zakażenia.

Piśmiennictwo

1. Adu-Gyamfi E., Soni S.P., Jee C.S., Digman M.A., Gratton E., Stahelin R.V.: A loop region in the N-terminal domain of Ebola

virus VP40 is important in viral assembly, budding, and egress. *Viruses*, **6**, 3837-3854 (2014)
2. Allela L., Bourry O., Pouillot R., Délicat A., Yaba P., Rouquet B.K.P., J-P. Gonzalez, Leroy E.M.: Ebola virus antibody prevalence in dogs and human risk. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 385–390 (2005)
3. Amman B.R., Towner J.S. i wsp.: Seasonal pulses of Marburg virus circulation in juvenile Rousettus aegyptiacus bats coincide with periods of increased risk of human infection. *PLoS Pathog.* **8**: e1002877 (2012)
4. Ansari A.A.: Clinical features and pathobiology of Ebolavirus infection. *J. Autoimmun.* **55**, 1–9 (2014)
5. Aswad A., Katzourakis A.: Paleovirology and virally derived immunity. *Trends Ecol. Evol.* **27**, 627–636 (2012)
6. Basler C.F.: Innate immune evasion by filoviruses. *Virology*, DOI: 10.1016/j.virol.2015.03.030 (2015)
7. Ballinger M.J., Bruenn J.A., Kotov A.A., Taylor D.J.: Selectively maintained paleoviruses in Holarctic water fleas reveal an ancient origin for phleboviruses. *Virology*, **446**, 276–282 (2013)
8. Belyi V.A., Levine A.J., Skalka A.M.: Unexpected Inheritance: Multiple integrations of ancient bornavirus and Ebolavirus/Marburgvirus sequences in vertebrate genomes. *PLoS Pathog.* **6,** e1001030 (2010)
9. Brauburger K., Boehmann Y., Tsuda Y., Hoenen T., Olejnik J., Schümann M., Ebihara H., Mühlberger E.: Analysis of the highly diverse gene borders in Ebola virus reveals a distinct mechanism of transcriptional regulation. *J. Virol.* **88**, 12558–12571 (2014)
10. Brauburger K., Hume A.J., Mühlberger E., Olejnik J.: Forty-five years of Marburg virus research. *Viruses*, **4**, 1878–1927 (2012)
11. Chiba S., Kondo H., Tani A., Saisho D., Sakamoto W., Kanematsu S., Suzuki N.: Widespread endogenization of genome sequences of non-retroviral RNA viruses into plant genomes. *PLoS Pathog.* **7**, e1002146 (2011)
12. Cristinaa J., Morenoa P., Moratorio G., Mustoc H.: Genome-wide analysis of codon usage bias in Ebolavirus. *Virus Res.* **196**, 87–93 (2015)
13. Dahlmann F., Hofmann-Winkler H. i wsp.: Analysis of Ebola virus entry into macrophages. *J. Infect. Dis.* DOI: 10.1093/infdis/jiv140 (2015)
14. de la Vega M.-R., Wong G., Kobinger G.P., Xiangguo Qiu: The multiple roles of sGP in Ebola pathogenesis. *Viral. Immunol.* **28**, 3–9 (2015)
15. Emerman M., Malik H.S.: Paleovirology – modern consequences of ancient viruses. *PLoS Biol.* **8**, e1000301 (2010)
16. Feldmann H., Geisbert T.W.: Ebola haemorrhagic fever. *Lancet*, **377**, 849–862 (2011)
17. Formenty P., Boesch C., Wyers M., Steiner C., Donati F., Dind D., Walker F., Le Guenno B.: Ebola virus outbreak among wild chimpanzees living in a rain forest of Côte d'Ivoire. *J. Infect. Dis*. **179 Suppl 1**, 120–126 (1999)
18. Gire S.K., Sabeti P.C. i wsp.: Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science*, **345**, 1369 (2014)
19. Grotto E and Ricci D: Identification and analysis of the main drivers for Ebola virus.spillover. *SciencesPo MediaLab.* 1–40 (2015)
20. Gut W., Pancer K.: Filowirusy – wybrane problemy na tle epidemii wywołanej wirusem Ebola. *Przegl. Epidemiol.* **69**, 15–22 (2015)
21. Harmon K.: Ancient "Fossil" virus shows infection to be millions of years old. Scientific American, http://www.scientificamerican.com/article/fossil-virus-bird-genome (31.12.2015)
22. Hofmann-Winkler H., Kaup F., Pöhlmann S.: Host cell factors in filovirus entry: novel players, new insights. *Viruses*, **4**, 3336–3362 (2012)
23. Huijbregts B., De Wachter P., Ndong Obiang S., Akou Ella M. Ebola and the decline of gorilla Gorilla gorilla and chimpanzee Pan troglodytes populations in Minkebe forest, northeastern Gabon. *Oryx*, **37**,437–443 (2003)
24. Hunt C.L., Lennemann N.J., Maury W.: Filovirus Entry: A novelty in the viral fusion world. *Viruses*, **4**, 258–275 (2012)
25. Ilinykh P.A., Lubaki N.M., Widen S.G., Renn L.A., Theisen T.C., Rabin R.L., Wood T.G., Bukreyev A.: Different temporal effects of Ebola virus VP35 and VP24 proteins on the global gene expression in human dendritic cells. *J. Virol.* **89**, 7567–7583 (2015)
26. Kamata T., Natesan M., Warfield K., Aman M.J., Ulrich R.G.: Determination of specific antibody responses to the six species of Ebola and Marburg viruses by multiplexed protein microarrays. *Clin. Vaccine Immunol.* **21**, 605–612. (2014)
27. Katzourakis A., Gifford R.J.: Endogenous viral elements in animal genomes. *PLoS Genet.* **6**, e1001191 (2010)
28. Kondratowicz A.S., Maury W. i wsp.: T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) is a receptor for Zaire Ebolavirus and Lake Victoria Marburgvirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 8426–8431 (2011)
29. Kuroda M., Takada A. i wsp.: The interaction between TIM-1 and NPC1 is important for the cellular entry of Ebola virus. *J. Virol.* **89**, 6481–6493 (2015)
30. Le Guenno B., Formenty P., Wyers M., Gounon P., Walker F., Boesch C.: Isolation and partial characterization virus. *Lancet*, **345**, 1271–1274 (1995)
31. Leroy E.M., Gonzalez J-P., Baize S.: Ebola and Marburg haemorrhagic fever viruses: major scientific advances, but a relatively minor public health threat for Africa. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 964–976 (2011)
32. Mehedi M., Falzarano D., Seebach J., Hu X., Carpenter M.S., Schnittler H.J., Feldmann H.: A new Ebola virus nonstructural glycoprotein expressed through RNA editing. *J. Virol.* **85**, 5406–5414 (2011)
33. Moratelli R., Calisher C.H.: Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with emerging deadly viruses? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **110**, 1–22 (2015)
34. Negredo A., Tenorio A. i wsp.: Discovery of an ebolavirus-like filovirus in Europe. *PLoS Pathog.* **7**, e1002304 (2011)
35. Olival K.J., Daszak P. i wsp.:. Ebola virus antibodies in fruit bats, Bangladesh. *Emerg. Infect. Dis*. **19**, 270–273 (2013)
36. Olival K.J., Hayman D.T.: Filoviruses in bats: current knowledge and future directions. *Viruses*, **6**, 1759–1788 (2014)
37. Olson S.H., Reed P., Cameron K.N., Ssebide B.J., Johnson C.K., Morse S.S., Karesh W.B., Mazet J.A.K., Joly D.O.: Dead or alive: animal sampling during Ebola hemorrhagic fever outbreaks in humans. *Emerg. Health Threats J.* **5**, 9134 (2012)
38. Osterholm M.T., Kobinger G.P. wsp.: Transmission of Ebola viruses: what we know and what we do not know. *mBio*, **6**, e00137–15 (2015)
39. Patel M.R., Emerman M., Malik H.S.: Paleovirology – ghosts and gifts of viruses past. *Curr. Opin. Virol.* **1**, 304–309 (2011)
40. Pigott D.M., Hay S.I. i wsp.: Mapping the zoonotic niche of Ebola virus disease in Africa. *Elife*, **3**, e04395 (2014)
41. Pourrut X., Souris M., Towner J.S., Rollin P.E., Nichol S.T., Gonzalez J.P., Leroy E.: Large serological survey showing cocirculation of Ebola and Marburg viruses in Gabonese bat populations, and a high seroprevalence of both viruses in Rousettus aegyptiacus. *BMC Infect. Dis*. **9**, 159 (2009)
42. Roddy P., Borchert M, i wsp.: Clinical manifestations and case management of Ebola haemorrhagic fever caused by a newly identified virus strain, Bundibugyo, Uganda, 2007–2008. *PLoS One*, **7**, e52986 (2012)
43. Saéz A.M., Leendertz F.H. i wsp..: Investigating the zoonotic origin of the West African Ebola epidemic. *EMBO Mol. Med.* **7**, 17–23 (2015)

44. Stahelin R.V.: The Ebolavirus: from basic research to a global crisis. *PLoS Pathog*. **11**, e1005093 (2015)
45. Tang Y., Leao I.C., Coleman E.M., Broughton R.S., Hildreth J.E.: Deficiency of Niemann-Pick type C-1 protein impairs release of human immunodeficiency virus type 1 and results in Gag accumulation in late endosomal/lysosomal compartments. *J. Virol.* **83**, 7982–7995 (2009)
46. Taro Kawai and Shizuo Akira: "Toll-like receptor and RIG-1-like receptor signaling" *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1143**, 1–20 (2008)
47. Trunschke M., Conrad D., Enterlein S., Olejnik J., Brauburger K., Mühlberger E.: The L-VP35 and L-L interaction domains reside in the amino terminus of the Ebola virus L protein and are potential targets for antivirals. *Virology*, **44**,1135–1145 (2013)
48. White J.M., Schornberg K.L.: A new player in the puzzle of filovirus entry. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 317–322(2012)
49. World Health Organization: EBOLA STRATEGY. Ebola and Marburg virus disease epidemics: preparedness, alert, control, and evaluation, 10.2014, http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/130160/1/WHO_HSE_PED_CED_2014.05_eng.pdf?ua=1&ua=1 (31.12.2015)
50. World Health Organization: What we know about transmission of the Ebola virus among humans. Ebola situation assessment, 06.10.2014, http://www.who.int/mediacentre/news/ebola/06-october-2014 (31.12.2015)
51. Wróblewska M., Pancer K.: Zakażenia wirusem Ebola – epidemiologia, postępowanie z pacjentem i diagnostyka laboratoryjne zakażeń, *Zakażenia*, **4**, 19–29 (2014)
52. Yan J., Gao G.F.: MicroRNAs: the novel targets for Ebola drugs. *China Life Sci.* **57**, 985–986 (2014)

POST. MIKROBIOL.,
2016, 55, 2, 215–223
http://www.pm.microbiology.pl

KONCEPCJA CHROMIDU I JEJ ZNACZENIE DLA KLASYFIKACJI POZACHROMOSOMOWYCH REPLIKONÓW BAKTERII

Jakub Czarnecki[1], Dariusz Bartosik[1]*

[1] Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Wpłynęło w grudniu 2015 r.
Zaakceptowano w styczniu 2016 r.

1. Wprowadzenie. 2. Nazewnictwo replikonów niezbędnych. 3. Koncepcja chromidu. 4. Identyfikacja i klasyfikacja chromidów. 5. Chromidy w genomach bakterii. 6. Ewolucyjne korzyści wynikające z obecności chromidów. 7. Podsumowanie

The concept of chromid and its influence on the classification of bacterial extrachromosomal replicons

Abstract: Extrachromosomal replicons are common components of bacterial genomes. While the genetic information essential for growth and division of bacterial cells is located within the chromosome, the extrachromosomal replicons, usually classified as plasmids, can provide functions which are critical for the survival of a bacterium in a specific environment; however, they are not indispensable for the viability of the host cells. Comparative genomic studies revealed that in many bacterial genomes some chromosomal genes had been transferred into the co-occurring plasmids. This phenomenon has led to the generation of essential extrachromosomal replicons, called chromids, sharing features of both chromosomes and plasmids. The prevalence of chromids in bacteria and their conserved character within certain taxonomic groups suggest an important role for these replicons in the evolution of bacteria.

1. Introduction. 2. Nomenclature of essential replicons. 3. The concept of chromid. 4. Identification and classification of chromids. 5. Chromids in bacterial genomes. 6. Evolutionary significance of chromids. 7. Summary

Słowa kluczowe: chromid, chromosom, genomy bakterii, plazmid
Key words: chromid, chromosome, bacterial genomes, plasmid

1. Wprowadzenie

Dynamiczny rozwój genomiki, szczególnie zintensyfikowany w ostatnich latach dzięki opracowaniu i upowszechnieniu wysokoprzepustowych technik sekwencjonowania DNA, przynosi coraz więcej danych na temat struktury genomów bakteryjnych. Okazało się, że genomy bakterii są bardzo zróżnicowane, zarówno pod względem wielkości, organizacji, jak i rodzaju niesionej informacji genetycznej [10]. Wiele z nich ma strukturę wieloreplikonową, bowiem, oprócz chromosomu, zawiera plazmidy, a także niekiedy profagi, które, dzięki obecności typowo plazmidowych systemów replikacyjnych, występują w komórce w formie autonomicznych replikonów (np. P1 i N15).

Plazmidy, w przeciwieństwie do chromosomów, nie są niezbędne dla swoich gospodarzy, nie zawierają bowiem kluczowych dla bakterii genów odpowiedzialnych za podstawowe procesy życiowe (*housekeeping genes*). Odgrywają one jednak ważną rolę w ewolucji bakterii, umożliwiając wprowadzanie do komórek egzogennego DNA w drodze horyzontalnego transferu genów. Replikony te determinują często różnorodne cechy fenotypowe, umożliwiające bakteriom szybką adaptację do zmiennych warunków środowiska oraz zapewniające im przewagę w konkurencji z innymi mikroorganizmami zasiedlającymi tę samą niszę ekologiczną [10].

Bardzo ważne dla zrozumienia struktury genomów bakterii jest właściwe zdefiniowanie chromosomu. To na pozór proste zadanie w praktyce bywa trudne, co wynika z dużej plastyczności genomów i częstej translokacji informacji genetycznej między różnymi, współwystępującymi w komórce replikonami.

Badania nad architekturą genomów zapoczątkowano już w latach 50. XX wieku, niedługo po opisaniu struktury podwójnej helisy DNA. Początkowo prowadzono je wyłącznie na modelu Gram-ujemnej pałeczki *Escherichia coli* (typ *Proteobacteria*; klasa *Gammaproteobacteria*). Wykorzystując dostępne wówczas metody ustalono, że podstawowa informacja genetyczna, determinująca funkcje i właściwości komórek tej bakterii, skupiona jest w pojedynczym, kolistym chromosomie [3, 16]. Analogiczne obserwacje poczyniono również dla innych gatunków bakterii reprezentujących różne grupy taksonomiczne (m.in. *Bacillus subtilis*; typ *Firmicutes*). Wydawało się wówczas, że obecność pojedynczego chromosomu jest cechą charakterystyczną wszystkich bakterii.

Pogląd ten utrzymywał się dość długo, aż do momentu identyfikacji w genomie *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. (*Alphaproteobacteria*) dwóch replikonów wykazujących właściwości chromosomów [32]. Jeszcze przed zapoczątkowaniem ery genomiki zdano sobie sprawę, że występowanie w komórce kilku niezbędnych replikonów nie jest zjawiskiem unikatowym. W kilku

* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel. 22 5541318; e-mail: bartosik@biol.uw.edu.pl

kolejnych analizowanych wówczas szczepach zidentyfikowano dwa (np. w *Leptospira interrogans*, *Brucella* spp., *Pseudoalteromonas haloplanktonis*, *Vibrio* spp.), a nawet trzy tego typu replikony (w *Burkholderia* spp.) [20, 22, 36]. Obecnie wiadomo, że genomy złożone (*composite genomes*), w których geny metabolizmu podstawowego usytuowane są w różnych replikonach, występują w ok. 10% bakterii (których genomy zsekwencjonowano), reprezentujących różne grupy filogenetyczne, często odległe ewolucyjnie [15].

2. Nazewnictwo replikonów niezbędnych

Analizy z zakresu genomiki porównawczej dowodzą, że replikony niezbędne wchodzące w skład poszczególnych genomów złożonych nie są równocenne. Największy w komórce replikon jest konserwowany ewolucyjnie i zawiera większość genów metabolizmu podstawowego. Jego replikacja rozpoczyna się w miejscu *origin*, dzięki działaniu białka inicjatorowego DnaA [15, 21]. Pozostałe replikony niezbędne podlegają szybszym zmianom ewolucyjnym. Cechuje je mniejsze zagęszczenie niezbędnej informacji genetycznej oraz obecność różnorodnych systemów replikacyjnych [6, 29].

Brak zunifikowanych kryteriów pomocnych w identyfikacji i klasyfikacji replikonów niezbędnych znajduje odzwierciedlenie w niejednolitym nazewnictwie tych elementów. Replikony takie najczęściej określane są mianem „chromosomów". Największy tego typu replikon w genomie, ze względu na znaczenie, nazywany jest „chromosomem pierwszorzędowym", natomiast mniejszy „chromosomem drugorzędowym". W ten sposób sklasyfikowano niezbędne replikony wielu bakterii, m.in. *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. (chromosom I – 3,2 Mpz, chromosom II – 0,94 Mpz), *Vibrio cholerae* (chromosom I – 3,0 Mpz, chromosom II – 1,0 Mpz) czy *Agrobacterium tumefaciens* C58 (chromosom I – 2,8 Mpz, chromosom II – 2,1 Mpz). Gdy w bakterii występują trzy replikony niezbędne, najmniejszy z nich przyjmuje nazwę „chromosomu trzeciorzędowego" (w przypadku *Burkholderia xenovorans* LB400 jest to replikon o wielkości 1,9 Mpz [4]).

Niektóre replikony niezbędne zaliczono do grupy plazmidów, a więc pozachromosomowych ruchomych elementów genetycznych. Większość z nich, ze względu na znaczne rozmiary, nazywano „megaplazmidami". Znane są jednak również niewielkie „niezbędne plazmidy", występujące np. w *Borrelia burgdorferi* B31 (cp26; 26 kpz) oraz w *Buchnera* sp. (pLEU; 9 kpz i pTRP; 7,2 kpz). W pierwszym z wymienionych znajduje się gen resolwazy telomerów (*resT*), białka niezbędnego do rozdziału powstałych po replikacji kopii chromosomów liniowych tej bakterii [2]. Dwa pozostałe niosą jedyne w genomie kopie genów, odpowiednio, *leuABCD* – kodujących enzymy zaangażowane w biosyntezę leucyny i *trpEG* warunkujące syntezę trypotofanu [28]. Plazmidy tego typu, zawierające pojedyncze geny metabolizmu podstawowego, są niekiedy nazywane w literaturze „niezbędnymi elementami genetycznymi" (*essential genetic elements*), czyli „niezbędnikami" [10].

Niejednolite nazewnictwo powoduje, że pokrewne replikony niezbędne, występujące w różnych szczepach tego samego gatunku bakterii, są niekiedy zaliczane do odmiennych grup – plazmidów bądź chromosomów. Na przykład replikon niezbędny pSymB (1,7 Mpz) i plazmid pSymA (1,4 Mpz) *Sinorhizobium meliloti* 1021 zdefiniowano w bazie danych GenBank (NCBI) jako megaplazmidy [9], a homologiczne replikony występujące w szczepie *S. meliloti* AK83 nazwano, odpowiednio, chromosomem drugo- i trzeciorzędowym.

Inny przykład stanowią dwa pokrewne replikony występujące w różnych szczepach *Rhodobacter sphaeroides*. Jeden z nich został zdefiniowany jako chromosom drugorzędowy (943 kpz; szczep 2.4.1.), a drugi jako plazmid pRSPA01 (877,9 kpz; szczep ATCC 17029).

Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku trzech pokrewnych replikonów *Agrobacterium tumefaciens*. Dwa z nich (pochodzące ze szczepów C58 i S4) zaliczono do grupy chromosomów drugorzędowych, a trzeci (ze szczepu K84) do plazmidów, mimo iż wszystkie one zawierają potencjalne geny metabolizmu podstawowego. „Chromosomy drugorzędowe" szczepów C58 i S4 zawierają operony rRNA, których obecność, zdaniem niektórych badaczy, powinna stanowić podstawowe kryterium pozwalające na zaliczenie danego replikonu do grupy chromosomów [28]. Należy jednak podkreślić, że pełen zestaw operonów rRNA występuje zwykle w obrębie największego niezbędnego replikonu danego szczepu, tj. chromosomu. Operony usytuowane w mniejszych replikonach stanowią często jedynie dodatkowe kopie, których obecność nie jest niezbędna dla komórki. Potwierdzają to m.in. analizy przeprowadzone z udziałem plazmidu pAMI1 (118 kpz) *Paracoccus aminophilus* JCM 7685, który, mimo iż zawiera geny rRNA, może być z łatwością usunięty z komórek macierzystego szczepu [12].

Podane wyżej przykłady wskazują na potrzebę opracowania nowych, spójnych zasad pozwalających na identyfikację i jednoznaczne zdefiniowanie niezbędnych replikonów bakterii. Powiązanie cech metabolicznych komórek gospodarzy z informacją genetyczną poszczególnych replikonów nie jest jednak łatwe i wymaga przeprowadzenia złożonych i czasochłonnych analiz eksperymentalnych, często o wymiarze „-omicznym". Nie ulega wątpliwości, że przy lawinowo rosnącej liczbie poznawanych genomów, replikony takie powinny być identyfikowane z wykorzystaniem analiz *in silico.* Pozwoliłoby to na wprowadzenie ich zunifikowanego nazewnictwa już na etapie deponowania sekwencji nukleotydowych genomów w bazach danych.

3. Koncepcja chromidu

Impulsu do szerszej dyskusji na temat struktury bakteryjnych genomów wieloreplikonowych dostarczyły wyniki szeroko zakrojonych analiz z zakresu genomiki porównawczej przeprowadzonych w 2010 roku przez Harrisona i współpracowników z University of York (Wielka Brytania) [15].

Badacze ci przeanalizowali wszystkie dostępne wówczas kompletne sekwencje 897 genomów, zwracając uwagę, że aż w 82 występują duże replikony, które choć zawierają typowo plazmidowe systemy replikacyjne oraz geny adaptacyjne, niosą również informację genetyczną pochodzenia chromosomowego (w tym geny niezbędne do przeprowadzania podstawowych procesów życiowych). Mimo łączących je cech, replikony te zostały sklasyfikowane w bazach danych w obrębie różnych kategorii – jako chromosomy drugorzędowe, megaplazmidy bądź plazmidy.

Nie ulega wątpliwości, że replikony tego typu powstały w wyniku przeniesienia części informacji genetycznej z chromosomów do współwystępujących w komórkach plazmidów. Ze względu na dualistyczne właściwości, zaproponowano zaklasyfikowanie ich do odrębnej, nowoutworzonej grupy replikonów – chromidów (*chromids*) (Rys. 1). Nazwa ta, wywodząca się od słów CHROmosom i plazMID, doskonale odzwierciedla naturę i pochodzenie tych replikonów [15].

Z badań Harrisona i wsp. [15] wynika, że chromidy to duże replikony, zwykle drugie pod względem wielkości w komórce. Sekwencje nukleotydowe chromidów i chromosomów wykazują wiele cech wspólnych, np. mają zbliżoną zawartość par G+C i podobne wykorzystanie kodonów w sekwencjach kodujących (*codon usage*), co wskazuje na długotrwałą koewolucję obu typów replikonów.

Zaobserwowano, że chromidy są replikonami bardziej konserwowanymi niż plazmidy. Homologiczne chromidy występują niejednokrotnie u wszystkich przedstawicieli danego rodzaju taksonomicznego, co odróżnia je od plazmidów, których duże zróżnicowanie widoczne jest w szczepach należących do tego samego gatunku [15]. Wiele chromidów zawiera informację genetyczną, która jest charakterystyczna dla danego rodzaju [15, 24] i umożliwia bakteriom zajęcie właściwej im niszy ekologicznej. Chromidy występujące w różnych rodzajach bakterii mają odmienne typy systemów replikacyjnych, co sugeruje, że replikony te powstały kilkukrotnie w toku ewolucji, zaś ich prekursorami były plazmidy charakterystyczne dla poszczególnych rodzajów taksonomicznych gospodarzy.

Ze względu na polifiletyczne pochodzenie, chromidy nie zawierają konserwowanego zestawu genów, który mogłyby stanowić marker pomocny w ich identyfikacji. Harrison i wsp. [24] zaproponowali trzy kryteria definiujące te replikony, które łącznie pomagają odróżnić je od plazmidów i chromosomów. Są to: (i) obecność plazmidowych systemów replikacyjnych, (ii) skład nukleotydowy sekwencji zbliżony do chromosomu i (iii) występowanie genów rdzenia genomu, konserwowanych w chromosomach pokrewnych bakterii. Ostatnie z wymienionych kryteriów wskazuje na niezbędność chromidów – ich usunięcie z komórki powinno wywoływać efekt letalny. Niektóre chromidy niosą tylko pojedyncze geny niezbędne (na przykład w pSymB *Sinorhizobium meliloti* – dwa geny [9]), natomiast inne zawierają duże segmenty DNA pochodzenia chromosomowego, o wielkości nawet kilkudziesięciu tysięcy par zasad (np. tzw. chromosom 2 *Paracoccus denitrificans* PD 1222).

Należy podkreślić, że przyjęcie koncepcji chromidu zasadniczo zmienia sposób postrzegania przez nas struktury genomów bakteryjnych. W jej świetle, mikroorganizmy te mają tylko jeden chromosom z silnie konserwowanym systemem replikacyjnym typu *dnaA* [21]. Natomiast replikony definiowane jako chromidy, ze względu na ich „plazmidowe korzenie", powinny być zaliczane wraz z plazmidami do grupy elementów pozachromosomowych (Rys. 1).

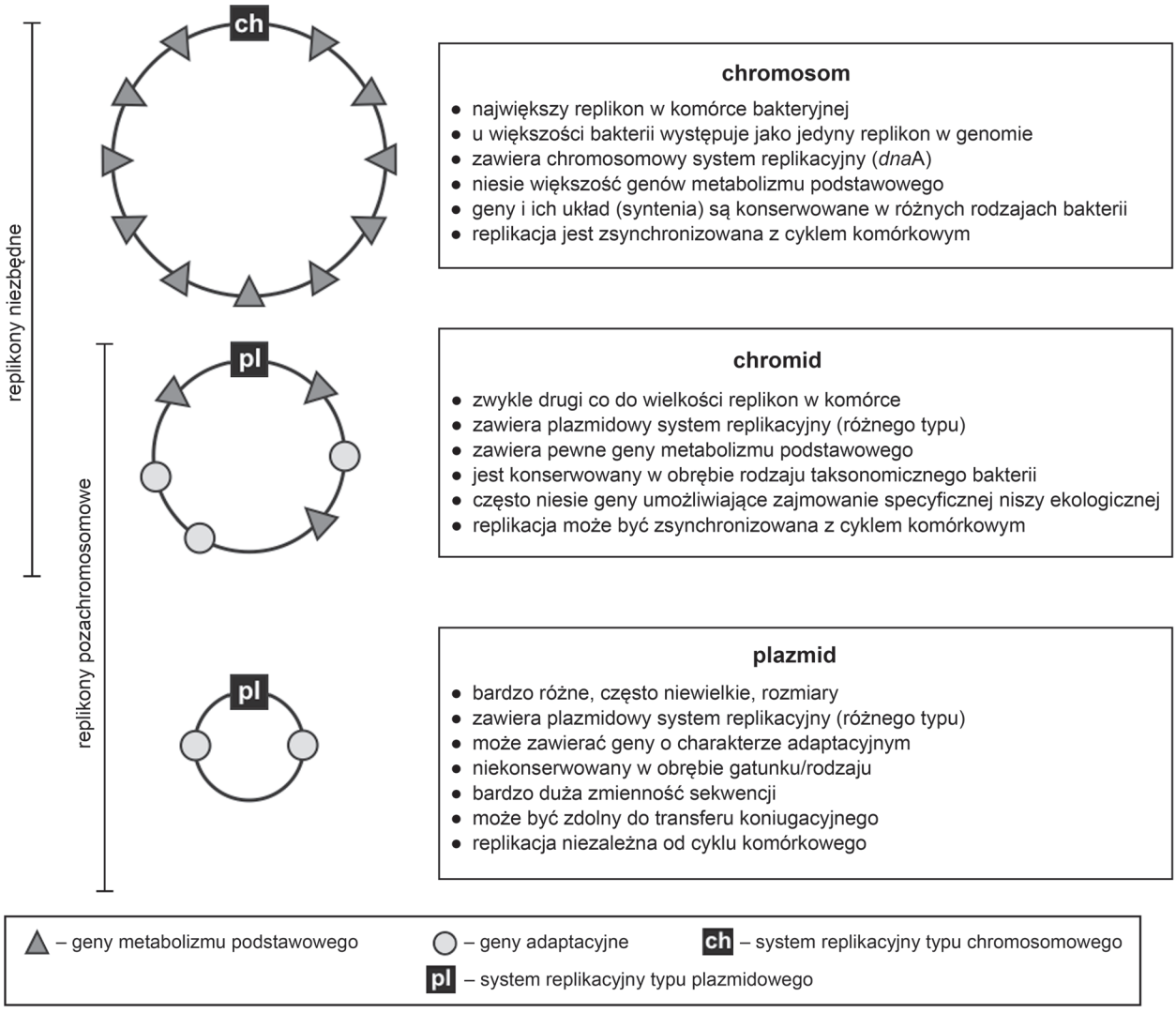
4. Identyfikacja i klasyfikacja chromidów

Propozycja nowej klasyfikacji replikonów bakteryjnych została zaakceptowana przez wiele zespołów, prowadzących badania z zakresu genomiki. W kolejnych poznawanych genomach złożonych wyróżniane są nowe chromidy, jednak ich identyfikacja często bywa problematyczna.

Najbardziej dyskusyjne jest kryterium „niezbędności" chromidów. Niektóre geny uważane za niezbędne u jednych bakterii, u innych mogą pełnić mniej istotne funkcje, i odwrotnie, geny uważane za nieistotne u jednych gospodarzy mogą odgrywać kluczową rolę w procesach metabolicznych innych gatunków [17]. Co więcej, niektóre bakterie niosą unikatowe geny niezbędne, np. wspomniany gen resolwazy telomerów w *Borrelia* spp. [2], które można zidentyfikować i zdefiniować wyłącznie w toku analiz eksperymentalnych.

Niektóre replikony pozachromosomowe mogą nie spełniać kryterium „niezbędności", chociaż występują w nich homologi genów kluczowych dla bakterii. Może to wynikać np. z obecności w komórce kilku kopii takich genów, usytuowanych w różnych replikonach. Nie ulega zatem wątpliwości, że analizy ładunku genetycznego chromidów nie powinny być prowadzone w oderwaniu od kompletnych sekwencji genomów szczepów gospodarzy.

Dyskusyjne wydaje się również samo pojęcie „niezbędności" genów. Próba identyfikacji *in silico* informacji



Rys. 1. Charakterystyka głównych typów replikonów występujących w genomach bakterii

genetycznej niezbędnej dla komórki nie znajduje często poparcia w wynikach analiz eksperymentalnych. Niektórych genów nie można zmutować w określonych warunkach laboratoryjnych (wydają się więc niezbędne) jednak z łatwością udaje się je usunąć z komórek po zmianie warunków hodowli [8]. Szczepy pozbawione tych genów bywają jednak upośledzone pod względem niektórych cech metabolicznych, co zmniejsza ich szanse w konkurencji z innymi organizmami, a tym samym uniemożliwia im przetrwanie w naturalnym środowisku.

Ze względu na przedstawione wyżej wątpliwości, niektórzy badacze stosują bardziej liberalną definicję chromidów, proponując, aby o przynależności do tej grupy replikonów decydowały tylko dwa kryteria, tj. obecność plazmidowych systemów replikacyjnych oraz zbliżony do chromosomu skład nukleotydowy sekwencji [24]. Na tej podstawie typowane są replikony o długiej historii ewolucyjnej w danej bakterii, na co wskazuje „dopasowanie" ich sekwencji do genomów gospodarzy.

Zrezygnowanie z kryterium „niezbędności" pozwala na zaliczenie do grupy chromidów znacznie większej liczby replikonów pozachromosomowych. Na przykład w genomach kilku szczepów bakterii morskich z kladu *Roseobacter* (*Alphaproteobacteria*), mianem chromidów określono: (i) dwa z pięciu replikonów pozachromosomowych *Dinoroseobacter shibae* DSM16493 [24], (ii) wszystkie trzy replikony pozachromosomowe *Pheobacter inhibens* DSM17395 [24] oraz (iii) osiem z jedenastu replikonów pozachromosomowych *Marinovum algicola* D898 [14].

Niektóre z wyróżnionych w ten sposób chromidów można usunąć z komórek bakterii. Powiodło się to m.in. w przypadku chromidów *P. inhibens* DSM17395 (262 kpz) i *D. shibae* DSM16493 (72 kpz), których utrata nie spowodowała widocznych zmian w tempie wzrostu bakterii w warunkach laboratoryjnych. Replikony te są jednak ewolucyjnie zachowane w obu gatunkach i występują w szczepach izolowanych nawet z odległych regionów geograficznych. Determinują one cechy, które

są ważne (być może „niezbędne") do przeżycia gospodarzy w środowisku naturalnym, takie jak produkcja antybiotyków [24] czy adaptacja do warunków głodu i stresu oksydacyjnego [30].

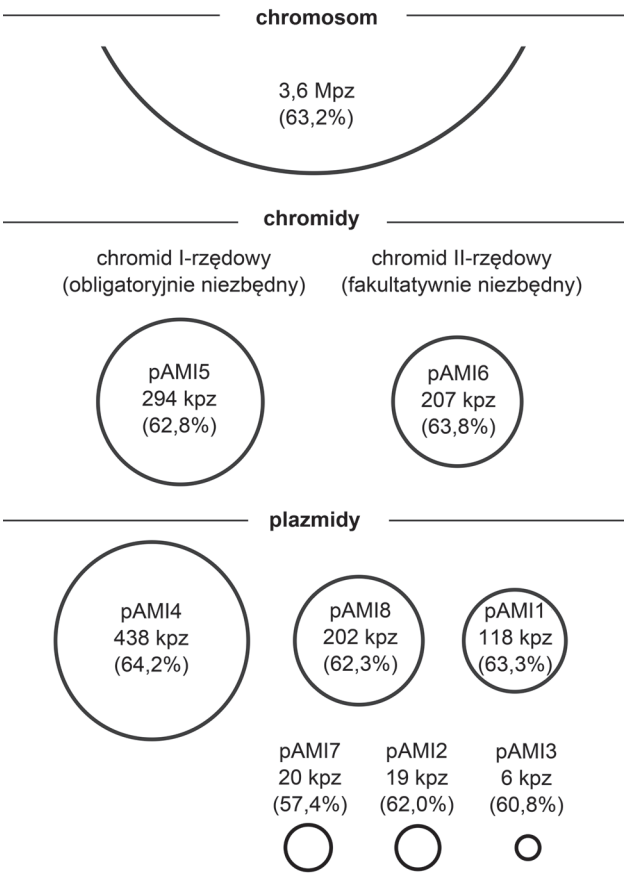
Obserwacje te skłoniły badaczy do wyróżnienia dwóch grup chromidów, tj. chromidów *sensu stricto* i *sensu lato* [24], nazwanych również alternatywnie, odpowiednio, chromidami pierwszo- i drugorzędowymi [12]. Pierwsze są obligatoryjnie niezbędne swoim gospodarzom, bowiem zawierają przynajmniej jeden kluczowy gen, występujący w jednej kopii w genomie, niezbędny do przeprowadzania podstawowych procesów życiowych. Drugie są fakultatywnie niezbędne, mogą więc być usunięte z komórki w warunkach laboratoryjnych, lecz prawdopodobnie odgrywają istotną rolę, gdy bakteria występuje w środowisku naturalnym [24].

Najbardziej wiarygodnych informacji na temat roli i znaczenia replikonów pozachromosomowych przynoszą analizy eksperymentalne, umożliwiające określenie ich rzeczywistej funkcji. Z tego powodu, w badaniach nad genomami bakterii z rodzaju *Paracoccus* (*Alphaproteobacteria*), prowadzonych z udziałem autorów tej pracy, dwa wymienione wcześniej kryteria bioinformatyczne stosowano jedynie do wstępnego typowania chromidów, a nie przy ostatecznej klasyfikacji [12].

Analizy *in silico* sekwencji genomu *Paracoccus aminophilus* JCM 7686 wskazywały, że aż sześć z ośmiu replikonów pozachromosomowych tego szczepu powinno być zaliczonych do grupy chromidów. Jednak analiza funkcji poszczególnych replikonów wykazała, że tylko dwa z nich odgrywają ważną rolę, warunkując przeżycie lub wpływając na tempo wzrostu komórek gospodarza w różnych testowanych warunkach. Na tej podstawie wyróżniono chromid pierwszo- (pAMI5) i drugorzędowy (pAMI6) [11, 12] (Rys. 2). Nie oznacza to, że informacja genetyczna zawarta w obrębie pozostałych replikonów nie odgrywa istotnej roli w warunkach naturalnych. Kodowane przez nie właściwości odpowiadają jednak bardziej cechom plazmidów, których geny adaptacyjne są istotne jedynie w szczególnych warunkach bytowania.

Analogiczne badania przeprowadzone z udziałem bakterii z rodzaju *Rhizobium* również wskazują na istnienie dwóch grup chromidów. W *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii TA1 występują cztery pozachromosomowe replikony, zarówno nieusuwalne, jak i takie, których utrata prowadzi do znacznego upośledzenia wzrostu komórek gospodarza. Wszystkie one spełniają więc kryteria chromidów (pierwszo- lub drugorzędowych), niosąc jednocześnie geny adaptacyjne, odpowiedzialne za nawiązanie stosunków symbiotycznych z roślinami [31].

Inny ciekawy przykład stanowią dwa replikony pozachromosomowe (p42e i p42f) *Rhizobium etli* CFN42. Występują w nich liczne typowe dla chromosomów



Rys. 2. Replikony wchodzące w skład genomu *Paracoccus aminophilus* JCM 7686 (*Alphaproteobacteria*) [12]
W nawiasach podano procentową zawartość par GC w sekwencjach nukleotydowych poszczególnych replikonów

geny, m.in. *cobFGHIJKLM* odpowiedzialne za syntezę kobalaminy, *panBC* zaangażowane w syntezę kwasu pantotenowego, *nadABC* odpowiedzialne za syntezę NAD czy *minCDE* zaangażowane w podziały komórkowe. Chociaż nie są to geny „niezbędne" (można je zmutować w warunkach laboratoryjnych; [19, 34]), badacze uważają, że szczepy ich pozbawione nie byłyby w stanie przetrwać w środowisku naturalnym. Oba replikony należy więc uznać za chromidy drugorzędowe. Na ich przynależność do grupy chromidów wskazywały także wcześniejsze przewidywania Harrisona i wsp. [15].

5. Chromidy w genomach bakterii

Chromidy są składową genomów wielu bakterii reprezentujących różne grupy taksonomiczne [15]. Analizy danych dostępnych w 2014 roku w bazie GenBank (NCBI) wskazują, że replikony te są szczególnie powszechne w *Proteobacteria* [25]. Zidentyfikowano je w licznych gatunkach z 19 rodzajów (spośród 231) zaliczanych do klas: (i) *Alpha-* (*Agrobacterium* spp., *Asticcacaulis* spp., *Brucella* spp., *Ochrobactrum* spp.,

Paracoccus spp., *Rhizobium* spp., *Rhodobacter* spp., *Sinorhizobium* spp., *Sphingobium* spp.), (ii) *Beta-* (*Burkholderia* spp., *Cupriavidus* spp., *Ralstonia* spp., *Variovorax* spp.) i (iii) *Gammaproteobacteria* (*Aliivibrio* spp., *Listonella* spp., *Photobacterium* spp., *Pseudoalteromonas* spp., *Vibrio* spp.) [25].

Dla porównania, w typie *Firmicutes*, liczącym 90 rodzajów, zidentyfikowano jedynie dwa szczepy niosące chromidy (*Butyrivibrio proteoclasticus* B316, *Clostridium difficile* BI1). Obecność tego typu replikonów stwierdzono także w bakteriach z typów: (i) *Actinobacteria* (*Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* DSM 43 111), (ii) *Bacteroidetes* (*Prevotella* spp.), (iii) *Cyanobacteria* (*Anabaena* sp. 90, *Cyanothece* sp. ATCC 51142), (iv) „*Deinococcus-Thermus*" (*Deinococcus radiodurans* R1) i (v) *Spirochaetes* (*Leptospira* spp.) [25].

Większość wyróżnionych dotąd chromidów poddano jedynie pobieżnym analizom sekwencji nukleotydowych. Bardziej szczegółowe badania, mające na celu poznanie podstaw funkcjonowania genomów złożonych, prowadzono głównie z wykorzystaniem kilku modelowych mikroorganizmów. Bakterie te wybrano ze względu na interesujące badaczy właściwości szczepów gospodarzy bądź unikatową strukturę ich genomów. Są to m.in.: (i) *Vibrio cholerae* – czynnik etiologiczny cholery [26, 33, 35], (ii) *Agrobacterium tumefaciens* – fitopatogen, zawierający w genomie dwa chromidy, w tym jeden o strukturze liniowej [29], (iii) *Sinorhizobium meliloti* – bakteria brodawkowa [9] oraz (iv) szczepy *Burkholderia* spp., w których współwystępują dwa chromidy [4, 23].

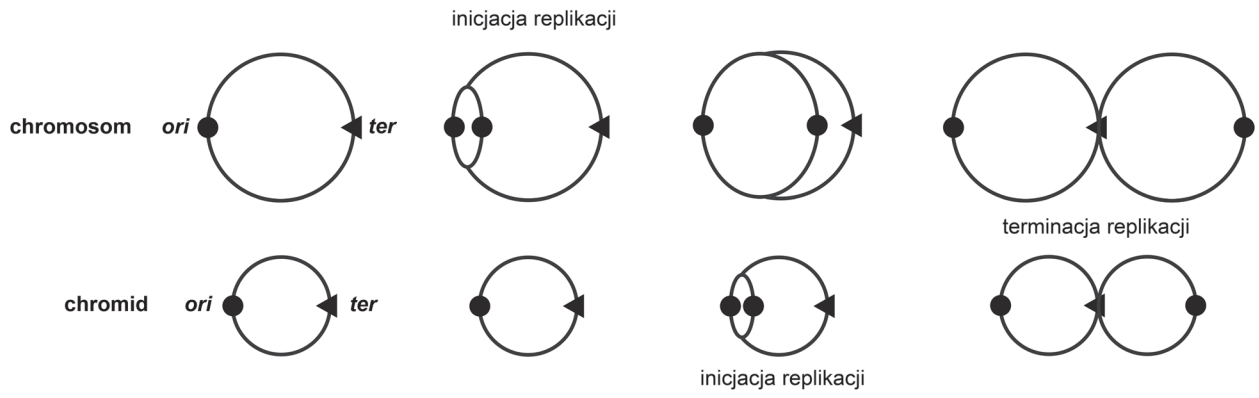
6. Ewolucyjne korzyści wynikające z obecności chromidów

Chromidy powstawały przypadkowo w wyniku losowych zdarzeń rekombinacyjnych, które doprowadziły do międzyreplikonowej translokacji informacji genetycznej. Dopasowanie sekwencji chromidów do genomu danego gospodarza sugeruje, że do zdarzeń tych doszło dość dawno z ewolucyjnego punktu widzenia. Ze względu na obecność pokrewnych chromidów w różnych gatunkach jednego rodzaju taksonomicznego, wydaje się prawdopodobne, że wiele tego typu replikonów powstało w szczepach, które były protoplastami wyróżnianych współcześnie rodzajów taksonomicznych.

Na długotrwałą koewolucję chromidów i chromosomów wskazują również wyniki badań prowadzonych na modelu *V. cholerae*. W bakterii tej, replikony obu typów podlegają wspólnej globalnej regulacji, na co wskazuje synchronizacja ich replikacji (na etapie terminacji) w cyklu komórkowym [26] (Rys. 3). Odróżnia to chromid *V. cholerae* od plazmidów, które powielają swoje genomy niezależnie od replikacji chromosomu. Być może synchronizacja replikacji niezbędnych replikonów jest cechą charakterystyczną wszystkich genomów złożonych; potwierdzenie tej tezy wymaga jednak eksperymentalnej weryfikacji.

Chromidy powstały niezależnie w różnych grupach taksonomicznych bakterii. Nie zostały one wyeliminowane w toku ewolucji, co sugeruje, że rozdział niezbędnej informacji genetycznej między kilka replikonów może być korzystny dla bakterii. Utrzymywanie dodatkowych dużych replikonów oraz powiązanie ich podstawowych funkcji z cyklem komórkowym i globalnym systemem regulacji ekspresji genów wymaga znacznych „kosztów ewolucyjnych", których wydatkowanie powinno być odpowiednio kompensowane [25].

Jedna z hipotez zakłada, że genomy złożone zapewniają komórce możliwość utrzymywana większej ilości informacji genetycznej. W istocie, genomy takie (5,73 Mpz ± 1,66 Mpz) są zwykle większe od genomów o strukturze jednoreplikonowej, zawierających jedynie chromosom (3,38 Mpz ± 1,81 Mpz) [15]. Powstawanie genomów złożonych nie jest jednak warunkiem koniecznym do rozbudowy genomu. Bardzo dużą ilość informacji genetycznej jest w stanie utrzymać również



Rys. 3. Synchronizacja terminacji replikacji chromosomu i chromidu
ori – origin, miejsce inicjacji replikacji, *ter – terminus*, miejsce zakończenia rundy replikacyjnej.

pojedynczy replikon, czego przykładem są m.in. chromosomy *Sorangium cellulosum* (*Deltaproteobacteria*) i *Ktedonobacter racemifer* (*Chloroflexi*), o wielkości przekraczającej 13 Mpz [5, 27].

Należy zauważyć, że replikacja genomów złożonych zostaje zainicjowana w kilku miejscach *origin*, usytuowanych w różnych replikonach. Może to skrócić czas powielania całego genomu i doprowadzić do wzrostu tempa podziałów komórkowych. Znane są przykłady blisko spokrewnionych bakterii (mających genomy o podobnej wielkości, lecz różnej strukturze), które charakteryzuje odmienna dynamika wzrostu. Widoczne jest to m.in. w bakteriach brodawkowych (*Alphaproteobacteria*), do których zalicza się zarówno szybko rosnące bakterie o genomach wieloreplikonowych (rodzaje *Rhizobium* i *Sinorhizobium*), jak i wolno rosnące szczepy mające genomy jednoreplikonowe (rodzaje *Mesorhizobium* i *Bradyrhizobium*) [15].

Analogiczne różnice zaobserwowano także u dwóch stosunkowo blisko spokrewnionych gatunków – *V. cholerae* i *E. coli*. Porównując tempo ich wzrostu w warunkach laboratoryjnych stwierdzono, że czas generacji *V. cholerae* (genom złożony) jest o połowę krótszy niż *E. coli* (genom jednoreplikonowy odpowiadający wielkością genomowi *V. cholerae*); czasy te wynoszą, odpowiednio, 15 i 30 min [13].

Przytoczone wyżej przykłady sugerują ścisłą korelację między strukturą genomu a tempem podziałów komórkowych. Podjęte próby eksperymentalnej weryfikacji tych zależności, przeprowadzone na modelu *V. cholerae*, nie pozwoliły jednak na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków. Zgodnie z oczekiwaniami, zmodyfikowany szczep, w którym połączono chromosom i chromid w jeden replikon, rósł nieco wolniej niż szczep dziki. Jednak spowolnione tempo wzrostu obserwowano również w przypadku szczepu, którego chromid powiększono, wprowadzając do niego dodatkowy segment chromosomowego DNA (podobnej wielkości chromid i chromosom) [33].

Interpretując wyniki tego typu analiz, należy mieć świadomość, że rozległe zmiany w architekturze genomu mogą zaburzyć funkcjonowanie wielu genów, w tym genów niezbędnych do przeprowadzania podstawowych procesów życiowych. Badając spontaniczną translokację segmentu chromosomowego DNA w genomie *Burkholderia cepacia* [23], zaobserwowano, że transfer informacji genetycznej z chromosomu do chromidu może spowodować zmianę poziomu ekspresji przeniesionych genów.

Inne badania potwierdziły, że poziom transkryptów genów chromidowych jest niższy niż genów chromosomowych [35]. Przyczyną tego jest mniejsza liczba kopii genów chromidowych w genomie (*gene dosage*), co wynika ze wspomnianej wcześniej synchronizacji terminacji replikacji chromidu i chromosomu (Rys. 3). Ponieważ chromidy są mniejsze od chromosomów, ich replikacja rozpoczyna się później, dlatego geny znajdujące się w ich obrębie mają przez dłuższy czas cyklu komórkowego mniejszą liczbę kopii niż geny znajdujące się w chromosomie, zwłaszcza w pobliżu *origin* replikacji (*oriC*) [23].

Translokacja informacji genetycznej do chromidów może stanowić więc dodatkowy czynnik pozwalający na optymalizację poziomu ekspresji wielu genów. Geny rzadziej transkrybowane w mniejszym stopniu podlegają działaniu oczyszczającego doboru selekcyjnego (*purifying selection*), który eliminuje z populacji bakterii ich zmutowane warianty. W rezultacie informacja genetyczna chromidów może ulegać szybszym zmianom ewolucyjnym [7].

Należy także podkreślić, że genomy chromidów, dzięki niewielkiemu zagęszczeniu genów niezbędnych do przeprowadzania podstawowych procesów życiowych, są bardziej plastyczne niż chromosomy. Świadczy o tym m.in. nagromadzenie w nich dużej ilości egzogennej informacji genetycznej, w tym genów adaptacyjnych, których obecność umożliwia bakteriom zajmowanie określonych nisz ekologicznych. Obecność tego typu informacji genetycznej w niezbędnych replikonach jest zapewne korzystna dla bakterii, może bowiem prowadzić do powstania wysoce wyspecjalizowanych szczepów, znacznie lepiej dostosowanych do specyficznych warunków danego środowiska.

Nie ulega wątpliwości, że chromidy wywierają istotny wpływ na funkcjonowanie i ewolucję genomów bakteryjnych. Mozaikowa struktura chromidów oraz występowanie w nich różnych kombinacji genów chromosomowych i plazmidowych powodują, że replikony te są często postrzegane jako swoiste „poligony doświadczalne", w których „testowane" są różne układy genetyczne, mogące stanowić nowe, korzystne warianty ewolucyjne [1].

7. Podsumowanie

Bakteryjne replikony pozachromosomowe postrzegano dotąd jedynie przez pryzmat plazmidów, uważając, że stanowią one wyłącznie źródło dodatkowej informacji genetycznej, która nie jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania komórek bakteryjnych. Liczne replikony wymykają się jednak definicji plazmidu, bowiem – podobnie jak chromosomy – determinują podstawowe procesy życiowe bakterii. Wskazuje to na potrzebę zmiany definicji plazmidu bądź wprowadzenia nowej klasyfikacji replikonów pozachromosomowych.

Koncepcja chromidu, zaproponowana przez Harrisona i współpracowników [15] przynosi rozwiązanie tego problemu. Utworzenie nowej klasy replikonów

pozwala na włączenie do niej licznych elementów o dualistycznych właściwościach, których tożsamość budziła wcześniej wątpliwości.

Należy podkreślić, że nie jest to jedynie propozycja zmiany nomenklaturowej, ale również zasadnicza zmiana obrazu struktury wielu genomów bakteryjnych. Powraca koncepcja pojedynczego chromosomu i dodatkowych replikonów pozachromosomowych, cechujących się dużą różnorodnością, które dopiero po szczegółowych analizach *in silico* i *in vivo* powinny być zaliczone do grupy chromidów lub plazmidów (Rys. 1).

Postawienie ostrej granicy między plazmidami a chromidami często bywa jednak trudne, a niekiedy wręcz niemożliwe. Istnieją liczne replikony o właściwościach pośrednich, których wkład do ogólnego metabolizmu komórki jest trudny do oszacowania. Dodatkowe problemy wynikają z trudności jednoznacznego zdefiniowania niezbędnej informacji genetycznej, której obecność stanowi podstawę wyróżnienia chromidów pierwszorzędowych [8]. Duże nadzieje należy wiązać z możliwością zastosowania w badaniach wysokoprzepustowych technik mutagenezy transpozonowej (Tn-Seq), które, poprzez analizę nawet setek tysięcy mutantów, umożliwiają wskazanie genów, których mutacja jest w danych warunkach letalna dla komórki [1, 18].

Podziękowania

Praca ta powstała w trakcie realizacji projektu badawczego, mającego na celu analizę struktury i funkcji chromidów bakterii z rodzaju *Paracoccus* (*Alphaproteobacteria*). Projekt ten jest finansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki, przyznanych na podstawie decyzji nr DEC-2013/09/B/NZ1/00133.

Piśmiennictwo

1. Barquist L., Boinett C.J., Cain A.K.: Approaches to querying bacterial genomes with transposon-insertion sequencing. *RNA Biol*. **10**, 1161–1169 (2013)
2. Byram R., Stewart P.E., Rosa P.: The essential nature of the ubiquitous 26-kilobase circular replicon of *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* **186**, 3561–3569 (2004)
3. Cairns J.: The bacterial chromosome and its manner of replication as seen by autoradiography. *J. Mol. Biol.* **6**, 208–213 (1963)
4. Chain P.S., Denef V.J., Konstantinidis K.T., Vergez L.M., Agullo L., Reyes V.L., Hauser L., Cordova M., Gomez L., Gonzalez M. *et al.*: *Burkholderia xenovorans* LB400 harbors a multi-replicon, 9.73-Mbp genome shaped for versatility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 15280–15287 (2006)
5. Chang Y.J., Land M., Hauser L., Chertkov O., Del Rio T.G., Nolan M., Copeland A., Tice H., Cheng J.F., Lucas S. *et al.*: Non-contiguous finished genome sequence and contextual data of the filamentous soil bacterium *Ktedonobacter racemifer* type strain (SOSP1-21). *Stand. Genomic Sci.* **5**, 97–111 (2011)
6. Choudhary M., Zanhua X., Fu Y.X., Kaplan S.: Genome analyses of three strains of *Rhodobacter sphaeroides*: evidence of rapid evolution of chromosome II. *J. Bacteriol.* **189**, 1914–1921 (2007)
7. Cooper V.S., Vohr S.H., Wrocklage S.C., Hatcher P.J.: Why genes evolve faster on secondary chromosomes in bacteria. *PLoS Comput. Biol.* **6**, e1000732 (2010)
8. D'Elia M.A., Pereira M.P., Brown E.D.: Are essential genes really essential? *Trends Microbiol.* **17**, 433–438 (2009)
9. diCenzo G., Milunovic B., Cheng J., Finan T.M.: The tRNAarg gene and engA are essential genes on the 1.7-Mb pSymB megaplasmid of *Sinorhizobium meliloti* and were translocated together from the chromosome in an ancestral strain. *J. Bacteriol.* **195**, 202–212 (2013)
10. Dziewit L., Bartosik D.: Genomy prokariotyczne w świetle analiz genomicznych. *Post. Mikrobiol.* **50**, 87–96 (2011)
11. Dziewit L., Czarnecki J., Prochwicz E., Wibberg D., Schluter A., Puhler A., Bartosik D.: Genome-guided insight into the methylotrophy of *Paracoccus aminophilus* JCM 7686. *Front. Microbiol.* **6**, 852 (2015)
12. Dziewit L., Czarnecki J., Wibberg D., Radlinska M., Mrozek P., Szymczak M., Schluter A., Puhler A., Bartosik D.: Architecture and functions of a multipartite genome of the methylotrophic bacterium *Paracoccus aminophilus* JCM 7686, containing primary and secondary chromids. *BMC Genomics*, **15**, 124 (2014)
13. Egan E.S., Fogel M.A., Waldor M.K.: Divided genomes: negotiating the cell cycle in prokaryotes with multiple chromosomes. *Mol. Microbiol.* **56**, 1129–1138 (2005)
14. Frank O., Goker M., Pradella S., Petersen J.: Ocean's Twelve: flagellar and biofilm chromids in the multipartite genome of *Marinovum algicola* DG898 exemplify functional compartmentalization. *Environ. Microbiol.* **17**, 4019–4034 (2015)
15. Harrison P.W., Lower R.P., Kim N.K., Young J.P.: Introducing the bacterial 'chromid': not a chromosome, not a plasmid. *Trends Microbiol.* **18**, 141–148 (2010)
16. Jacob F., Brenner S.: On the regulation of DNA synthesis in bacteria: the hypothesis of the replicon. *CR Hebd. Seances Acad. Sci.* **256**, 298–300 (1963)
17. Juhas M., Reuss D.R., Zhu B., Commichau F.M.: *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* essential genes and minimal cell factories after one decade of genome engineering. *Microbiology*, **160**, 2341–2351 (2014)
18. Kwon Y.M., Ricke S.C., Mandal R.K.: Transposon sequencing: methods and expanding applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2015)
19. Landeta C., Davalos A., Cevallos M.A., Geiger O., Brom S., Romero D.: Plasmids with a chromosome-like role in rhizobia. *J. Bacteriol.* **193**, 1317–1326 (2011)
20. Lanoil B.D., Ciuffetti L.M., Giovannoni S.J.: The marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* has a complex genome structure composed of two separate genetic units. *Genome Res.* **6**, 1160–1169 (1996)
21. Mackiewicz P., Zakrzewska-Czerwinska J., Zawilak A., Dudek M.R., Cebrat S.: Where does bacterial replication start? Rules for predicting the *oriC* region. *Nucleic Acids Res.* **32**, 3781–3791 (2004)
22. Michaux S., Paillisson J., Carles-Nurit M.J., Bourg G., Allardet-Servent A., Ramuz M.: Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome. *J. Bacteriol.* **175**, 701–705 (1993)
23. Morrow J.D., Cooper V.S.: Evolutionary effects of translocations in bacterial genomes. *Genome Biol. Evol.* **4**, 1256–1262 (2012)
24. Petersen J., Frank O., Goker M., Pradella S.: Extrachromosomal, extraordinary and essential – the plasmids of the *Roseobacter* clade. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 2805–2815 (2013)
25. Poirion O.: Discrimination analytique des génomes bactériens. Rozprawa doktorska. Ecole Centrale de Lyon (2015)

26. Rasmussen T., Jensen R.B., Skovgaard O.: The two chromosomes of *Vibrio cholerae* are initiated at different time points in the cell cycle. *EMBO J.* **26**, 3124–3131 (2007)
27. Schneiker S., Perlova O., Kaiser O., Gerth K., Alici A., Altmeyer M.O., Bartels D., Bekel T., Beyer S., Bode E. *et al.*: Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1281–1289 (2007)
28. Shigenobu S., Watanabe H., Hattori M., Sakaki Y., Ishikawa H.: Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature*, **407**, 81–86 (2000)
29. Slater S.C., Goldman B.S., Goodner B., Setubal J.C., Farrand S.K., Nester E.W., Burr T.J., Banta L., Dickerman A.W., Paulsen I. *et al.*: Genome sequences of three agrobacterium biovars help elucidate the evolution of multichromosome genomes in bacteria. *J. Bacteriol.* **191**, 2501–2511 (2009)
30. Soora M., Tomasch J., Wang H., Michael V., Petersen J., Engelen B., Wagner-Dobler I., Cypionka H.: Oxidative stress and starvation in *Dinoroseobacter shibae*: the role of extrachromosomal elements. *Front. Microbiol.* **6**, 233 (2015)
31. Stasiak G., Mazur A., Wielbo J., Marczak M., Zebracki K., Koper P., Skorupska A.: Functional relationships between plasmids and their significance for metabolism and symbiotic performance of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. *J. Appl. Genet.* **55**, 515–527 (2014)
32. Suwanto A., Kaplan S.: Physical and genetic mapping of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 genome: presence of two unique circular chromosomes. *J. Bacteriol.* **171**, 5850–5859 (1989)
33. Val M.E., Skovgaard O., Ducos-Galand M., Bland M.J., Mazel D.: Genome engineering in *Vibrio cholerae*: a feasible approach to address biological issues. *PLoS Genet.* **8**, e1002472 (2012)
34. Villasenor T., Brom S., Davalos A., Lozano L., Romero D., Los Santos A.G.: Housekeeping genes essential for pantothenate biosynthesis are plasmid-encoded in *Rhizobium etli* and *Rhizobium leguminosarum*. *BMC Microbiol.* **11**, 66 (2011)
35. Xu Q., Dziejman M., Mekalanos J.J.: Determination of the transcriptome of *Vibrio cholerae* during intraintestinal growth and midexponential phase *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 1286–1291 (2003)
36. Zuerner R.L., Herrmann J.L., Saint Girons I.: Comparison of genetic maps for two *Leptospira interrogans* serovars provides evidence for two chromosomes and intraspecies heterogeneity. *J. Bacteriol.* **175**, 5445–5451 (1993)

POST. MIKROBIOL.,
2016, 55, 2, 225–231
http://www.pm.microbiology.pl

MIKROBIOSENSORY BELECZKOWE W MIKROBIOLOGII

Aleksandra Wańczyk[1], Bogdan Łabędź[1], Zenon Rajfur[1]*

[1] Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej, Uniwersytet Jagielloński

Wpłynęło w lipcu 2015 r.
Zaakceptowano w październiku 2015 r.

1. Wstęp. 2. Przystosowanie układu do precyzyjnych pomiarów biologiczno-chemicznych. 3. Zastosowanie mikrobiosensorów beleczkowych w pomiarach biologicznych. 3.1. Mikrobiologia. 3.1.1. Wykrywanie mikroorganizmów. 3.1.2. Określanie masy mikroorganizmów. 3.1.3.Badanie wzrostu mikroorganizmów. 3.2. Proteomika. 3.3. Inne zastosowania mikrobiosensorów beleczkowych. 4. Podsumowanie

Application of cantilever-based microbiosensors in microbiology

Abstract: This paper presents applications of cantilever-based microbiosensors in microbiology and other biological fields. These devices can be employed in a wide range of experiments due to their high sensitivity and capability of performing label-free and real-time measurements. Cantilever-based microbiosensors are employed in a variety of measurements, such as single cell mass, concentration of specific substances, their density and viscosity, fluid flow velocity, heat of reaction or detection of trace amounts of specified substances. All these applications ares possible, because cantilever surface can be specifically functionalized. In the last few years, the cantilever-based microbiosensors have been significantly improved to obtain even higher precision of measurement which allows for their new, unique applications with live biological systems.

1. Introduction. 2. Adaptation of the system for precise bio-chemical measurements. 3. Application of cantilever-based microbiosensors in biological measurements. 3.1. Microbiology. 3.1.1. Detection of microorganisms. 3.1.2. Microorganism mass determination. 3.1.3. Microorganism growth studies. 3.2. Proteomics. 3.3. Other applications of cantilever-based microbiosensors. 4. Summary

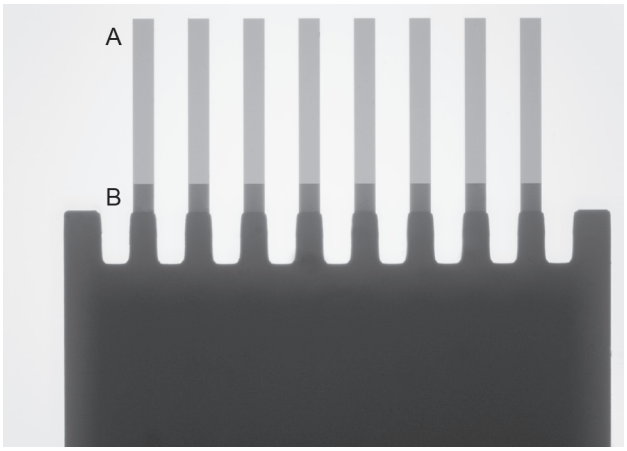
Słowa kluczowe: detekcja oddziaływań biologicznych, MEMS, mikrobiosensor beleczkowy, pomiar masy pojedynczych komórek
Key words: cantilever-based microbiosensors, detection of biological interactions, MEMS, single cell mass measurements

1. Wprowadzenie

W ostatnich latach w naukach biologicznych obserwuje się dynamiczny rozwój nowych metod i urządzeń badawczych, które umożliwiają znaczne poszerzenie dostępnego obszaru badań. Jednym z atrakcyjnych i bardzo obiecujących kierunków jest rozwój przyrządów i materiałów ogólnie zwanych biosensorami. Nazwa ta obejmuje szerokie spektrum narzędzi i metod takich jak: biosensory typu FRET (*Fluorescence*/*Forster Resonance Energy Transfer*), sensory chemiczne, elektryczne, czy nawet mechaniczne, których celem jest przekształcanie sygnału biologicznego w informację elektroniczną, która później może być opracowywana klasycznymi metodami. W pracy tej chcielibyśmy przedstawić zasady działania i zastosowania w badaniach biologicznych biosensorów należących do grupy urządzeń optomechanicznych – mikrobiosensorów beleczkowych. Są to urządzenia, w których sensorem przekształcającym sygnał biologiczny w informację elektroniczną jest elastyczna beleczka o mikrometrowych wymiarach. Wysoka czułość i precyzja tego detektora umożliwia rejestrowanie sygnału na poziomie molekularnym [3, 5]. Pomiary wykorzystujące mikrobiosensory beleczkowe charakteryzują się możliwością wykonywania ich w czasie rzeczywistym, detekcją badanej substancji w bardzo małej koncentracji oraz możliwością pracy zarówno w środowisku ciekłym, gazowym, jak i w próżni [34, 35]. Ważną ich zaletą jest brak konieczności stosowania znaczników fluorescencyjnych i radioaktywnych (*label-free measurements*) w badanych substancjach.

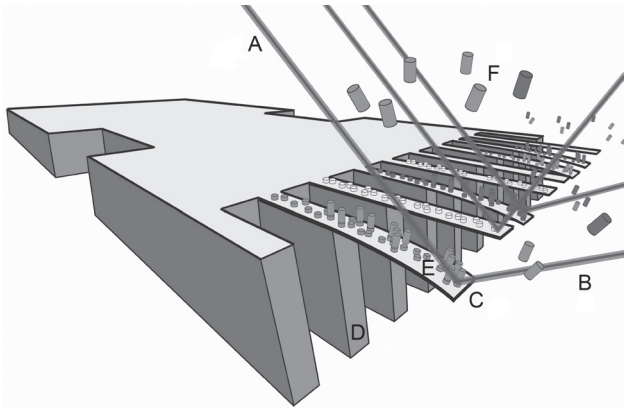
Pierwsze prace opisujące zastosowanie mikrobiosensorów beleczkowych do pomiarów adsorpcji molekuł powstały już przed 1970 r. [45], jednak dopiero w ostatnich kilkunastu latach wykorzystanie potencjału tej metody stało się możliwe dzięki postępom w miniaturyzacji sensorów oraz rozwojowi elektroniki pomiarowej. Podstawowym elementem mikrobiosensorów beleczkowych (Rys. 1) jest beleczka o wymiarach mikrometrowych, zazwyczaj unieruchomiona na jednym jej końcu poprzez wspornik. Współcześnie w pomiarach stosuje się zestawy beleczek zawierające od 2 do 8 osobnych beleczek. Działanie mikrobiosensorów beleczkowych

* Autor korespondencyjny: Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej, Uniwersytet Jagielloński, ul. prof. Stanisława Łojasiewicza 11, 30-348 Kraków; e-mail: zenon.rajfur@uj.edu.pl



Rys. 1. Zdjęcie zestawu beleczek. W skład sensora wchodzi osiem beleczek (A) opartych na wspornikach (B). Cały sensor jest wykonany z krzemu

opiera się na wykorzystaniu efektu wygięcia beleczki (statyczny tryb pracy sensora) bądź na zmianie częstotliwości jej drgań własnych (tryb dynamiczny) w odpowiedzi na działanie zewnętrznego bodźca [3] (Rysunek 2). Ważnym elementem przygotowania próbki do pomiarów w modzie statycznym jest chemiczne rozróżnienie stron beleczki. Takiego rozróżnienia dokonuje się dzięki odpowiedniej procedurze funkcjonalizacji chemicznej powierzchni beleczki z obu jej stron. W wyniku interakcji różnie sfunkcjonalizowanych stron beleczki z bodźcem chemicznym lub biologicznym powstają rozróżnialne naprężenia powierzchniowe. Różnica pomiędzy tymi naprężeniami powoduje wygięcie beleczki (Rysunek 2) [3]. Amplituda wygięcia jest proporcjonalna do wielkości działającego bodźca (Równanie 1). Zmiana naprężenia na powierzchni beleczki może nastąpić



Rys. 2. Schemat mikrobiosensorów beleczkowych. Zestaw ośmiu beleczek (C) jest osadzony na wspornikach (D). Wiązka światła laserowego (A) odbija się od powierzchni beleczki, a odbite światło (B) jest rejestrowane na detektorze pozycyjnym. Powierzchnia beleczki jest sfunkcjonalizowana – pokryta receptorami zaznaczonymi schematycznie jako niskie walce (E) wiążące specyficznie substancję zaznaczoną tutaj jako wysokie walce (F) danego koloru. W zależności od stężenia badanej substancji następuje proporcjonalne wygięcie beleczek, co zostało pokazane na rysunku.

wskutek zjawiska adsorpcji molekuł (np. adsorpcja DNA) lub wskutek zmian oddziaływań w zaadsorbowanych już molekułach (np. hybrydyzacja DNA, zmiany konformacyjne białka) [19].

$$\Delta z = \frac{3(1-\nu)L^2}{Et^2}\Delta\sigma \tag{1}$$

Δ_z jest wychyleniem końca beleczki z położenia równowagi; $\Delta\sigma$ jest powstałą różnicą naprężeń powierzchniowych między obiema stronami beleczki; υ i E to odpowiednio współczynnik Poissona oraz moduł Younga charakteryzujące materiał z którego wykonana jest beleczka; L i t oznaczają długość i grubość beleczki [50].

Przeprowadzanie pomiarów w trybie dynamicznym wymaga wzbudzenia drgań w beleczce. Mierząc amplitudę drgań beleczki określa się kształt i położenie krzywej rezonansowej w domenie częstotliwości charakterystycznej dla beleczki. Parametry te zależą od właściwości beleczki (takich jak masa i moduł Younga [18, 22]) oraz od właściwości ośrodka otaczającego beleczki (jak gęstość i lepkość [40]). Jeśli dokonuje się pomiarów w stabilnym środowisku, to obserwowana zmiana częstotliwości rezonansowej drgań beleczki wynika ze zmiany jej masy efektywnej następującej wskutek adsorpcji molekuł o znaczącej masie (np. adsorpcja komórki) lub zmian masy zaadsorbowanej substancji na jej powierzchni (np. wzrost komórki) (Równanie 2). Tryb dynamiczny wykorzystywany jest głównie w pomiarach masy [18, 22], ale także w wyznaczaniu gęstości i lepkości ośrodka [40], prędkości przepływu [10, 11], czy analizie krzywych adsorpcji i desorpcji [13, 32].

$$\Delta m = \frac{\lambda_n^4 k}{4\pi^2}\left(\frac{1}{f_1^2}-\frac{1}{f_0^2}\right) \tag{2}$$

λ_n jest stałą charakterystyczną dla danego modu drgań; k to stała sprężystości beleczki zależna od wymiarów beleczki oraz materiału z którego jest wykonana; f_0 and f_1 to odpowiednio częstotliwość rezonansowa drgań beleczki przed i po adsorpcji molekuł [24].

2. Przystosowanie układu do precyzyjnych pomiarów biologiczno-chemicznych

Dążenie do uzyskania dużej czułości sensorów wywołało rozwój metod detekcji oraz sposobów wzbudzenia drgań beleczki. Oprócz tego pojawiły się także prace opisujące modyfikacje warunków pomiaru zwiększające czułość układu sensorów beleczkowych.

Podstawową metodą odczytu zmiany wychylenia końca beleczki, zaczerpniętą z mikroskopii sił atomowych (*Atomic Force Microscopy*), jest metoda optyczna. Światło lasera pada na koniec beleczki i po odbiciu od

beleczki pada na detektor pozycyjny [6]. Elektronicznie przetworzony sygnał z detektora jest miarą wielkości wygięcia beleczki lub częstotliwości jej drgań. Kolejną metodą odczytu stosowaną w sensorach mikrobeleczkowych jest użycie beleczek jako czujników piezorezystancyjnych, gdzie wykorzystywany jest efekt zmiany rezystancji materiału pod wpływem jego ugięcia [21, 43]. Na podobnym efekcie oparte jest wykorzystanie analizatora impedancji do pomiaru wygięcia beleczki [23, 37]. Taki system detekcji sygnału jest tańszy i prostszy niż optyczny, jednak piezorezystor zajmuje zmaczną część beleczki. Alternatywnym rozwiązaniem są beleczki oparte na transduktorze MOS (*Metal-Oxide-Semiconductor*), który zajmuje miejsce tylko przy wsporniku beleczki [43].

W pomiarach w trybie dynamicznym wykorzystuje się element wzbudzający beleczkę do drgań. Powszechnie stosowany jest materiał piezoelektryczny – pod wpływem doprowadzonego do niego prądu zmiennego następuje jego okresowe odkształcanie [23, 37]. Powstałe wibracje są przekazywane na beleczkę wzbudzając ją do drgań. Możliwe jest także wzbudzanie drgań beleczki poprzez elektrotermiczne dostarczanie ciepła do beleczki [48] albo przez oświetlanie laserem (fototermicznie) [41].

Największą trudność w badaniach biologicznych z wykorzystaniem mikrobiosensorów beleczkowych stanowi znaczące tłumienie oscylacji beleczki przez ośrodek ją otaczający (zazwyczaj ciecz). W pracy [41] zaprezentowano modyfikację, która pozwala znacznie zwiększyć czułość tej metody. W metodzie tej beleczki wzbudzane są do drgań w płaszczyźnie poziomej, przez co zmniejsza się tłumienie – podczas drgań beleczka zamiast ściskać ośrodek, raczej „przecina" go. Także nowy typ beleczek tzw. SMR (*Suspended Micro-channel Resonator*) może znaleźć szerokie zastosowanie w biologii komórki [4, 15]. Innym sposobem jest umieszczenie beleczki w próżni, co zapewnia bardzo wysoką czułość metody. W tym przypadku w beleczce jest utworzony kanał, przez który przepływa ciecz zawierająca badane obiekty. Ciągły w czasie pomiar częstotliwości rezonansowej beleczki pozwala na bardzo szybkie zmierzenie masy całej populacji komórek lub pomiar masy pojedynczej komórki w czasie wraz ze śledzeniem fazy cyklu komórkowego, w której się ona znajduje.

3. Zastosowanie mikrobiosensorów beleczkowych w pomiarach biologicznych

3.1. Mikrobiologia

Niski próg detekcyjny, kontrola pomiaru w czasie rzeczywistym i wysoka specyficzność odpowiedzi [34, 35] stanowią o dużym potencjale mikrobiosensorów beleczkowych w badaniach mikrobiologicznych. Mikrobiosensory beleczkowe mogą być stosowane zarówno do samej detekcji [7, 8, 25, 26, 28, 33, 46], jak i do określania parametrów biologicznych takich jak masa [18, 22], tempo wzrostu [30, 34–35] czy dynamika metabolizmu badanych drobnoustrojów. Obiektem badań są głównie organizmy modelowe takie jak *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* czy *Saccharomyces cerevisiae*. Co więcej, w niektórych pracach pokazano, że czułość mikrobiosensorów beleczkowych umożliwia detekcję na poziomie wirusów czy prionów [8, 46].

Wykrywanie drobnoustrojów

Wysoka czułość mikrobiosensora beleczkowego umożliwia mierzenie niskiej koncentracji patogenów, a w związku z tym – wczesne ich wykrycie. Z kolei odpowiednia funkcjonalizacja zapewnia specyficzność detekcji sensora.

W pracy [7] wykazano możliwość detekcji komórek *E. coli* w bardzo niskiej koncentracji za pomocą mikrobiosensora. Beleczkę sfunkcjonalizowano przeciwciałami monoklonalnymi *anty-E. coli O157:H7* i zanurzono w zawiesinie patogenu (od 70 do 70 milionów komórek na mililitr w kolejnych próbach). Wykazano, że możliwa jest detekcja *E. coli* nawet w ilości 700 komórek/ml. Dla porównania we wcześniejszych pracach z wykorzystaniem mikrobiosensora beleczkowego *E. coli* wykrywano w liczbie od 100 tysięcy do 10 milionów CFU/ml (*Colony Forming Unit per milliliter*) [49].

Detekcję wirionów *WSSV (Whitespot Syndrome Baculovirus)* za pomocą mikrobiosensora beleczkowego opisano w pracy [8]. Beleczki sfunkcjonalizowane przeciwciałami *anty-VP28* umieszczano w zawiesinie od 50 do 100 tysięcy wirionów/ml. Najniższą wykrywalną koncentrację określono jako 100 wirionów/ml. Analogicznie przeprowadzono detekcję nukleokapsydów wirusa WSSV, otrzymując podobną czułość sensora. Stwierdzono, że ta metoda dorównuje czułością metodzie reakcji łańcuchowej polimerazy (*polymerase chain reaction*) i zapewnia wykonanie równie szybkich pomiarów (poniżej 30 minut) *in situ* [8].

W pracy [46] wykazano, że możliwa jest również detekcja białka prionowego. Aby zwiększyć czułość sensora, pomiar w trybie dynamicznym wykonano w próżni. W tym celu unieruchomiono białko prionowe metodą „kanapki" (*sandwich assay*) między dwiema warstwami przeciwciał monoklonalnych. Częstotliwość rezonansową układu wyznaczano po każdym kroku pomiaru, tj. po ekspozycji na warstwę przeciwciał pierwszorzędowych, następnie na białka prionowe oraz na zawiesinę przeciwciał drugorzędowych. Wykazano, że częstotliwość rezonansowa maleje z każdym krokiem, co oznacza skuteczną adsorpcję kolejnych warstw. W ten sposób wykazano możliwość detekcji białek prionowych w ilości 2 μg/ml. Następnie

przez adsorpcję znacznika o większej masie – nanocząstek silikonowych – wykazano, że czułość detekcji białek prionowych za pomocą mikrobiosensora beleczkowego może osiągnąć nawet wartość 2 ng/ml.

Możliwa jest również pośrednia metoda wykrywania patogenów, jak na przykład detekcja glikoproteiny ludzkiego wirusa niedoboru odporności (HIV-1) [28], czy wykrywanie wirusa *Vibrio cholerae O1* [26] oraz sinic *Microcystis aeruginosa* [25] poprzez detekcję DNA. Polska grupa badawcza wykazała możliwość specyficznej detekcji endotoksyn bakterii gram ujemnych *Hafnia alvei* PCM 1185 oraz PCM 1186 za pomocą beleczki sfunkcjonalizowanej odpowiednimi przeciwciałami [33].

Określanie masy drobnoustrojów

Masa jest jednym z istotnych parametrów charakteryzującym stan i właściwości komórek. Mikrobiosensor beleczkowy pracujący w trybie dynamicznym pozwala na precyzyjne określenie zmian masy efektywnej beleczki po adsorpcji molekuł, co zostało wykorzystane w wyznaczaniu masy drobnoustrojów, w tym także pojedynczych komórek.

W 2001 roku Ilic i wsp. [22] za pomocą mikrobiosensora beleczkowego określili, że sucha masa komórki *E. coli* wynosi 665 fg. Pomiar wykonano w trybie dynamicznym, unieruchamiając na beleczce – za pomocą funkcjonalizacji przeciwciałami *anty-E. coli O157:H7*-inaktywowane termicznie komórki. W kolejnych pomiarach wykazano liniową zależność zmiany częstotliwości rezonansowej beleczki w funkcji liczby zaadsorbowanych komórek – w tym także pojedynczej komórki. Natomiast w pracy [32] wyznaczono średnią masę wirusa ospy jako 9,5 fg. Wyznaczono także liniową zależność zmiany częstotliwości rezonansowej drgań beleczki w funkcji liczby zaadsorbowanych wirusów. Podobnie jak w pracy [22] potwierdzono zmianę częstotliwości rezonansowej drgań beleczki w wyniku adsorpcji pojedynczego wirusa.

Badanie wzrostu drobnoustrojów

Ocena żywotności drobnoustrojów jest jednym z zadań zarówno diagnostyki medycznej oraz rolniczej, jak i monitorowania jakości żywności i wody. W poniżej przedstawionych pracach pokazano, że mikrobiosensory beleczkowe są doskonałym narzędziem do określania żywotności oraz dynamiki wzrostu organizmów.

W 2004 roku Gfeller, Nugaeva i Hegner [13] zaprezentowali możliwość szybkiej detekcji wzrostu *E. coli XL1-Blue* za pomocą mikrobiosensora beleczkowego. Sensor umożliwia detekcję aktywnego wzrostu komórek *E. coli* w czasie 1 godziny oraz selektywnej detekcji wzrostu antybiotyko-opornych komórek w czasie 2 godzin. Komórki umieszczono na beleczce z agarem (grupa 1), agarem i antybiotykiem – 10 ug/ml *kanamycyny* – hamującym wzrost *E. coli XL1-Blue* (grupa 2) oraz agarem i antybiotykiem – 10 ug/ ml *tetracyklina* – wobec którego *E. coli XL1-Blue* wykazuje oporność (grupa 3). Pomiary wykonywano w środowisku gazowym (powietrze, 37°C, 93% RH). Zaobserwowane zmiany częstotliwości rezonansowej drgań beleczki dla grupy 1 i 3 – a tym samym zmiany masy kolonii – zostały przybliżone modelem Gompertz'a. Zaobserwowano: okres adaptacyjny, okres wzrostu eksponencjalnego – obserwowany już po 1 lub 2 godzinach pomiaru odpowiednio dla grupy pierwszej i trzeciej oraz fazę stacjonarną. Wspomagając pomiar obserwacją komórek na beleczce za pomocą elektronowego mikroskopu skaningowego oceniono wzrost liczby komórek z 1000 do 8000. Dla grupy 2 nie zaobserwowano zmiany częstotliwości rezonansowej ani liczby komórek.

Drożdże *A. niger* i *S. cerevisiae* są łatwe w hodowli i odpowiadają ludzkim patogenom *Candida Albicans* i *Aspergillus fumigatus* [34]. Za pomocą mikrobiosensora beleczkowego dokonano pomiaru wzrostu komórek *A. niger* i *S. cerevisiae* w trakcie 4 godzin (96–97% RH, 27°C) [35], co daje dziesięć razy szybszą detekcję wzrostu niż w standardowych metodach [34]. W pracy [34] wykorzystując tryb dynamiczny sensora zaobserwowano pączkowanie drożdży oraz rozwój grzybni *A. niger*, co następnie potwierdzono za pomocą zdjęć mikroskopowych. Wyznaczono także masę pojedynczej komórki *S. cerevisiae* jako 69 pg i pojedynczego zarodnika *A. niger* jako 47 pg. Porównano także immobilizację na beleczkach tych drobnoustrojów za pośrednictwem białek konkanawaliny, fibronektyny i immunoglobuliny G. Wykazano, że immunoglobulina G zapewnia maksymalną immobilizację zarodników, rozwój i wzrost grzybni. W pracy [30] potwierdzono możliwość szybkiej detekcji wzrostu *A. niger* (4 godziny). Wykazano także, że podczas gdy masa pojedynczego zarodnika na początku pomiaru wynosi ok. 34 pg, tuż przed podziałem osiąga 270 pg. Wyznaczono prędkość wzrostu grzybni jako 9 μm/h.

3.2. Proteomika

Wśród najważniejszych makromolekuł występujących w żywych komórkach wyróżniamy białka oraz kwasy nukleinowe [20]. Kontrola aktywności białek jest jednym z najważniejszych zagadnień dotyczących wielu dziedzin biologii (np. proteomika) czy medycyny (np. stosowanie leków). Aktywność białek zależy od ich konformacji, która może ulegać zmianie pod wpływem zmian środowiska, takich jak pH, temperatura, czy pojawienie się wiążącego ligandu. Mikrosensory beleczkowe umożliwiają obserwację zmian konformacyjnych białka w czasie rzeczywistym [1]. W pracy Gruber'a i wsp. [17] zbadano za pomocą sensorów beleczkowych odpowiedź enzymu ludzkiego topoizo-

merazy II na różne ligandy. Stwierdzono korelację między ilością ATP a szybkością zmian konformacyjnych badanego enzymu. Na podstawie otrzymanych wyników stworzono model opisujący ten proces oraz pokazano działanie aklarubicyny – leku przeciwrakowego jako inhibitora zmian konformacyjnych w topoizomerazie II.

Sensory mikrobeleczkowe ze względu na swoją wysoką czułość znajdują także szerokie zastosowanie w medycynie, głównie do wykrywania markerów danej choroby. W tym celu ważne jest właściwe sfunkcjonalizowanie beleczki, aby specyficznie wykrywała poszukiwane markery. Najczęściej stosuje się wiązania antygen-przeciwciało [16]. Między innymi możliwe jest wykrycie swoistych antygenów prostaty oraz białek C-reaktywnych, które są specyficznymi markerami raka prostaty oraz choroby serca [44], czy przeciwciał wiążących specyficznie antygen tuberkulozy w celu wykrycia tej choroby [39].

Sensory beleczkowe mogą być także wykorzystane do badania węglowodanów i ich oddziaływań z białkami. Przykładem jest stosowanie tychże sensorów do wykrycia wiązań pomiędzy mannozydazą a białkiem Cyanovirin-N, które wiąże i blokuje ludzki wirus niedoboru odporności (HIV) [17]. Stwierdzono także możliwość wykrycia białek wiążących węglowodany w stężeniach rzędu pikomoli.

Ważną zaletą mikrobiosensorów beleczkowych z punktu widzenia biologii jest możliwość badania interakcji pomiędzy białkami a kwasami nukleinowymi. Wiele procesów metabolicznych takich jak naprawa DNA, replikacja, transkrypcja czy translacja jest od tego zależna. Głównym białkiem biorącym udział w tych procesach jest białko wiążące jednoniciowe DNA (*single-stranded DNA-binding protein*). Mikrobiosensory beleczkowe pozwalają na wykrycie śladowych ilości tego białka bez znakowania fluorescencyjnego badanej substancji [20].

W wielu badaniach wykorzystuje się sensory mikrobeleczkowe do rozpoznawania sekwencji DNA ze względu na ich wysoką czułość [6]. W pracy [50] analizie poddano konformacje jednoniciowego DNA (ssDNA), a tym samym powinowactwo do sfunkcjonalizowanej beleczki ze względu na różne warunki, takie jak gęstość pokrycia powierzchni czy zmienne pH. Pomiary pojedynczych nici DNA wiążą się jednak z niepożądanymi reakcjami krzyżowymi z białkami lub fragmentami nie docelowych nici DNA. Wykrywanie stabilniejszej podwójnej nici DNA daje dokładniejsze rezultaty. Obecnie istniejące metody polegają na pomiarze masy poszczególnych fragmentów nici DNA, jednak wymagane jest porównanie ich do wzorca. W ostatnich latach wykorzystano sensor beleczkowy do tego typu pomiarów [49]. Wykorzystano tryb dynamiczny do pomiaru masy całej nici DNA, a następnie wprowadzono enzym, który przecina nić DNA w określonym stosunku długości (a także masy fragmentów). Proces ten jest mierzony w czasie rzeczywistym i możliwe jest obliczenie zmiany masy, dzięki czemu nie jest konieczne porównywanie wyników do wzorca.

3.3. Inne zastosowania mikrobiosensorów beleczkowych

Główną zaletą sensorów mikrobeleczkowych w zastosowaniach fizycznych jest możliwość wykrycia obecności poszukiwanej substancji w bardzo małych stężeniach. Wykorzystywane jest to w wielu dziedzinach nauki takich jak meteorologia, kontrola środowiska, a także w działaniach antyterrorystycznych [36]. W celu wykrycia obecności substancji stosowane są głównie metody chromatografii, spektroskopii masowej czy też spektroskopii ruchliwości jonów. Metody te jednak wiążą się z dużymi kosztami, skomplikowanym przygotowaniem próbki lub długim czasem pomiaru [39]. Sensory mikrobeleczkowe pozwalają na szybki i czuły pomiar w czasie rzeczywistym, wolny od znaczników próbek [50, 20].

Zastosowanie wysokiej czułości sensorów mikrobeleczkowych pokazano w pomiarach w środowisku ciekłym. Jak przedstawiono w pracy [42], beleczka pokryta sfunkcjonalizowaną wiązaniami tiolowymi mezoporowatą krzemionką wykrywa jony Hg+ z czułością 100 ppb. Natomiast w pracy [9] wykorzystano białko AgNt84-6 wiążące specyficznie jony metali do detekcji Ni^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+} oraz Cd^{2+}. Zademonstrowano także możliwość wykrywania innych związków chemicznych z wykorzystaniem tej metody [2].

Potwierdzono także zdolność do wykrywania małych stężeń przez sensory beleczkowe w gazach. W pracy [37] rozróżniono stosunek składników mieszaniny helu, argonu i azotu za pomocą sensora mikrobeleczkowego. Idea pomiaru opiera się na zmianie częstości rezonansowej drgającej beleczki między środowiskami o różnej gęstości. Możliwe jest wykrycie różnicy gęstości ośrodka gazowego z dokładnością do 88 mg/l (czułość 49 mg/Hz). Podczas analizy środowiska gazowego za pomocą sensora możliwe jest także określenie wilgotności lokalnej [2].

Ponadto sensory mikrobeleczkowe są wykorzystywane do wykrywania oparów substancji chemicznych. W pracy [43] zaobserwowano powstawanie wygięcia beleczki w wyniku chemisorpcji oparów acetonu, etanolu, nitroetanolu oraz wody do beleczki sensora. Analizując wygięcie beleczki w czasie rozróżniano adsorbowane substancje. Pomiary tego typu mogą przyczynić się do zrozumienia mechanizmów chemisorpcji różnych substancji. Sensory beleczkowe mają także zastosowanie do wykrywania niebezpiecznych substancji oraz materiałów wybuchowych [39]. Aby zwiększyć czułość wykrycia oparów badanej substancji,

często stosuje się pokrycia beleczek powłokami polimerowymi lub warstwami samoorganizującymi (*self--assembled monolayers – SAMs*) [31].

Sensory mikrobeleczkowe znalazły także zastosowania w kalorymetrii ze względu na dużą czułość temperaturową (efekt bimetaliczny). Dzięki temu zjawisku w pracy [27] badano przebieg reakcji chemicznych zachodzących na ich powierzchni i wyznaczono ciepło tej reakcji z dokładnością do 15 fJ. Możliwe jest także wyznaczenie temperatury lokalnej z dokładnością do 10 μ°C dla temperatury 27°C [14]. We współczesnych badaniach rozwinięto tę metodę poprzez wykorzystanie struktur Janusa jako nanostudni na powierzchni beleczki. Taka konstrukcja pozwala na pomiar kalorymetryczny bez wykorzystywania efektu bimetalicznego [29].

Oprócz tego opisano także wykorzystanie sensorów mikrobeleczkowych do pomiarów przepływu i kierunku wiatru [10], gdzie otrzymano wysoką czułość (60 μV/(m/s)) dla wysokiej szybkości wiatru (18 m/s), czy też do pomiarów zmian gęstości ośrodka z dokładnością do 2 mg/l [11].

Sensory mikrobeleczkowe w pomiarach fizycznych oraz chemicznych zyskały tak szerokie zastosowanie głównie dzięki możliwości szybkiego i taniego wykrycia bardzo małych stężeń substancji. Mikrometrowe rozmiary beleczek pozwalają na zmniejszenie wymiarów i wagi aparatury, co w przyszłości może pozwolić na zbudowanie przenośnych sensorów o wysokiej czułości.

4. Podsumowanie

Sensory mikrobeleczkowe mają zastosowanie w wielu dziedzinach nauki ze względu na wysoką czułość, brak konieczności znakowania badanej substancji znacznikami radioaktywnymi czy fluorescencyjnymi, a także możliwość pomiaru w czasie rzeczywistym. Służą do pomiarów takich wielkości jak masa obiektów, stężenie badanej substancji, prędkość przepływu płynu, gęstość, lepkość i skład ośrodka, w którym znajduje się sensor, a także pomiaru ciepła reakcji czy wykrywania śladowych ilości substancji. Dzięki funkcjonalizacji beleczek możliwa jest także wysoka specyficzność odpowiedzi przy jednoczesnej różnorodności zastosowań.

Z powodu powyższych zalet sensory mikrobeleczkowe zyskały szczególne miejsce w badaniach biologicznych, głównie w mikrobiologii. Dzięki nim możliwy stał się pomiar w czasie rzeczywistym zmian masy żywych układów biologicznych na poziomie pojedynczej komórki. Metoda ta może być wykorzystana nie tylko do analizy dynamiki wzrostu układów biologicznych, ale również ich odpowiedzi biologicznej na czynniki zewnętrze, takie jak podawane leki czy zmiany środowiskowe. Dodatkowo możliwość detekcji śladowych ilości patogenów w niekosztowny i szybki sposób może być wykorzystywana w diagnostyce medycznej we wczesnym diagnozowaniu chorób.

W ostatnich latach pojawiły się prace rozwijające układ pomiarowy w kierunku uzyskania lepszej precyzji pomiaru oraz uzyskania przez sensor nowych, unikalnych zastosowań. Świadczy to o jeszcze nie odkrytych możliwościach tego typu sensora, szczególnie w pomiarach biologicznych. W ciągu kolejnych lat można się spodziewać także dalszej miniaturyzacji sensora – możliwość wykrycia śladowych ilości substancji w czasie rzeczywistym za pomocą kompaktowego sensora staje się coraz bardziej realna.

Piśmiennictwo

1. Alonso-Sarduy L., De Los Rios P., Benedetti F., Vobornik D., Dietler G.: Real-Time Monitoring of Protein Conformational Changes Using a Nano-Mechanical Sensor. *PLoS ONE*, **9**, e103674 (2014)
2. Boisen A., Thaysen J., Jensenius H., Hansen O.: Environmental sensors based on micromachined cantilevers with integrated read-out. *Ultramicroscopy*, **82**, 11–16 (2000)
3. Boisen A., Dohn S., Keller S.S., Schmid S., Tenje M.: Cantilever--like micromechanical sensors. *Rep. Prog. Phys*. **74**, 1–30 (2011)
4. Bryan A. K., Goranov A., Amon A. Manalis S. R.: Measurement of mass, density, and volume during the cell cycle of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 999–1004 (2010)
5. Burg T.P., Godin M., Knudsen S.M., Shen W., Carlson G., Foster J.S., Babcock K., Manalis S.R.: Weighing of biomolecules, single cells and single nanoparticles in fluid. *Nature*, **446**, 1066–1070 (2007)
6. Calleja M., Nordstro M., lvarez M. A, Tamayo J., LechugaL. M., Boisen A.: Highly sensitive polymer-based cantilever-sensors for DNA detection. *Ultramicroscopy*, **105**, 215–222(2005)
7. Campbell G.A., Mutharasan R.: *Escherichia coli* O157:H7 Detection Limit of Millimeter-Sized PZT Cantilever Sensors is 700 Cells/mL. *Anal. Sci.* **21**, 355–357 (2007)
8. Capobiano J.A., Shih W.H., Leu J.H., Lo G.C.F., Shih W.Y.: Label free detection of white spot syndrome virus using lead magnesium niobate-lead titanate piezoelectric microcantilever sensors. *Biosens. Bioelectron*. **26**, 964–969 (2010)
9. Cherian S., Gupta R. K., Mullin B. C., Thundat T.: Detection of heavy metal ions using protein-functionalized microcantilever sensors. *Biosens. Bioelectron*. **19**, 411–416(2003)
10. Du L., Zhao Z., Fang Z.: Drag force micro solid state silicon plate wind velocity sensor. Sens. *Actuator A-Phys.* **151**, 35–41(2009)
11. Du L., Zhao Z., Fang Z.: A micro-wind sensor based on mechanical drag and thermal effects. *Sens. Actuator A-Phys.* **155**, 66–72 (2009)
12. Ferrari M.C., Piccinini E., Baschetti M.G., Doghieri F., Sarti G.: Solvent-Induced Stresses during Sorption in Glassy Polycarbonate: Experimental Analysis and Model Simulation for a Novel Bending Cantilever Apparatus. *Ind. Eng. Chem. Res.* **47**, 1071–1080 (2008)
13. Gfeller K.Y., Nugaeva N., Hegner M.: Rapid Biosensor for Detection of Antibiotic-Selective Growth of Escherichia coli. *Appl. Environ. Microbiol*. **71**, 2626–2631 (2005)
14. Gimzewski J.K., Gerber Ch., Meyer E., Schlittler R.R.: Observation of a chemical reaction using a micromechanical sensor. *Chem. Phys. Lett*. **217**, 589–594 (1994)

15. Godin M., Delgado F.F., Son S., Grover W.H., Bryan A.K., Tzur A., Jorgensen P., Payer K., Grossman A.D., Kirschner M.W., Manalis S.R.: Using buoyant mass to measure the growth of single cells. *Nat. Methods.* **7**, 387–390 (2010)
16. Gopinath P.G., Anitha V.R., Mastani S.A.: Microcantilever based Biosensor for Disease Detection Applications. *J. Med. Biol. Eng.* **4**, 307–311, (2015)
17. Gruber K., Horlacher T., Castelli R., Mader A., Seeberger P.H., Hermann B.A.: Cantilever Array Sensors Detect Specific Carbohydrate-Protein Interactions with Picomolar Sensitivity. ACS Nano, **5**, 3670–3678 (2011)
18. Gupta A., Akin D., Bashir R.: Single virus particle mass detection using microresonators with nanoscale thickness. *Appl. Phys. Lett.* **11**, 1976–1978 (2004)
19. Hansen K.M., Ji H.F., Wu G., Datar R., Cote R., Majumdar A., Thundat T.: Cantilever-Based Optical Deflection Assay for Discrimination od DNA Single-Nucleotide Mismatches. *Anal. Chem.* **73**, 1567–1571 (2001)
20. Hou H., Bai X., Xing Ch., Lu B., Hao J., Ke X., Gu N., Zhang B., Tang J.: Label-free detection of single-stranded DNA binding protein based on a cantilever array. *Talanta,* **109**, 173–176 (2013)
21. Hyun S.J. Kim H.S., Kim Y.J., Jung H.I.: Mechanical detection of liposomes using piezoresistive cantilever. *Sens. Actuators B Chem.* **117**, 415–419(2006)
22. Ilic B., Czaplewski D., Zalalutdinov M., Craighead H.G., Neuzil P., Campangolo C., Batt C.: Single cell detection with micromechanical oscillators. *J. Vac. Sci. Technol. B* **19**, 2825–2828 (2001)
23. Johnson B. N., Mutharasan R.L: The origin of low-order and high-order impedance-coupled resonant modes in piezoelectric-excited millimeter-sized cantilever (PEMC) sensors: Experiments and finite element models. *Sens. Actuators B*, **155**, 868–877 (2011)
24. Johnson B.N., Mutharasan R.: Biosensing using dynamic-mode cantilever sensors: A review. *Biosens. Bioelectron.* **32**, 1–18 (2012)
25. Johnson B.N., Mutharasan R.: A Cantilever biosensor-Based Assay for Toxin-Producing Cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* using 16S rRNA. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 12333–12341 (2013)
26. Khemthongcharoen N., Wonglumsom W., Suppat A., Jaruwongrungsee K., Tuantranont A., Promptmas Ch.: Piezoresistive microcantilever-based DNA sensor for sensitive detection of pathogenic *Vibrio cholerae* O1 in food sample. *Biosens. Bioelectron.* **63**, 347–353 (2015)
27. Lai J., Perazzo T., Shi Z., Majumdar A.: Optimization and performance of high-resolution micro-optomechanical thermal sensors. *Sens. Actuators A,* **58**, 113–119 (1997)
28. Lam Y., Abu-Lail N.I., Alam M.S.: Zauscher S., Using microcantilever deflection to detect HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *Nanomedicine: NBM*, **2**, 222–229 (2006)
29. Lee D., Kim S., Chae I.: Nanowell-patterned TiO_2 microcantilevers for calorimetric chemical sensing. *Appl. Phys. Lett.* **104**, 141903 (2014)
30. Maloney N., Lukacs G., Jensen J., Hegner M.: Nanomechanical sensors for single microbial cell growth monitoring. *Nanoscale*, **6**, 8242–8250 (2014)
31. McCaig H.C., Myers E., Lewis N.S.: Vapor Sensing Characteristics of Nanoelectromechanical Chemical Sensors Functionalized Using Surface-Initiated Polymerization. *Nano Lett.* **14**, 3728–3732 (2014)
32. Mochev B., Filenko D., Nikolov N., Popov C., Ivano T., Petkov P., Rangelow I.W.: Investigation of the sorption properties of thin Ge-S-AgI films deposited on cantilever-based gas sensor. *Appl. Phys. A*, **87**, 31–36 (2007)
33. Nieradka K., Kapczyńska K., Rybka J., Lipiński T., Grabiec P., Skowicki M., Gotszalk T.: Microcantilever array biosensors for detection and recognition of Gram-negative bacterial endotoxins. *Sens. Actuators B*, **198**, 114–124 (2014)
34. Nugaeva N., Gfeller K.Y., Backman N., Lang H.P., Duggelin M., Hegner M.: Micromechanical cantilever array sensors for selective fungal immobilization and fast growth detection. *Biosen. Bioelectron*. **21**, 849–856 (2005)
35. Nugaeva N., Gfeller K.Y., Backmann N., Duggelin M., Lang H.P., Guntherodt H.J., Hegner M.: An Antibody-Sensitized Microfabricated Cantilever for the Growth Detection of *Aspergillus niger* Spores. *Microsc. Microanal*. **13**, 13–17 (2007)
36. Pinnaduwage L., JiH. F., Thundat T.: Moore's law in homeland defense: an integrated sensor platform based on silicon microcantilevers. *IEEE Sens. J*. **5**,774–785 (2005)
37. Rosario R., Mutharasan R.: Piezoelectric excited millimeter sized cantilever sensors for measuring gas density changes. *Sens. Actuator B*, **192**, 99–104(2014)
38. Sangeetha P., Juliet A.V.: Biosensor for Tuberculosis detection using MEMS device. *3rd International Conference on Electronics, Biomedical Engineering and its Applications (ICEBEA'2013*), 52–56 (2013)
39. Senesac L., Thundat T.G.: Nanosensors for trace explosive detection. *Materials Today*, **11**, 28–36 (2008)
40. Shih W.Y., Li X., Gu H., Aksay I.A.: Simultaneous liquid viscosity and density determination with piezoelectric unimorph cantilevers. *J. Appl. Phys*. **89/2**, 1497–1507 (2001)
41. Stahl S. W., Puchner M., Gaub H. E.: Photothermal cantilever actuation for fast single-molecule force spectroscopy. *Rev. Sci. Instrum*. DOI: 10.1063/1.3157466 (2009)
42. Tao Y., Li X.: Resonant cantilever sensors operated in a high-Q in-plane mode for real-time bio/chemical detection in liquids. *Sens. Actuator B,* **157**,606–614 (2011)
43. Wang J., Feng B.: Chemisorption sensing and analysis using silicon cantilever sensor based on n-type metal-oxide-semiconductor transistor. *MICROELECTRON ENG.* **99**, 1019–1023 (2011)
44. Wee K.W., Kang G.Y., Park J., Kang J.Y., Yoon D.S., Park J.H., Kim T.S.: Novel electrical detection of label-free disease marker proteins using piezoresistive self-sensing micro-cantilevers. *BIOSENS BIOELECTRON,* **20**, 1932–1938 (2005)
45. Wilfinger R.J., Bardell P.H., Chhabra D.S.: The resonator: a frequency selective device utilizing the mechanical resonance of a silicon substrate. *IBM J. Res. Dev.* **12**, 113 (1968)
46. Varshney M., Waggoner P.S., Tan C.P., Aubin K., Montagna R.A., Craighead H.G.: Prion Protein Detection Using Nanomechanical Resonator Arrays and Secondary Mass Labeling. *Anal. Chem.* **80**, 2141–2148 (2008)
47. Xu T., Yu H., Xu P., Xu W., Chen W., Chen C., Li X.: Real-time enzyme-digesting identification of double-strand DNA in a resonance-cantilever embedded micro-chamber. *Lab Chip*, **14**, 1206–1214 (2014)
48. Yang J.P., Lau G.K., Tan C.P., Chong N.B., Thubthimthong B., He Z. M.: An electro-thermal micro-actuator based on polymer composite for application to dual-stage positioning systems of hard disk drives. *Sens. Actuator A,* **187**, 98–104 (2012)
49. Zhang J., Jl H.F.: An Anti E. Coli O157:H7 Antibody-Immobilized Microcantilever for the Detection of *Escherichia coli* (*E. coli*). *Anal. Sci*. **20**, 585–587 (2004)
50. Zhang J., Lang H. P., Yoshikawa G., Gerber C.: Optimization of DNA Hybridization Efficiency by pH-Driven Nanomechanical Bending. *Langmuir*, **28**, 6494–6501 (2012)

SPIS TREŚCI

B. K. Pawłowska, B. M. Sobieszczańska – Model patogenezy enteropatogennych szczepów *Escherichia coli* – kluczowa rola adhezji 119
K. Poszytek – Mikrobiologiczna utylizacja celulozy 132
A. Mrozik – Mikroorganizmy w bioaugmentacji zanieczyszczonych środowisk 147
U. Błaszczyk, J. Moczarny – Bakteriocyny bakterii Gram-ujemnych – struktura, mechanizm działania i zastosowanie 157
M. Laskowska, E. Bogusławska-Wąs, P. Kowal, M. Hołub, W. Dąbrowski – Skuteczność wykorzystania niskotemperaturowej plazmy w mikrobiologii medycynie 172
D. M. Matusiak – Drobnoustroje radiotolerancyjne – charakterystyka wybranych gatunków oraz ich potencjalne zastosowanie 182
J. Fiedurek, M. Trytek – Wpływ stresu kwasowego i osmotycznego na wytwarzanie metabolitów przy użyciu mikroorganizmów 195
K. Pancer, W. Gut, B. Litwińska – Filowirusy – wirusy obecne od milionów lat – dlaczego teraz wybuchła tak wielka epidemia? 205
J. Czarnecki, D. Bartosik – Koncepcja chromidu i jej znaczenie dla klasyfikacji pozachromosomowych replikonów bakterii 215

PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

A. Wańczyk, B. Łabędź, Z. Rajfur – Mikrobiosensory beleczkowe w mikrobiologii 225

CONTENTS

B. K. Pawłowska, B. M. Sobieszczańska – Model of enteropathogenic *Escherichia coli* pathogenesis – a key role of adherence 119
K. Poszytek – Microbial cellulose utilization 132
A. Mrozik – Microorganisms in bioaugmentation of polluted environments 147
U. Błaszczyk, J. Moczarny – Bacteriocins of Gram-negative bacteria – structure, mode of action and potential applications 157
M. Laskowska, E. Bogusławska-Wąs, P. Kowal, M. Hołub, W. Dąbrowski – Efficiency of using non-thermal plasma in microbiology and medicine 172
D. M. Matusiak – Radiotolerant microorganisms – characterization of selected species and their potential usage 182
J. Fiedurek, M. Trytek – The efect of acid and osmotic stress onmetabolite production by microorganisms 195
K. Pancer, W. Gut, B. Litwińska – Filoviruses – viruses existing for millions of years – why do we have such a big outbreak now? 205
J. Czarnecki, D. Bartosik – The concept of chromid and its influence on the classification of bacterial extrachromosomal replicons 215

METHODS AND STANDARDS

A. Wańczyk, B. Łabędź, Z. Rajfur – Application of cantilever-based microbiosensors in microbiology 225