

Kwartalnik

**Tom 55**

**Zeszyt 3•2016**

LIPIEC – WRZESIEŃ

CODEN:

PMKMAV 55 (3)

2016

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

# Postępy Mikrobiologii

Advances in Microbiology

Index Copernicus ICV = 98,38 (2014)

Impact Factor ISI = 0,236 (2015)

Punktacja MNiSW = 15,00 (2015)

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

#### RADA REDAKCYJNA

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

#### REDAKCJA

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

#### ADRES REDAKCJI

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

#### Redaktorzy:

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

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

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

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

#### PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

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

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

#### STALI RECENZENCI:

JERZY DŁUGOŃSKI (Uniwersytet Łódzki), WALERIA HRYNIEWICZ (Narodowy Instytut Leków),  
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 Bącał, Pracownia Teorii i Zastosowań Elektrood, Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej,*  
*Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski.*  
*Obraz SEM uzyskano przy użyciu aparatury zakupionej w ramach projektu CePT POIG.02.02.00-14-024/08-00.*

---

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

Nakład 1150, Objętość 15 ark. wyd., Papier offset 90 g

---

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

Urszula Wachowska<sup>1\*</sup>, Anna Daria Stasiulewicz-Paluch<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Entomologii, Fitopatologii i Diagnostyki Molekularnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wpłynęło w maju 2015 r.  
Zaakceptowano w lutym 2016 r.

1. Wstęp. 2. Drożdże. 3. Przydatność drożdży do oceny zanieczyszczeń środowiska. 3.1. Środki ochrony roślin w środowisku. 3.2. Biotesty w oparciu o hamowanie wzrostu. 3.3. Testy genotoksyczności. 3.4. Testy endokrynne. 4. Drożdże w toksykogenomice. 4.1. Zalety drożdży wykorzystywanych w toksykogenomice. 4.2. Narzędzia transkrypto-, proteo- i metabolomiczne stosowane w toksykogenomice drożdży. 4.3. Toksykogenomika funkcjonalna genów drożdży. 4.4. Toksykogenomika drożdży w ocenie zanieczyszczenia środowiska rolniczego. 5. Podsumowanie

#### **Yeast as bioindicators of agricultural pollution**

*Abstract:* This review paper discusses a new set of biotests used for toxicity assessment of plant protection products and their residues in agricultural ecosystems. Recent regulations have imposed restrictions on the use of animals for scientific purposes, and also the obligation to analyze auxiliary substances in plant protection products and to identify endocrine disrupters. The major characteristics of yeasts and their taxonomic classification are described in the study. Commercial yeast-based biotests and potential uses of yeasts in environmental studies and toxicogenomics are also analyzed.

1. Introduction. 2. Yeast. 3. Yeast as indicators of environmental pollution. 3.1. Plant protection products in the environment. 3.2. Growth inhibition biotests. 3.3. Genotoxicity tests. 3.4. Endocrine tests. 4. Yeasts in toxicogenomics. 4.1. The advantages of using yeasts in toxicogenomics. 4.2. Transcriptomics, proteomics and metabolomics tools in yeast toxicogenomics. 4.3. Yeast functional toxicogenomics. 4.4. Yeast toxicogenomics in agricultural pollution assessment. 5. Conclusions

**Słowa kluczowe:** agrocenozy, biotesty, drożdże, środki ochrony roślin

**Key words:** agricultural biocenoses, biotests, yeasts, plant protection products

## **1. Wstęp**

Szacuje się, że na świecie istnieje około 30 tysięcy substancji chemicznych stanowiących potencjalne zagrożenia dla człowieka i środowiska [48]. Dodatkowo corocznie na rynek wprowadza się nowe substancje do stosowania w rolnictwie podlegające obowiązkowi rejestracji. Jednocześnie opracowuje się wspólne normy dla oceny ryzyka stosowania tych substancji. Niebezpieczne są zwłaszcza substancje rakotwórcze, genotoksyczne i teratogenne oraz związki trwałe lub zdolne do bioakumulacji. W państwach Unii Europejskiej związki takie nie mogą być stosowane, ale stanowią duży problem w innych rejonach świata. W Unii Europejskiej od 14 czerwca 2011 roku obowiązują nowe przepisy dotyczące rejestracji środków ochrony roślin, wprowadzone rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1107/2009 z dnia 21 października 2009 r. dotyczącym dopuszczania do obrotu środków ochrony roślin [60]. Przepisy te nakładają obowiązek minimalizowania ilości przeprowadzanych badań, w szczególności na zwierzętach, a testy na kręgowcach powinny być stosowane tylko w ostateczności. Zgodnie z nowymi przepisami kontroli ekotoksykologicznej podlegają zarówno substancje aktywne środków ochrony roślin

jak i sejfny, synergetyki, adiuwanty lub inne obojętne substancje zawarte w tych preparatach [23]. Pomimo wprowadzenia europejskich wytycznych zmierzających do unikania powielania testów na kręgowcach często są one niezbędne w celu potwierdzenia bezpieczeństwa stosowania środków ochrony roślin lub zawartych w nich substancji aktywnych. Jednocześnie rośnie zapotrzebowanie na opracowanie alternatywnych procedur testowych. Konwencjonalne testy toksykologiczne opierają się głównie na modelach wykorzystujących gryzonia. Obecne zmiany prawne są kierowane także do środowiska naukowego w celu wypracowania szybkich i wiarygodnych testów o wysokiej czułości, przepustowości i precyzji [48, 36]. Celem opracowania jest ocena możliwości wykorzystania drożdży jako organizmów modelowych do oceny zagrożeń jakie stanowią dla środowiska środki ochrony roślin.

## **2. Drożdże**

Drożdże najczęściej definiowane są jako saprotroficzne jednokomórkowe grzyby rozmnażające się przez pączkowanie, rozwijające się na podłożach zawierających cukier i wywołujące w warunkach beztlenowych

\* Autor korespondencyjny: Katedra Entomologii, Fitopatologii i Diagnostyki Molekularnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. Prawocheńskiego 17, 10-720 Olsztyn; e-mail: urszula.wachowska@uwm.edu.pl

Tabela I  
Skrócona systematyka filogenetyczna grzybów

Gromada	Podgromada	Przykładowe rodzaje
Ascomycota	<i>Pezizomycotina</i>	<i>Aureobasidium</i> , <i>Morchella</i> , <i>Eremascus</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Pleospora</i> , <i>Neurospora</i> , <i>Ophiostroma</i>
	<i>Saccharomycotina</i>	<i>Dipodascopsis</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Candida</i> , <i>Dipodascus</i>
	<i>Taphrinomycotina</i>	<i>Schizosaccharomyces</i> , <i>Taphrina</i> , <i>Pneumocystis</i>
Basidiomycota	<i>Agaricomycotina</i>	<i>Coprinus</i> , <i>Boletus</i> , <i>Tremella</i>
	<i>Ustilaginomycotina</i>	<i>Tilletia</i> , <i>Ustilago</i>
	<i>Pucciniomycotina</i>	<i>Cronartium</i> , <i>Leucosporidium</i>
Zygomycota	Zygomycetes	<i>Glomus</i>

Na podstawie [43]

fermentację alkoholową [13]. Najczęściej znajdują one zastosowanie w piwowarstwie, gorzelnictwie i piekarnictwie. Jednak w rzeczywistości drożdże są bardzo liczną grupą grzybów szeroko rozpowszechnionych w środowisku, wykorzystywanych w badaniach biotechnologicznych. Występują one na powierzchni roślin uprawnych, we wnętrzu ziarniaków, w glebie, wodzie oraz atmosferze [22, 41, 42, 76].

Badania filogenetyczne grzybów w oparciu o analizę fragmentów sekwencji rDNA kodujących 18S, 5,8S i 28S rRNA wybranych grzybów pozwoliły na wydzielenie trzech podgromad w gromadzie *Ascomycota* (Tabela I), zawierających drożdże: (1) *Schizosaccharomyces* w *Taphrinomycotina*, (2) *Saccharomycotina* oraz (3) grzyby strzępkowe *Pezizomycotina* [5]. Drożdże i grzyby strzępkowe są taksonami siostrzanymi a *Schizosaccharomyces* i gatunki pokrewne uległy wcześniejszemu wydzieleniu w tym rodowodzie, co zostało też poparte analizą wielogenowej sekwencji [44, 20]. Wiele gatunków drożdży znajduje się też w gromadzie *Basidiomycota*, co dodatkowo utrudnia klasyfikację tych grzybów [43].

W pracy Kurtzman i Robnett [44] badano relacje filogenetyczne między gatunkami i rodzajami w obrębie gromady workowców na podstawie analizy sekwencji pięciu genów (Tabela II). Gatunki należące do *Lipomyces* (klad 11) są ewolucyjnie najwcześniej rozbieżnymi gatunkami *Saccharomycotina*. Grzyby rodzaju *Lipomyces* są powszechnie izolowane z gleby i stanowią jedną z kilku grup drożdży, dla których gleba jest głównym siedliskiem. Sekwencje genów analizowanych gatunków rodzaju *Saccharomyces* i powiązanych rodzajów (klad 1) wydają się być najbardziej odmienne od pozostałych kladów w *Saccharomycotina*, klad ten obejmuje drożdże fermentacji cukrów (glukozy, galaktozy, sacharozy i innych). Na uwagę zasługuje też rodzaj *Eremothecium*, zawierający pięć gatunków, z których wszystkie są patogenami roślin (na przykład *E. ashbyi* i *E. coryli* soi, [28]).

Co ciekawe rodzaj *Candida* zakwalifikowano do kilku kladów, co sugeruje, że jest to rodzaj polifiletyczny lub analiza sekwencji pięciu fragmentów DNA jest niewystarczająca w badaniach filogenetycznych.

Tabela II  
Wybrane gatunki *Saccharomycotina* zakwalifikowane do kladów

Klad	Wybrane gatunki
Klad 1	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> , <i>Cyniclomyces guttulatus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Eremothecium cymbalariae</i> , <i>E. ashbyi</i> , <i>E. coryli</i> , <i>Hanseniaspora valbyensis</i>
Klad 2	<i>Wickerhamomyces canadensis</i> , <i>Starmera amethionina</i>
Klad 3	<i>Komagataella pastoris</i>
Klad 4	<i>Saccharomycopsis capsularis</i> , <i>Ascoidea rubescens</i>
Klad 5	<i>Candida boidinii</i> , <i>Ogataea minuta</i> , <i>Kuraishia capsulata</i>
Klad 6	<i>Candida multigemmis</i> , <i>Scheffersomyces stipitis</i> , <i>Candida shehatae</i> , <i>Spathaspora passalidarum</i> , <i>Metschnikowia bicuspidate</i> , <i>Wickerhamia fluorescens</i>
Klad 7	<i>Ascoidea</i> – podobne
Klad 8	<i>Sporopachydermia lactativora</i>
Klad 9	<i>Candida petrohuensis</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Galactomyces geotrichum</i> , <i>Zygoascus hellenicus</i> , <i>Nadsonia fulvescens</i>
Klad 10	<i>Candida caseinolytica</i>
Klad 11	<i>Lipomyces starkeyi</i> , <i>Dipodascopsis uninucleata</i>

Sporządzono w oparciu o drzewo filogenetyczne gatunków drożdży [44]

Dalsza analiza pokrewieństwa między drożdżami *Saccharomycotina* wymaga porównania całych genomów [44]. Obecnie dostępne są sekwencje genomów kilkudziesięciu gatunków drożdży, ale są to przede wszystkim gatunki ważne w medycynie lub wykorzystywane biotechnologicznie. Kład 1 zawiera rodzaje *Saccharomyces* i *Kluyveromyces* wykorzystywane w przemyśle spożywczym. W kładzie 6 znajdują się gatunki *Scheffersomyces stipitis*, *Candida shehatae* i *Spathaspora pasalidarum* fermentujące D-ksylozę (cukier drzewny) w słomie i drewnie do etanolu [35]. Wiele gatunków rodzaju *Ogataea* i *Kuraishia*, które powodują rozkład metanolu, znajduje się w kładzie 5 [42].

W niektórych przypadkach molekularne badania porównawcze mogą być uzupełniane opisem właściwości morfologicznych i fizjologicznych drożdży. Wiele parametrów fizjologicznych, takich jak fermentacja cukru i wykorzystanie azotanów jako jedynego źródła azotu są powszechnie spotykane u *Saccharomycotina*. Ale są przypadki wyjątkowe, na przykład asymilacja metanolu jest unikatowa dla kilku gatunków drożdży i może być stosowana do rozpoznawania rodzaju, służy również do selektywnej izolacji poszczególnych grup drożdży [45].

Wiele właściwości morfologicznych drożdży jest typowych dla *Saccharomycotina*, na przykład kuliste askospory. Ale wydłużone askospory są typowe tylko dla rodzaju *Eremothecium*. Typowe jest pączkowanie drożdży w dowolnym miejscu komórki, ale dwubiegunowe początkowanie jest ograniczone do czterech rodzajów: *Hanseniaspora*, *Saccharomycodes*, *Wickerhamia* i *Nadsonia*. Cechy morfologiczne drożdży tylko w wyjątkowych przypadkach pozwalają właściwie je zidentyfikować, ale mogą być bardzo ważnym narzędziem w ich wstępnym oznaczaniu [43].

Rodzaj *Aureobasidium* należy do rzędu *Dothideales* (*Ascomycota*, *Dothideomycetes*) i obejmuje 27 gatunków i odmian [26], w tym niedawno opisany gatunek *A. thailandense* [59]. Gatunek *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud zaliczany jest do czarnych drożdży w podgromadzie *Pezizomycotina* o istotnym znaczeniu biotechnologicznym [Tabela III]. Posiada on wyjątkową odporność na czynniki stresowe i coraz większe znaczenie w medycynie [26, 27]. Występuje w środowiskach charakteryzujących się silnym zasoleniem i dużą wilgotnością. Spotykany jest w żywności,

w łazienkach, na skałach i pomnikach a w agrocenozach jako epifit lub endofit na przechowywanym ziarnie [80]. Gatunek ten tworzy strzępki, grubościenne chlamydospory oraz pączkujące blastospory [24, 75]. Grzyb ten wykazuje duże zróżnicowanie właściwości fizjologicznych i morfologicznych, dlatego też wyodrębniono jego cztery odmiany: *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans*, *A. pullulans* var. *melanogenum*, *A. pullulans* var. *subglaciale* oraz *A. pullulans* var. *namibiae* [80]. Gostinčar i wsp. [27] podają wyniki sekwencjonowania genomów czterech odmian gatunku *A. pullulans*, należących do najmniejszych w porównaniu z innymi grzybami *Dothideomycete*.

Wiele gatunków drożdży należy do gromady *Basidiomycota* tylko w bezpiecznej fazie, część z nich klasyfikowanych jest do rodzajów *Rhodotorula* i *Cryptococcus* [79]. Jednakże analizy filogenetyczne wykazywały wielokrotnie polifiletyczny charakter tych dwóch rodzajów. Anamorficzne drożdże rodzaju *Rhodotorula* obejmują gatunki aktualnie umieszczone w dwóch podgromadach *Pucciniomycotina* i *Ustilagomycotina*, klasach *Microbotryomycetes* (29 gatunków) i *Cystobasidiomycetes* (14 gatunków), rzędach *Sporidiobolales*, *Kriegeriales*, *Microbotryales*, *Cystobasidiales* i *Erythrobasidiales* [1, 42, Tabela IV]. Kurtzman i wsp. [42] opisali 47 gatunków rodzaju *Rhodotorula* tworzących kremowe, różowe lub pomarańczowe kolonie.

Anamorficzne gatunki rodzaju *Cryptococcus* znajdowane są we wszystkich głównych liniach *Basidiomycota* oprócz klasy *Tremellomycetes* [42]. Większość gatunków tworzy wokół owalnych, elipsoidalnych lub wydłużonych komórek polisacharydową otoczkę. U niektórych gatunków obserwowano również strzępki z doliporowymi septami, nie spotykano jednak balistospor. Znanych i opisywanych jest 70 gatunków rodzaju *Cryptococcus*. Gatunki rodzaju *Sporobolomyces* wytwarzają symetryczne balistospory na krótkich strygmach i nie są zdolne do fermentacji cukrów [42]. Rodzaj *Sporobolomyces* to rodzaj polifiletyczny, należy do *Urediniomycetes* i ma przedstawicieli w *Microbotryomycetidae*, gdzie większość gatunków klasyfikowanych jest do rzędu *Sporidiobolales* (Tabela IV). Rząd *Sporidiobolales* obejmuje także pięć gatunków *Sporidiobolus*.

Rodzaj *Pseudozyma* jest anamorficznym drożdżem należącym do rzędu *Ustilaginales*, klasy *Ustilaginomycetes* w podgromadzie *Ustilaginomycotina* i obejmuje

Tabela III  
Systematyka gatunku *Aureobasidium pullulans*

Klasa	Rząd	Gatunki	Odmiany <i>A. pullulans</i>
<i>Dothideomycetes</i>	<i>Dothideales</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>A. pullulans</i> var. <i>pullulans</i> , <i>A. pullulans</i> var. <i>subglaciale</i> , <i>A. pullulans</i> var. <i>namibiae</i> , <i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>
	<i>Capnodiales</i>	<i>Mycosphaerella graminicola</i>	
	<i>Hysteriales</i>	<i>Hysterium pulcare</i>	

Na podstawie [26]

Tabela IV  
Skrócona systematyka gromady *Basidiomycota*

Podgromada	Rząd	Wybrane gatunki
<i>Pucciniomycotina</i>	<i>Sporidiobolales</i>	<i>Sporidiobolus salmonicolor</i> , <i>Rhodospodium fluviale</i> , <i>R. mucilaginoso</i> , <i>R. glutinis</i> , <i>R. graminis</i>
	<i>Erythrobasidiales</i>	<i>Rhodotorula armeniace</i> , <i>Rh. aurantiaca</i> , <i>Rh. lactose</i> , <i>Rh. marina</i> , <i>Sporobolomyces phyllomatis</i> , <i>S. cluyveri-niehi</i> , <i>Erythrobasidium hasegawianum</i>
	<i>Microbotryales</i>	<i>Microbotryam reticulatum</i> , <i>M. violaceum</i> , <i>Rh. honiea</i> , <i>Ustilentylama fluitans</i>
	<i>Cystobasidiales</i>	<i>Rhodotorula</i> sp., <i>Rh. pollida</i> , <i>Rh. laryngis</i> , <i>Rh. pinicola</i>
<i>Ustilagomycotina</i>	<i>Ustilaginales</i>	<i>Pseudozyma antarctica</i>

Na podstawie drzewa filogenetycznego [1, 42]

10 gatunków [42]. W roku 2013 został zsekwencjonowany genom wyizolowanego w Japonii gatunku *Pseudozyma antarctica* [54], który jest zdolny do produkcji zewnątrzkomórkowych glikolipidów MEL. Genom jądrowy *P. antarctica* ma wielkość 18,0 Mb i zawiera 6543 genów kodujących białka, z których 4910 (74,9%) jest homologiczna z sekwencjami zawartymi w bazie danych [54].

### 3. Przydatność drożdży do oceny zanieczyszczeń środowiska

#### 3.1. Środki ochrony roślin w środowisku

W uwagi na rosnące ilości zanieczyszczeń chemicznych wprowadzanych do ekosystemów wodnych i glebowych oraz zmienionych ram prawnych rosną wymagania dotyczące rozwoju czułych i wiarygodnych metod oceny wpływu zanieczyszczeń na organizmy wodne, glebowe i związane z rośliną. Według nowych wytycznych dotyczących rejestracji środków ochrony roślin, wymagane są informacje na temat ich wpływu na mikroorganizmy glebowe i żyzność gleby. Stefani i wsp. [68] udowodnili, że chlorotalonil (fungicyd) może znacząco ograniczać respirację gleby a efekt ten utrzymuje się przez 28 dni. Komárek i wsp. [40] zwracają uwagę, że zanieczyszczenie gleb rolniczych fungicydami nieorganicznymi zawierającymi miedź oraz fungicydami organicznymi stanowi poważne zagrożenie toksykologiczne dla środowiska. Wyżej cytowani autorzy wskazują, że w zdecydowanej większości badanych w UE winnic stężenie miedzi w glebach przekracza dopuszczone prawem granice. Murray i wsp. [55] oceniając przy pomocy nowoczesnych technik analitycznych pozostałości wybranych środków ochrony roślin (między innymi benomylu, karbendazymu) i innych zanieczyszczeń w wodach słodkowodnych wykrywali śladowe ich ilości, zwykle w zakresie od nanogramów lub mikrogramów w litrze, ale w wielu przypadkach ich koncentracja przekroczyła dopuszczalne limity. Kompleksowa ocena zawartości potencjalnie niebezpiecznych i toksycznych

substancji w jednej próbie, przy pomocy chemicznych metod analitycznych, jest niemożliwa. Zadanie to mogą spełniać wrażliwe mikroorganizmy modelowe (głównie bakterie) lub bezkręgowce glebowe [34, 36].

Badania ekotoksyczności środków ochrony roślin w stosunku do drożdży prowadzone są obecnie głównie w przypadku zastosowania środków ochrony roślin w uprawach, których owoce mogą zostać wykorzystane do fermentacji (winorośl, jabłoń) z przeznaczeniem do produkcji wina lub cydru [10, 22].

#### 3.2. Biotesty w oparciu o hamowanie wzrostu

Badania przewlekłej toksyczności wymagające kilku pokoleń organizmów testowych prowadzone są w celu określenia skutków długoterminowego oddziaływania środków ochrony roślin w organizmach żywych. Zanieczyszczenia rolnicze przedostają się do środowiska wodnego, dlatego badania toksyczności w środowisku wodnym wymagają szybkich i reprezentatywnych testów biologicznych [48]. Biotesty wykorzystujące organizmy reprezentujące różne poziomy troficzne, wiele gatunków bakterii, glonów i orzęsków o krótkim cyklu życia i szybkich reakcjach na zmiany, przedstawiono w tabeli V. Drożdże stanowią tylko niewielką liczbę tych organizmów.

Należy jednak podkreślić, że wyniki badań z wykorzystaniem bakterii, nie są reprezentatywne dla eukariotów. Jednokomórkowe organizmy eukariotyczne, takie jak algi, są zwykle wykorzystywane do oceny fitotoksyczności, a orzęski nie są powszechnie używane jako organizmy testowe. Ogromna różnorodność substancji chemicznych stosowanych w rolnictwie skłania do korzystania z krótkoterminowych testów cytotoxyczności z udziałem komórek eukariotycznych. Badania toksyczności krótkookresowej prowadzone są z wykorzystaniem *S. cerevisiae* jako biosensorem do oceny cyto- i genotoksycznego działania zanieczyszczeń. Chatterjee i Luo [12] w swoich badaniach wykorzystali ten gatunek do oceny toksyczności Cr (III) analizując zahamowanie wzrostu, liczbę komórek, suchą biomasę i zmiany w kształcie i wielkości komórek

Tabela V  
Przykłady organizmów wykorzystywanych w testach toksyczności

Organizm	Rodzaj/gatunek
Bakterie	<i>Bacillus, Escherichia, Pseudomonas, Salmonella, Vibrio</i>
Grzyby	<i>Aspergillus, Candida, Saccharomyces, Penicillium</i>
Glony	<i>Chlorella, Scenedesmus, Selenastrum</i>
Pierwotniaki	<i>Paramecium, Spirostomum, Vorticella</i>
Wrotki	<i>Brachionus</i>
Skorupiaki	<i>Artemia, Asellus, Ceriodaphnia, Daphnia, Gammarus, Hyalella, Mysis, Thamnocephalus</i>
Owady	<i>Chironomus, Ephemerella, Hydropsyche</i>
Mięczaki	<i>Dreissena polymorpha, Physa acuta, Planorbarius corneus</i>
Ryby	<i>Brachydanian rerio, Lebistes reticulatus</i> oraz wiele innych

Według Klimiuk, Lebkowska [38]

*S. cerevisiae*. Na tej podstawie oszacowali wskaźnik  $EC_{50}$  dla tego związku na poziomie  $51,03 \text{ mg dm}^{-3}$ , a analiza mikroskopowa wykazała deformację komórek drożdży. Rumlova i Dolezalova [61] oceniając toksyczność pięciu substancji (atropiny, fenitrotonu, cyjanku potasu, chlorku rtęci i azotanu ołowiu) w wodzie wobec drożdży *S. cerevisiae* w porównaniu z dwoma standardowymi testami toksyczności na podstawie hamowania ruchliwości *Daphnia magna* i bioluminescencji *Vibrio fischeri* stwierdziły, że dla niektórych substancji test biologiczny z *S. cerevisiae* okazał się czulszy.

Pewne nadzieje można wiązać także z szeroko prowadzonymi badaniami nad biogenezą peroksysomów w komórkach drożdży *Candida boidinii*, *Hansenula polymorpha* i *Pichia pastoris* [74]. Spośród wszystkich badanych organizmów największą liczbę tych organelli napotkano w komórkach metylotroficznych drożdży, peroksysomy masowo pojawiają się w czasie wzrostu komórek w obecności metanolu jako jedyne źródła węgla i energii. Biogeneza peroksysomów związana jest z białkami zwanymi peroksynami, geny je kodujące należą do grupy PEX. Dotychczas u człowieka zidentyfikowano 16 genów PEX, natomiast u grzybów 32 geny. Ponieważ w peroksysomach znajduje się olbrzymia liczba enzymów odpowiedzialnych za transformację, także ksenobiotyków, ich liczba może być wskaźnikiem aktywności enzymatycznej komórki bioindykatora.

### 3.3. Testy genotoksyczności

Genotoksyczność jest terminem opisującym wszystkie niekorzystne dla organizmu uszkodzenia materiału genetycznego w komórce organizmu żywego pod wpływem związku chemicznego. W badaniach mutagenności liczba odpowiedzi ze strony biotestów genotoksyczności po zastosowaniu ksenobiotyku powinna być większa niż bez ksenobiotyku. Dodatkowo poznano biomarkery, które pojawiają się w komórce po ekspozycji na szkodliwy związek chemiczny (określone

substancje lub ich metabolity w komórkach, mutacje DNA, określone białka oraz addukty DNA czyli produkty połączenia DNA z innymi związkami wiązaniemi wodorowymi). Efektami działania ksenobiotyków na materiał genetyczny mogą być dodatkowe, w porównaniu z kontrolą, aberracje chromosomowe (*Chromosomal Aberrations, CA*), wymiana siostrzanych chromatyd (*Sister Chromatid Exchange, SCE*), mikrojądra (*Micronuclei, MN*), uszkodzenia DNA wykrywane testem kometkowym (*Comet Assay Test*), mutacje w genie transferazy fosforybozylowej hipoksantyny-guaniny (*Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase, HGPRT*) [19, 48]. Potencjalnie w testach tych komórki drożdży mogą zastąpić dotychczas stosowane komórki innych organizmów.

### 3.4. Testy endokrynne

Ludzie narażeni są na wpływ mieszanin różnych substancji toksycznych w środowisku. Połączone efekty toksykologiczne dla dwóch lub więcej substancji mogą być inne niż dla poszczególnych składników mieszanin. Obecnie dyskutowana i badana jest ocena łącznych skutków związków o aktywności hormonalnej także z powodu nowych regulacji prawnych [21, 39]. Zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1107/2009 z dnia 21 października 2009 r. środki ochrony roślin nie mogą wpływać na układ endokryny [60].

Biotesty komórkowe są alternatywą dla tradycyjnych technik analitycznych i testów przeprowadzanych na całych organizmach [52]. Biotesty te przeważnie wykorzystują komórki ludzkie (takie jak na przykład komórki raka piersi lub nerki) w celu określenia zakresu zakłóceń procesów hormonalnych [2]. Obecnie dostępne są także komercyjne biotesty wykorzystujące komórki drożdży. Grzyby te nie mają naturalnych receptorów estrogenu, ale może zostać do ich komórek wprowadzony taki receptor z genomu

ludzkiego lub ryb. Raz wbudowane receptory będą przyczyniać się do ekspresji mierzonych białek, takich jak lucyferaza czy  $\beta$ -galaktozydaza, które mogą być monitorowane kolorymetrycznie lub luminescencyjnie [2]. Jednym z najczęściej wykorzystywanych takich testów jest test aktywności estrogennej z użyciem drożdży (*Yeast Estrogen Screen*, YES) [57]. Otrzymane wyniki są znormalizowane w stosunku do najpowszechniejszego, naturalnego estrogenu używanego jako standard. Komercyjne testy *Yeast Estrogen Screen* (YES), *Yeast Androgen Screen* (YAS) łącznie z wariantami LYES i BLYES są obecnie szeroko stosowane. Test YES został opisany po raz pierwszy przez Arnold i wsp. [2] w celu określenia powinowactwa DDT, oktylofenolu i naturalnych substancji do ludzkiego receptora estrogenowego w porównaniu z  $17\beta$ -estradiolem. W celu zwiększenia czułości i szybkości testu YES opracowano test LYES, w którym wprowadzono dodatkowo etap fermentacji enzymatycznej z litykaza [64].

Pojawiła się obawa, że część środków ochrony roślin, w tym środki owadobójcze są zdolne do naśladowania działania  $17\beta$ -estradiolu w wyniku interakcji z ludzkim receptorem estrogenu [53]. Powszechnie stosowanymi środkami owadobójczymi są pyretroidy i kilka z nich oceniano różnymi metodami pod kątem ewentualnej aktywności wobec układu hormonalnego. Zaobserwowano, że niektóre metabolity pyretroidów, zwłaszcza permetyryny i cypermetryny, mają struktury chemiczne, które są predysponowane do oddziaływania z komórkowym receptorem estrogenu w teście YES bardziej niż pyretroidy macierzyste. Mimo, że aktywność estrogenowa tych związków była około  $10^5$  razy mniejsza niż  $17\beta$ -estradiolu należy je uznać za zagrożenie dla zdrowia ludzkiego, a także środowiska [53]. Kolle i wsp. [39] zastosowali test YAS w celu oceny aktywacji receptora androgenowego przez winklozolinę (fungicyd) i flutamid (lek) oraz przez mieszaniny tych związków zastosowane w różnych stężeniach. Działanie tych związków nie było synergistyczne a ich efekt estrogeny widoczny był tylko przy wyższych stężeniach – ale nie sumował się. Badania Taxvig i wsp. [69] dowiodły także, że tebukonazol i epoksykonazol (fungicydy) mogą działać na układ endokryny szczurów, na co wskazywała między innymi feminizacja samców lub zwiększenie masy urodzeniowej tych zwierząt.

#### 4. Drożdże w toksykogenomice

##### 4.1. Zalety drożdży wykorzystywanych w toksykogenomice

Toksykogenomika jest interdyscyplinarną dziedziną nauki, która łączy toksykologię z naukami „omicznymi” w celu wyjaśnienia reakcji na stresy środowiskowe na

poziomie genomu [29, 56]. Duży potencjał wynikający z połączenia tych dyscyplin z bioinformatyką zapewnia bardziej kompleksową wiedzę odnośnie oddziaływań substancji chemicznych na poziomach molekularnym i komórkowym [28, 70]. Gatunek *S. cerevisiae* jest dokładnie poznany i powszechnie stosowany jako eukariotyczny model w tego typu badaniach. Kilka cech drożdży sprawia, że są one dobrym modelem: (1) są jednokomórkowymi, niepatogenicznymi mikroorganizmami o szybkim wzroście i prostych warunkach hodowli, (2) są podatne na manipulacje genetyczne, (3) została już przeprowadzona analiza całego genomu i wypracowano w tym zakresie dużo prostych technik eksperymentalnych, (4) genom drożdży posiada uderzająco wysoki stopień funkcjonalnej homologii z genomem człowieka i innych wyższych eukariotów, i (5) mają unikalną zaletę posiadania informacji funkcjonalnych dostępnych dla niemal każdego genu [31]. Od 20 lat znana jest sekwencja genomu *S. cerevisiae* [25]. Składa się on z 12 068 kilopar zasad (ponad 12 mln par zasad) i zawiera około 6000 genów. Obecnie baza danych genomu drożdży piekarniczych *Saccharomyces Genome Database* (SGD; [78]) dostarcza wiadomości o każdym genie tych drożdży. Po zsekwencjonowaniu genomu drożdży piekarniczych można było ostatecznie stwierdzić, że geny drożdży piekarniczych i ssaków kodują podobne białka oraz określić, ile z genów, które odkryto u drożdży piekarniczych, ma swoje homologie wśród genów ssaków [6].

Liczne informacje zebrane w ciągu kilku ostatnich lat badań znajdują się w łatwo dostępnych bazach danych. Pionierskie badania nad *S. cerevisiae* przyczyniły się do rozwoju kilku postgenomowych technik i narzędzi obliczeniowych, zmieniając obszar zastosowań drożdży w metodach funkcjonalnej genomiki i proteomiki [7, 49, 67]. I chociaż wiele związków cytotoksycznych działa na organizmy za pośrednictwem mechanizmów fizjologicznych, które nie istnieją u drożdży, wiele podstawowych mechanizmów, takich jak adaptacja i odporność na presje chemiczne i środowiskowe znajdują się w komórkach tych grzybów i organizmów odległych filogenetycznie [58].

##### 4.2. Narzędzia transkrypto-, proteo- i metabolomiczne stosowane w toksykogenomice drożdży

Badanie zmian w ekspresji genów i białek lub poziomów metabolitów po ekspozycji na substancje toksyczne może pomóc w identyfikacji komponentów komórkowych i szlaków metabolicznych, które są najbardziej istotne z toksykologicznego punktu widzenia [29, 56]. *S. cerevisiae* stanowi doskonały eksperymentalny model do uzyskania zintegrowanej oceny odpowiedzi całego genomu na stres poprzez połączenie transkryptomiki i proteomiki ilościowej do oceny



ekspresji genomu, metabolomiki, czyli badaniu profilu metabolitów komórkowych jako ostatecznej odpowiedzi na toksyny i chemogenomiki, do identyfikacji molekuł będących celem ataków toksyn w komórce. Po ekspozycji komórek drożdży na toksyny następuje zmiana ekspresji mRNA, w celu dostosowania się do nowych warunków środowiskowych. W ten sposób tworzy się specyficzny wzór ekspresji genów charakterystyczny dla danego związku [65, 66]. Takie transkrypcyjne wzory są podobne dla związków o podobnych mechanizmach działania i mogą być stosowane do wnioskowania o mechanizmach działania i przewidywaniu efektów niescharakteryzowanych toksyn [46, 70]. W rzeczywistości, zmiana ekspresji genów może wystąpić niemal natychmiast po ekspozycji i ocena tych zmian może potencjalnie zapewnić wcześniejszą i bardziej czułą reakcję biomarkera niż tradycyjne metody toksykologiczne [29, 66]. Jednakże ocena samej ekspresji genów jest niewystarczająca, aby w pełni zrozumieć działanie toksyny i wynikające stąd konsekwencje [29], ponieważ spodziewane są również zaburzenia w produkcji i/lub funkcji białka. Analizy profili białek mogą być stosowane w celu identyfikacji zmian jakie w nich zachodzą po ekspozycji na toksynę [17, 62, 71, 72]. Genomowe i proteomiczne metody nie uwzględniają dynamicznego stanu metabolicznego komórki. Metabolomika jest podejściem, które umożliwia badanie profili metabolicznych w oparciu o założenie, że zmiany wywołane są przez toksyczne substancje. Niestety tego typu badania z wykorzystaniem drożdży są nadal rzadkie [30, 47].

### 4.3. Toksykogenomika funkcjonalna genów drożdży

Toksykogenomika funkcjonalna bada funkcje genów związanych z działaniem toksycznego związku lub stresu środowiskowego, czyli określa bezpośredni związek między genem i toksycznością [29, 56]. W tym kontekście, przełomem w badaniach nad mechanizmem działania toksyn, i jedną z głównych zalet stosowania drożdży do oceny toksyczności substancji było uzyskanie zbioru haploidalnych i heterozygotycznych/homozygotycznych diploidalnych drożdży z delecją określonego genu [63]. Kolekcje tych drożdży umożliwiają kompleksowe i systematyczne badania genetyczne, które wskazują na bezpośredni związek między specyficznym genem i jego funkcjonalnym produktem tworzącym się w odpowiedzi na dany ksenobiotyk [3, 32, 77]. Badania skryningowe są często prowadzone w celu identyfikacji genów, które są ważnymi czynnikami decydującymi o oporności na stres. Możliwe jest także wykrywanie delecji, które warunkują oporność na związek toksyczny, wówczas gdy jest on szkodliwy dla szczepu typu dzikiego. Testy te wykonuje się na szczepach homozygotycznych i haploidalnych [77]. Obecnie dostępnych jest wiele narzędzi bioinforma-

tycznych, które ułatwiają interpretację wyników [54]. Jak dotychczas co najmniej kilkadziesiąt publikacji napisano w oparciu o badania z wykorzystaniem kolekcji delecyjnych drożdży [16, 17].

### 4.4. Toksykogenomika drożdży w ocenie zanieczyszczenia środowiska rolniczego

Badania toksykologiczne związków chemicznych stosowanych w rolnictwie, w tym herbicydów i fungicydów, rozwijają się od wielu lat, ale długofalowe skutki stosowania tych substancji są trudne do przewidzenia. Analiza całego genomu drożdży jest z powodzeniem stosowana do identyfikacji genów odpowiedzialnych za odpowiedzi i oporność na stropy wywołane przez środki ochrony roślin [8, 9]. Opisywana jest między innymi odpowiedź drożdży na sulfometuron metylowy (herbicyd), mankozeb (fungicyd ditiokarbaminianowy), tiuram, zineb, maneb i benomyl (fungicydy), lindan (insektycyd), kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D), parakwat i cyperquat (herbicydy) [14–16, 70, 72]. Podejście toksykogenomiczne zaproponowano do zdefiniowania i przewidzenia nowych efektów toksykologicznych dla fungicydu mankozeb [14, 16] i herbicydu 2,4-D [72, 73]. Mankozeb jest nieselektywnym fungicydem zawierającym kompleks cynku z etyleno-bis-ditiokarbaminianem manganu o szerokim spektrum działania powszechnie stosowanym wobec fitopatogennych grzybów w różnych uprawach, o niskiej toksyczności ostrej [4, 50]. Jednak w ostatnich latach jest coraz więcej dowodów wskazujących, że przewlekła ekspozycja na ten fungicyd zwiększa prawdopodobieństwo zachorowania na chorobę Parkinsona i niektóre formy raka [11, 81]. Metody proteomiki ekspresyjnej wykazały, że 70% białek inaczej wyraża się w komórkach ekspozycyjnych na mankozeb [16] i aż 53% determinantów oporności drożdży na fungicyd ma ludzkie ortologi [14].

Kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D) należy do rodziny herbicydów auksynopodobnych. Pomimo, że jego stosowanie jest uznane za stosunkowo bezpieczne, ekspozycja na 2,4-D może być związana z rozwojem nieziarniczego chłoniaka i mięsaka [33]. W badaniach Teixeira i wsp. [75] dotyczących oceny mechanizmów reakcji na stres i powstawania oporności na 2,4-D zastosowano cały genom *S. cerevisiae*. Reakcja transkrypcji drożdży na ekspozycję na 2,4-D skutkowałą zmianami w regulacji kilku genów zaangażowanych w odpowiedzi na stres oksydacyjny, co korelowało ze wzrostem stężenia rodników hydroksylowych i peroksydacji lipidów zarejestrowanych w wyniku ostrego stresu na 2,4-D w komórkach drożdży [73].

Opisane przypadki podkreślają podobieństwa skutków toksykologicznego działania fungicydów i herbicydów u drożdży i u innych organizmów eukariotycznych, takich jak ludzie i rośliny. W związku z tym oczekuje

się, że zastosowanie układu modelowego z drożdżami będzie nadal przyczyniać się do zrozumienia mechanizmów molekularnych leżących u podstaw toksyczności środków ochrony roślin dla bardziej skomplikowanych i mniej dostępnych w badaniach eukariontów.

## 5. Podsumowanie

Reasumując należy podkreślić, że wzrasta znaczenie drożdży wykorzystywanych w nauce, szczególnie w badaniach środowiskowych, jako organizmów modelowych. Zainteresowanie budzą przede wszystkim eksperymenty nad oddziaływaniem toksyn na geny, prowadzone na drożdżach w celu określenia podobieństw reakcji, także na środki ochrony roślin, pomiędzy różnymi organizmami. Dostępnych jest także kilka komercyjnych biotestów wykorzystujących drożdże do oceny zagrożeń zanieczyszczeń rolniczych dla środowiska.

## Piśmiennictwo

- Aime M.C., Matheny P.B., Henk D.A., Frieders E.M., Nilsson R.H., Piepenbring M., McLaughlin D.J., Szabo L.J., Begerow D., Sampaio J.P., Bauer R., Weiss M., Oberwinkler F., Hibbett D.: An overview of the higher level classification of *Pucciniomycotina* based on combined analyses of nuclear large and small subunit rDNA sequences. *Mycologia*, **98**, 896–905 (2006)
- Arnold S.F., Robinson M.K., Notides A.C., Guillette Jr L.J., McLachlan J.A.: A yeast estrogen screen for examining the relative exposure of cells to natural and xenoestrogens. *Environ. Health Persp.* **104**, 544 (1996)
- Auerbach D., Arnoldo A., Bogdan B., Fetchko M.: Drug discovery using yeast as a model system: a functional genomic and proteomic view. *Curr. Proteomics*, **2**, 1–13 (2005)
- Ballantyne B.: Toxicology in fungicides. Pesticide Toxicology and International Regulation, red. T.C. Marrs, B. Ballantyne, John Wiley and Sons, 2004, s. 191–303
- Berbee M.L., Taylor J.: Ascomycete relationships: dating the origin of asexual lineages with 18S ribosomal RNA gene sequence data. W: The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematic. Edited by Reynolds, D.R. & Taylor, J.W. Wallingford: CAB International, 1993, s. 67–78
- Botstein D., Chervitz S.A., Cherry M.: Perspective GENETICS Yeast as a Model Organism. *Science*, **277**, 1259–1260 (1997)
- Botstein D., Fink G.R.: Yeast: an experimental organism for 21<sup>st</sup> century biology. *Genetics*, **189**, 695–704 (2011)
- Cabrito T.R., Teixeira M.C., Duarte A.A., Duque P., Sa-Correia I.: Heterologous expression of a Tpo1 homolog from *Arabidopsis thaliana* confers resistance to the herbicide 2,4-D and other chemical stresses in yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84**, 927–936 (2009)
- Cabrito T.R., Teixeira M.C., Singh A., Prasad R., Sa-Correia I.: The yeast ABC transporter Pdr18 (ORF YNR070w) controls plasma membrane sterol composition, playing a role in multi-drug resistance. *Biochem. J.* **440**, 195–202 (2011)
- Calhelha R.C., Andrade J.V., Ferreira I.C., Estevinho L.M.: Toxicity effects of fungicide residues on the wine-producing process. *Food Microbiol.* **23**, 393–398 (2006)
- Calviello G., Piccioni E., Boninsegna A., Tedesco B., Maggiano N., Serini S., Wolf F. I., Palozza P.: DNA damage and apoptosis induction by the pesticide mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **211**, 87–96 (2006)
- Chatterjee N., Luo Z.: Effect of two different Cr-(III)-organic compounds exposure to *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicol. Environ. Chem.* **92**, 75–88 (2010)
- Definicja.net: definicja.net/definicja/Drożdże (05/12/2014)
- Dias P.J., Teixeira M.C., Telo J.P., Sá-Correia I.: Insights into the mechanisms of toxicity and tolerance to the agricultural fungicide mancozeb in yeast, as suggested by a chemogenomic approach. *OMICS*, **14**, 211–227 (2010)
- Doostzadeh J., Davis R. W., Gaever G. N., Nislow C., Langston J.W.: Chemical genomic profiling for identifying intracellular targets of toxicants producing Parkinson's disease. *Toxicol. Sci.* **95**, 182–187 (2007)
- Dos Santos S.C., Tenreiro S., Palma M., Becker J., Sa-Correia I.: Transcriptomic profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* response to quinine reveals a glucose limitation response attributable to drug-induced inhibition of glucose uptake. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 5213–5223 (2009)
- Dos Santos S.C., Teixeira M.C., Cabrito T.R., Sá-Correia I.: Yeast Toxicogenomics: genome-wide responses to chemical stresses with impact in environmental health, pharmacology and biotechnology. *Front Genet.* **3**: 63 (2012)
- Dos Santos S.C., Teixeira M.C., Cabrito T.R., Sá-Correia I.: Yeast toxicogenomics: genome-wide responses to chemical stresses with impact in environmental health, pharmacology and biotechnology. *Toxicogenomics in non-mammalian species*, **3**, 63 (2013)
- Estève K., Poupot C., Dabert P., Mietton-Peuchot M., Milišić V.A.: *Saccharomyces cerevisiae*-based bioassay for assessing pesticide toxicity. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 1529–1534 (2009)
- Fitzpatrick D.A., Logue M.E., Stajich J.E., Butler G.: A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from super-tree and combined gene analysis. *BMC Evol. Biol.* **6**, 99–113 (2006)
- Frische T., Faust M., Meyer W., Backhaus T.: Toxic masking and synergistic modulation of the estrogenic activity of chemical mixtures in a yeast estrogen screen (YES). *Environ. Sci. Pollut. R.* **16**, 593–603 (2009)
- García M.A., Oliva J., Barba A., Cámara M.Á., Pardo F., Díaz-Plaza E.M.: Effect of fungicide residues on the aromatic composition of white wine inoculated with three *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J. Agr. Food Chem.* **52**, 1241–1247 (2004)
- GIS: gis.gov.pl (15/07/2014)
- Gniewosz M., Duszkiwicz-Reinhard W.: Comparative studies on pullulan synthesis, melanin synthesis and morphology of white mutant *Aureobasidium pullulans* B-1 and parent strain A.p.-3. *Carbohydr. Polym.* **72**, 431–438 (2008)
- Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E.J., Mewes H.W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S.G.: Life with 6000 genes. *Science*, **274**, 563–547 (1996)
- Gostinčar C., Grube M., Gunde-Cimerman N.: Evolution of fungal pathogens in domestic environments? *Fungal Biol.* **115**, 1008–1018 (2011)
- Gostinčar C., Ohm P.R.A., Kogej T., Sonjak S., Turk M., Zajc J., Zalar P., Grube M., Sun H., Han J., Sharma A., Chiniquy J., Ngan C.Y., Lipzen A., Barry K., Igor V Grigoriev I.V., Gunde-Cimerman N.: Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. *BMC Genomics*, **15**, 549 (2014)
- Guerreiro N., Staedtler F., Grenet O., Kehren J., Chibout S.D.: Toxicogenomics in drug development. *Toxicol. Pathol.* **31**, 471–479 (2003)

29. Hamadeh H.K., Amin R.P., Paules R.S., Afshari C.A.: An overview of toxicogenomics. *Curr. Issues Mol. Biol.* **4**, 45–56 (2002)
30. Hasunuma T., Sanda T., Yamada R., Yoshimura K., Ishii J., Kondo A.: Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* **10**, 1 (2011)
31. Hiren K., Vilaprinyo E., Sorribas A., Alves R.: *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. *PLoS one* **6**, 1–10 (2011)
32. Hoon S., Smith A.M., Wallace I.M., Suresh S., Miranda M., Fung E., Proctor M., Shokat K.M., Zhang C., Davis R.W., Giaever G., St Onge R.P., Nislow C.: An integrated platform of genomic assays reveals small-molecule bioactivities. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 498–506 (2008)
33. Ibrahim M.A., Bond G.G., Burke T.A., Cole P., Dost F.N., Enterline P.E., Gough M., Greenberg R.S., Halperin W.E., Mcconnell E., Munro I.C., Swenberg J.A., Zahm S.H., Graham J.D.: Weight of the evidence on the human carcinogenicity of 2,4-D. *Environ. Health Perspect.* **96**, 213–222 (1991)
34. Iwahashi Y., Hosoda H., Park J.H., Lee J.H., Suzuki Y., Kitagawa E., Iwahashi H.: Mechanisms of patulin toxicity under conditions that inhibit yeast growth. *J. Agr. Food. Chem.* **54**, 1936–1942 (2006)
35. Johnson E.A., Echavarrri-Erasun C.: Yeast Biotechnology. The Yeasts, a Taxonomic Study, 5<sup>th</sup> edn, Edited by Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. Amsterdam: Elsevier, 2011, s. 21–44
36. Kapanen A., Vikman M., Rajasärkkä J., Virta M., Itävaara M.: Biotests for environmental quality assessment of composted sewage sludge. *Waste Manag.* **33**, 1451–1460 (2013)
37. Kimura S., Tokumaru S., Kuge K.: *Eremothecium ashbyi* causes soybean yeast-spot and is associated with stink bug, *Riptortus clavatus*. *J. Gen. Plant. Pathol.* **74**, 275–280 (2008)
38. Klimiuk E., Lebkowska M.: Biotechnologia w ochronie środowiska. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa, 2004, s. 266
39. Kolle S.N., Melching-Kollmuss S., Krennrich G., Landsiedel R., van Ravenzwaay B.: Assessment of combinations of antiandrogenic compounds vinclozolin and flutamide in a yeast based reporter assay. *Regul. Toxicol. Pharm.* **60**, 373–380 (2011)
40. Komárek M., Čadková E., Chrástný V., Bordas F., Bollinger J.C.: Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. *Environ. Int.* **36**, 138–151 (2010)
41. Kucharska K., Wachowska U.: Mikrobiom liści roślin. *Post. Mikrobiol.* **53**, 352–359 (2014)
42. Kurtzman C., Fell J.W., Boekhout T.: The yeasts: a taxonomic study. 5<sup>th</sup> edn, Edited by Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T., Elsevier, Amsterdam, 2011, s. 2080
43. Kurtzman C.P.: Use of gene sequence analyses and genome comparisons for yeast systematics. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**, 325–332 (2014)
44. Kurtzman C.P., Robnett C.J.: Relationships among genera of the *Saccharomycotina* (*Ascomycota*) from multigene phylogenetic analysis of type species. *FEMS Yeast Res.* **13**, 23–33 (2013)
45. Lachance M.A., Kurtzman C.P.: The yeast genus *Tortispora* gen. nov., description of *Tortispora ganteri* sp. nov., *Tortispora mauiana* f. a., sp. nov., *Tortispora agaves* f. a., sp. nov., *Tortispora sangerardonensis* f. a., sp. nov., *Tortispora cuajimiquilana* f. a., sp. nov., *Tortispora starmeri* f. a., sp. nov. and *Tortispora phaffii* f. a., sp. nov., reassignment of *Candida caseinolytica* to *Tortispora caseinolytica* f. a., comb. nov., emendation of *Botryozyma*, and assignment of *Botryozyma*, *Tortispora* gen. nov. and *Trigonopsis* to the family *Trigonopsidaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**, 3104–3114 (2013)
46. Lamb J., Golub T.R. i wsp.: The connectivity map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science*, **313**, 1929–1935 (2006)
47. Lourenço A.B., Ascenso J.R., Sá-Correia I.: Metabolic insights into the yeast response to propionic acid based on high resolution 1H NMR spectroscopy. *Metabolomics*, **7**, 457–468 (2011)
48. Ludwig J., Schmitt M., Lichtenberg-Fraté H.: *Saccharomyces cerevisiae* as biosensor for cyto- and genotoxic activity. W: Atmospheric and Biological Environmental Monitoring, Springer Netherlands, 2009, s. 251–259
49. Mager W.H., Winderickx J.: Yeast as a model for medical and medicinal research. *Trends Pharmacol. Sci.* **26**, 265–273 (2005)
50. Maroni M., Colosio C., Ferioli A., Fait A.: Biological monitoring of pesticide exposure: a review. *Toxicology*, **143**, 1–11 (2000)
51. Martin D., Brun C., Remy E., Mouren P., Thieffry D., Jacq B.: GOToolBox: functional analysis of gene datasets based on gene ontology. *Genome Biol.* **5**, R101 (2004)
52. Matejczyk M., Zalewski P.: Związki endokrynnie aktywne i ich aktywność biologiczna. *Kosmos*, **1–2**, 17–32 (2011)
53. McCarthy A.R., Thomson B.M., Shaw I.C., Abell A.D.: Estrogenicity of pyrethroid insecticide metabolites. *J. Environ. Monitor.* **8**, 197–202 (2006)
54. Morita T., Koike H., Koyama Y., Hagiwara H., Ito E., Fukuoka T., Imura T., Machida M., Kitamoto D.: Genome sequence of the Basidiomycetous yeast *Pseudozyma antarctica* T-34, a producer of the glycolipid biosurfactants mannosylerythritol lipids. *Genome Announcements*, **1**, e00064–13 (2013)
55. Murray K.E., Thomas S.M., Bodour A.A.: Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. *Environ Pollut.* **158**, 3462–3471 (2010)
56. North M., Vulpe C.D.: Functional toxicogenomics: mechanism-centered toxicology. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 4796–4813 (2010)
57. Okubo T., Yokoyama Y., Kano K., Soya Y., Kano I.: Estimation of estrogenic and antiestrogenic activities of selected pesticides by MCF-7 cell proliferation assay. *Arch. Environ. Con. Tox.* **46**, 445–453 (2004)
58. Parsons A.B., Brost R.L., Ding H., Li Z., Zhang C., Sheikh B., Brown G.W., Kane P.M., Hughes T.R., Boone C.: Integration of chemical-genetic and genetic interaction data links bioactive compounds to cellular target pathways. *Nat. Biotechnol.* **22**, 62–69 (2004)
59. Peterson S.W., Manitchotpisit P., Leathers T.D.: *Aureobasidium thailandense* sp. nov. isolated from leaves and wooden surfaces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**, 790–795 (2013)
60. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1107/2009 z dnia 21 października 2009 r. dotyczącym dopuszczania do obrotu środków ochrony roślin.
61. Rumlova L., Dolezalova J.: A new biological test utilising the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for the rapid detection of toxic substances in water. *Environ. Toxicol. Phar.* **33**, 459–464 (2012)
62. Sa-Correia I., Teixeira M.C.: 2D electrophoresis-based expression proteomics: a microbiologist's perspective. *Expert Rev. Proteomics*, **7**, 943–953 (2010)
63. Scherens B., Goffeau A.: The uses of genome-wide yeast mutant collections. *Genome Biol.* **5**, 229 (2004)
64. Schultis T., Metzger J.W.: Determination of estrogenic activity by LYES-assay (yeast estrogen screen-assay assisted by enzymatic digestion with lyticase). *Chemosphere*, **57**, 1649–1655 (2004)
65. Schwartz D.A., Freedman J.H., Linney E.A.: Environmental genomics: a key to understanding biology, pathophysiology and disease. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 217–224 (2004)
66. Simmons P.T., Portier C.J.: Toxicogenomics: the new frontier in risk analysis. *Carcinogenesis*, **23**, 903–905 (2002)
67. Smith A.M., Ammar R., Nislow C., Giaever G.: A survey of yeast genomic assays for drug and target discovery. *Pharmacol. Ther.* **127**, 156–164 (2010)

68. Stefani A., D'Arc Felicio J. de Andréa M.: Comparative assessment of the effect of synthetic and natural fungicides on soil respiration. *Sensore*, **12**, 3243–3252 (2012)
69. Taxvig C., Hass U., Axelstad M., Dalgaard M., Boberg J., Andersen H.R., Vinggaard A.M.: Endocrine-disrupting activities in vivo of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole. *Toxicological Sci.* **100**, 464–473 (2007)
70. Teixeira M.C., Duque P., Sá-Correia I.: Environmental genomics: mechanistic insights into toxicity of and resistance to the herbicide 2,4-D. *Trends Biotechnol.* **25**, 363–370 (2007)
71. Teixeira M.C., Raposo L.R., Mira N.P., Lourenço A.B., Sá-Correia I.: Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for maximal tolerance to ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 5761–5772 (2009)
72. Teixeira M.C., Santos P.M., Fernandes A.R., Sá-Correia I.: A proteome analysis of the yeast response to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Proteomics*, **5**, 1889–1901 (2005)
73. Teixeira M.C., Telo J.P., Duarte N.F., Sá-Correia I.: The herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid induces the generation of free-radicals and associated oxidative stress responses in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**, 1101–1107 (2004)
74. Van Dijk R., Faber K.N., Kiel J.A., Veenhuis M., van der Klei I.: The methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*: a versatile cell factory. *Enzyme Microb. Tech.* **26**, 793–800 (2000)
75. Wachowska U., Głowacka K.: Antagonistic interactions between *Aureobasidium pullulans* and *Fusarium culmorum*, a fungal pathogen of winter wheat. *BioControl*, **59**, 635–645 (2014)
76. Wachowska U., Kucharska K., Jędryczka M., Łobik N.: Microorganisms as biological control agents against *Fusarium* pathogens in winter wheat. *Pol. J. Environ. Stud.* **22**, 591–597 (2013)
77. Wuster A., Madan Babu M.: Chemogenomics and biotechnology. *Trends Biotechnol.* **26**, 252–258 (2008)
78. Yeastgenome: yeastgenome.org, *Saccharomyces* Genome Database (01/01/2015)
79. Yurkov A.M., Kachalkin A.V., Daniel H.M., Groenewald M., Libkind D., de Garcia V., Zalar P., Gouliamova D.E., Boekhout T., Begerow D.: Two yeast species *Cystobasidium psychroaquaticum* f.a. sp. nov. and *Cystobasidium rietchieii* f.a. sp. nov. isolated from natural environments, and the transfer of *Rhodotorula minuta* clade members to the genus *Cystobasidium*. *A Van Leeuw. J. Microb.* **107**, 173–185 (2015)
80. Zalar P., Gostinčar C., de Hoog G.S., Uršič V., Sudhaham M., Gunde-Cimerman N.: Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Stud. Mycol.* **61**, 21–38 (2008)
81. Zhou Y., Shie F.S., Piccardo P., Montine T.J., Zhang J.: Proteasomal inhibition induced by manganese ethylene-bis-dithiocarbamate: relevance to Parkinson's disease. *Neuroscience*, **128**, 281–291 (2004)

## UDZIAŁ CZYNNIKÓW WIRULENCJI *ENTEROCOCCUS FAECALIS* W ROZWOJU CHOROÓB MIAZGI I TKANEK OKOŁOWIERZCHOŁKOWYCH

Ewa Prażmo<sup>1</sup>, Renata Godlewska<sup>2</sup>, Mirosław Kwaśny<sup>3</sup>, Agnieszka Mielczarek<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Zakład Stomatologii Zachowawczej i Endodoncji, Warszawski Uniwersytet Medyczny

<sup>2</sup>Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet Warszawski

<sup>3</sup>Instytut Optoelektroniki, Wojskowa Akademia Techniczna

Wpłynęło w czerwcu 2015 r.  
Zaakceptowano w kwietniu 2016 r.

1. Wstęp. 2. Znaczenie *E. faecalis* w zakażeniach endodontycznych zębów. 3. Czynniki wirulencji *E. faecalis*. 4. Mechanizmy zjadliwości *E. faecalis*. 5. Podsumowanie

### Virulence factors of *Enterococcus faecalis* in relation to pulp diseases and periapical infections

**Abstract:** Enterococci are Gram-positive, catalase-negative, facultative anaerobic bacteria. They inhabit the oral cavity and gastrointestinal tract in humans as normal commensals. However, they can also cause infections of the urinary tract, surgical wound infections, neonatal sepsis and endocarditis. *Enterococcus faecalis* is associated with great number of refractory endodontic infections. The prevalence of these bacteria ranges from 24 to 77% in teeth with failed endodontic treatment and *E. faecalis* very often coexists with chronic apical periodontitis. Understanding the virulence, ecology and epidemiology of *E. faecalis* is essential for limiting all kinds of diseases caused by this pathogen. This article focuses on the bacterial mechanisms related to endodontic infections and periradicular inflammatory response. The most explored virulence factors are: the aggregation substance, surface adhesins, lytic enzymes, lipoteichoic acid, sex pheromones. All of them are associated with specific stages of tissue invasion. *E. faecalis* has also developed elaborated mechanisms of antibiotic resistance, as well as the ability to organize in a biofilm and overcome low-nutrient conditions. These adaptations help in the modulation of host immune response and make *E. faecalis* very difficult to eradicate by available antibiotics and disinfectants. Recognition and understanding of the nature of this pathogen will help endodontic microbiology to completely eliminate endodontic infections for successful endodontic treatment.

1. Introduction. 2. Importance of *E. faecalis* in endodontic infections. 3. Virulence factors of *E. faecalis*. 4. Virulence mechanisms of *E. faecalis*. 5. Summary

**Słowa kluczowe:** czynniki wirulencji, *Enterococcus faecalis*, oporność

**Key words:** *Enterococcus faecalis*, resistance, virulence factors

### 1. Wstęp

Do rodzaju *Enterococcus* należą Gram-dodatnie ziarniaki, fakultatywnie beztlenowe, które w rozmazach przybierają formę krótkich łańcuchów, bądź występują w parach lub jako pojedyncze kuliste komórki [32]. Znacząca większość jest zdolna do wzrostu w przedziale temperatur 10–45°C, w obecności NaCl o stężeniu 6,5% i szerokim zakresie pH od 4,5 do 9,6. Wykazują także zdolność do przetrwania w ciągu 30 min w temperaturze 60°C. Cechą charakterystyczną enterokoków jest zdolność do hydrolizy esculiny w obecności wysokiego stężenia soli żółciowych. W teście tym stosuje się 40% żółć wołową lub 4% roztwór soli kwasów żółciowych. W tych warunkach wzrost większości bakterii jest hamowany. Enterokoki zaś hydrolizują esculinę z podłoża, co jest widoczne w postaci charakterystycznego zaciemnienia podłoża (czarny strąk wokół kolonii) [42].

Ze względu na zdolność hydrolizy argininy i wytwarzania kwasów podczas rozkładu mannitolu, sorbitolu

i sorbozy rodzaj *Enterococcus* podzielono na pięć grup. Jako drobnoustrój hydrolizujący argininę, wytwarzający kwasy w podłożu z mannitolem a nie posiadający cech kwasotwórczych w obecności sorbozy, *E. faecalis* przyporządkowany został do grupy II.

Bakterie z rodzaju *Enterococcus* występują w środowisku, np. w wodzie, glebie, roślinach, oraz jako organizmy komensalne występują w przewodzie pokarmowym oraz jamie ustnej człowieka. Jednocześnie są czynnikami etiologicznymi takich chorób jak zapalenie wśierdza, zakażenie układu moczowo-płciowego, jamy brzusznej oraz ogólne zakażenia pooperacyjne. W większości tych infekcji stwierdza się obecność *E. faecalis* (w około 80% przypadków) oraz *E. faecium* (5–25% zakażeń) [40]. Ponadto uważa się, że enterokoki są jednymi z głównych drobnoustrojów powodujących szpitalne bakteriemie. Z drugiej strony, jako bakterie mlekowe mające zdolność wytwarzania bakteriocyn, są powszechnie wykorzystywane w przemyśle spożywczym i weterynaryjnym, jako probiotyki i kultury starterowe [16].

\* Autor korespondencyjny: Warszawski Uniwersytet Medyczny, Zakład Stomatologii Zachowawczej i Endodoncji, ul. Miodowa 18, 00-246 Warszawa; tel. 22 502 20 26; e-mail: agnieszka.mielczarek@wum.edu.pl

## 2. Znaczenie *E. faecalis* w zakażeniach endodontycznych zębów

Gatunek *E. faecalis* jest jednym ze składników naturalnej mikroflory jamy ustnej. Jednocześnie jest to trudny do eradykacji patogen, odpowiedzialny za niektóre infekcje stomatologiczne. Dominuje we wtórnych przewlekłych stanach zapalnych kanałów korzeniowych. Ponadto wykrywany jest w infekcjach tkanek przyzębia oraz rzadko w przebiegu periimplantitis (zapalenie tkanek wokół implantu). Badania wykazały dodatnią korelację pomiędzy liczbą bakterii w ślinie i na powierzchni błony śluzowej jamy ustnej, a zabiegiem leczenia endodontycznego. Odnotowano wzrost liczby szczepów *E. faecalis* w obrębie jamy ustnej u osób w trakcie lub po chemo-mechanicznym opracowaniu, a następnie wypełnieniu kanałów korzeniowych [41]. U pacjentów, u których nie doszło do utraty żywotności zębów, ich poziom w ślinie i na błonie śluzowej jamy ustnej pozostaje znacząco niższy.

Obecność *E. faecalis* jest ściśle powiązana z występowaniem stanów zapalnych tkanek okolicy wierzchołka korzenia, towarzyszących pierwotnym i przetrwałym infekcjom zlokalizowanym w świetle kanałów zębowych. W przypadku zakażeń pierwotnych wykrywany jest w 4–40% przypadków, którym towarzyszą przewlekłe bezobjawowe zmiany okołowierzchołkowe [38]. Jeżeli w przebiegu pierwotnego zapalenia miazgi dochodzi do ostrego zapalenia tkanek okołowierzchołkowych, z lub bez uformowania ropnia, *E. faecalis* nie jest wykrywany. W przypadku przetrwałych stanów zapalnych endodontium, odsetek wykrywalności tego patogenu jest znacząco wyższy. Z kanałów zębowych wymagających rewizji leczenia endodontycznego *E. faecalis* izolowany jest 9-krotnie częściej niż z pierwotnych infekcji wewnątrzkanalowych [38]. Wyniki badań wykazały, że *E. faecalis* jest wykrywany w 24 do 77% przypadków przetrwałych infekcji endodontycznych, którym towarzyszą zmiany zapalne w tkankach okołowierzchołkowych [34, 38, 45, 20]. Znaczące różnice pomiędzy wynikami mogą być efektem następujących czynników: zastosowanych technik identyfikacji szczepu oraz wielkości badanej grupy [3]. W przypadku badań opartych o metodę posiewu i identyfikacji kultur bakteryjnych, rzadziej wykrywano patogen. Technika PCR (łańcuchowa reakcja polimerazy), jako metoda szybsza i bardziej czuła, potwierdziła obecność *E. faecalis* w większej liczbie leczonych kanałów.

Najnowsze doniesienia naukowe są źródłem ciekawych informacji o pochodzeniu szczepów enterokoków, wykrytych w przebiegu zakażeń korzeni zębów. W jednym z badań *E. faecalis* wyizolowany ze światła zainfekowanych kanałów nie odpowiadał genetycznie szczepom enterokoków, występujących w naturalnej mikroflorze gospodarza [58]. Obserwacji poddano

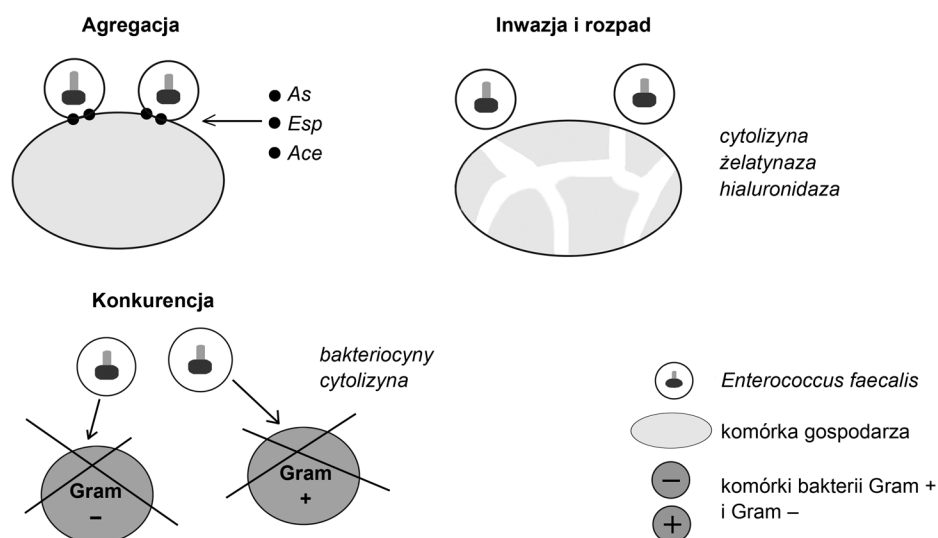
grupę 50 pacjentów. Materiał do analizy mikrobiologicznej pozyskano ze śliny, wnętrza korzeni objętych stanem zapalnym oraz z kału. Szczepy *E. faecalis* odpowiedzialne za rozwój infekcji endodontycznych nie odpowiadały genetycznie szczepom wyizolowanym z przewodu pokarmowego. Ponadto w żadnej z próbek śliny nie potwierdzono obecności tego drobnoustroju. We wszystkich poddanych obserwacji przypadkach, chorobotwórcze dla pacjentów były tylko bakterie egzogenne. Wniosek jednak wymaga dalszych badań i weryfikacji.

## 3. Czynniki wirulencji *E. faecalis*

*E. faecalis* jest drobnoustrojem o wielu skomplikowanych mechanizmach wirulencji. Ma zdolność adaptacji do warunków środowiska poprzez wytwarzanie szeregu substancji i uruchamianie procesów, które ułatwiają adhezję i inwazję komórek gospodarza, modyfikują jego odpowiedź immunologiczną oraz powodują uszkodzenia w obrębie tkanek (rys. 1).

Do najważniejszych czynników zjadliwości zalicza się:

**AS** (aggregation substance – substancja agregująca) – powierzchniowa adhezyna odpowiadająca za przyleganie enterokoków do komórek eukariotycznych oraz agregację komórek bakteryjnych, co ułatwia wymianę plazmidowego DNA pomiędzy nimi [35]. Białko AS kodowane jest przez geny umiejscowione na wyspie patogenności (PAI) i plazmidach zależnych od feromonów. Najlepiej poznanymi plazmidami zawierającymi geny kodujące białka AS są: pAD<sub>1</sub> – białko Asa1 [51], pPD<sub>1</sub> – białko Asp1 [16] oraz pCF10 – białko Asc10 [24]. Wszystkie białka AS posiadają motyw RGD (Arg-Gly-Asp) w N-końcowej części cząsteczki odpowiadający za wiązanie bakterii do powierzchni komórek eukariotycznych [56]. Ponadto białko AS przypisuje się liczne funkcje wpływające na chorobotwórczość enterokoków. Umożliwia ono enterokokom przyleganie do białek macierzy zewnątrzkomórkowej gospodarza. Jego obecność zwiększa hydrofobowość komórki bakteryjnej oraz hamuje aktywność granulocytów obojętnochłonnych, skierowaną przeciwko tym drobnoustrojom. AS jest także czynnikiem sprzyjającym koniugacji. U bakterii Gram-dodatnich koniugacja jest warunkowana obecnością związków powodujących agregację komórek, a nie wytwarzaniem pili płciowych, jak u bakterii Gram-ujemnych. Koniugacyjny transfer plazmidowego DNA pomiędzy komórkami *E. faecalis*, powoduje rozprzestrzenianie się oporności na antybiotyki wśród szczepów enterokoków. Ponadto, w zakażeniach układów pokarmowego i moczowego AS zwiększa poziom adhezji do komórek nabłonkowych przewodu pokarmowego i nerek [26]. Substancja agregująca ma także działanie synergistyczne z cytolizyną – innym

Rys. 1. Czynniki zjadliwości *E. faecalis* i ich rola

czynnikiem wirulencji enterokoków [4]. W badaniu przeprowadzonym na królikach oceniano śmiertelność w wyniku zapalenia wśierdza spowodowanego infekcją *E. faecalis*, w zależności od możliwości wytwarzania przez te bakterie substancji agregującej i cytolizyny. Statystycznie znamienne wyższą śmiertelność wykazano w grupie zwierząt, gdzie źródłem infekcji był szczep posiadający geny odpowiedzialne za wytwarzanie zarówno AS jak i cytolizyny [4].

**Ace** (adhesion of collagen from *E. faecalis*) jest białkiem powierzchniowym o masie cząsteczkowej 74 kDa, które wraz z AS bierze udział w kolonizacji tkanek gospodarza. Cząsteczka białka Ace zbudowana jest z: N-terminalnego końca utworzonego z 31 aminokwasów, domeny A o 335 aminokwasach, domeny B składającej się z 4,5-krotnego powtórzenia 47 rodnikowych jednostek, końcowego regionu C zakotwiczonego w ścianie komórkowej przez tzw. motyw LPXTG (leucyna, prolina, X-dowolny aminokwas, treonina, glicyna). Ace należy do grupy powierzchniowych komponentów MSCRAMM (microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules), gdyż posiada zdolność wiązania się z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej [25].

Białko Ace posiada zdolność łączenia się z kolagenem typu I i IV. Zawiera motyw homologiczny do domeny wiążącej kolagen, występującej w białku Cna u *Staphylococcus aureus*. Podobną homologię w budowie potwierdzono również w stosunku do białka Acn występującego u *E. faecium* i odpowiedzialnego za wiązanie do kolagenu typu I. Białka Acn *E. faecium* i Ace *E. faecalis* wykazują podobieństwa w budowie domeny A [32].

**Esp** (enterococcal surface protein) jest białkiem o masie cząsteczkowej przekraczającej 200 kDa, związanym ze ścianą komórkową bakterii. Gen *esp* ma specy-

ficzną strukturę, zawiera 3 bloki licznych tandemowych powtórzeń. Znaczenie tych struktur nie zostało jednoznacznie stwierdzone. Podejrzewa się, że umożliwiają one powstawanie różnych wariantów białka Esp, co pozwala na efektywne unikanie mechanizmów obronnych układu odpornościowego gospodarza [36]. Białko Esp przypisuje się również bardzo ważną rolę – udział w procesie tworzenia biofilmu [51]. Szczepy *E. faecalis* z mutacjami w genie *esp* traciły zdolność do tworzenia biofilmu w warunkach doświadczalnych. Wzrost enterokoków w postaci biofilmu pozwala na zwiększenie oporności bakterii na antybiotyki i spadek podatności na fagocytozę i mechanizmy obronne układu immunologicznego [9].

Białka adhezyjne enterokoków biorą udział w kolonizacji, pierwszym stadium inwazji tkanek gospodarza. Szczepy *E. faecalis* wytwarzają także substancje o właściwościach toksycznych oraz destrukcyjnych dla atakowanego organizmu: cytolizyna Cyl, żelatynaza GelE, hialuronidaza Hyl oraz proteaza serynowa SpreE.

**Cytolizyna Cyl** (zwana też hemolizyną) jest jedną z toksyn produkowanych przez enterokoki. Cytolizyna jest bakteriocyną zaliczaną do grupy lantybiotyków. Powoduje rozpad erytrocytów (wywołuje hemolizę typu  $\beta$ ), leukocytów obojętnochłonnych i makrofagów. Posiada także właściwości bójcze w stosunku do wielu bakterii Gram-dodatnich [19]. Szczepy *E. faecalis* wytwarzające cytolizynę charakteryzują się większą zjadliwością w porównaniu do szczepów cytolizynonegatywnych [57]

**Żelatynaza GelE** jest wydzielaną zewnątrzkomórkowo endopeptydazą zależną od jonów cynku. Enzym ten hydrolizuje kolagen, hemoglobinę, kazeinę, żelatynę, w następstwie czego dochodzi do powstawania zmian patologicznych w tkankach [46]. Białko o takiej samej aktywności jest również wytwarzane

w organizmie człowieka przez komórki zapalne, nabłonkowe, fibroblasty oraz osteoklasty, i uczestniczy w procesach przebudowy tkanek. Żelatynaza w podwyższonych stężeniach wykrywana jest w chorobach przyzębia, infekcjach miazgi i zmianach okołowierzchołkowych [43]. Rozpad kolagenu w tych stanach patologicznych ma działanie chemotaktyczne w stosunku do monocytów, makrofagów, neutrofilów, aktywuje produkcję reaktywnych form tlenu i enzymów litycznych, a zatem jest inicjatorem uszkodzeń prozapalnych. Analogiczne znaczenie przypisuje się bakteryjnej hialuronidazie, która poprzez indukcję tych samych mechanizmów może pełnić istotną funkcję w patogenie zapalenia okołowierzchołkowych.

**Hialuronidaza** jest enzymem, który powoduje rozkład kwasu hialuronowego. W następstwie wytwarzania hialuronidazy przez szczepy *E. faecalis*, dochodzi do niszczenia tkanki chrzęstnej i kostnej [25]. Obecność *E. faecalis* w zmianach okołowierzchołkowych może wynikać z właściwości osteolitycznych hialuronidazy [1]. Wytwarzanie hialuronidazy może ułatwiać patogenom migrację z kanału korzeniowego do okolicy okołowierzchołkowej. Jednakże teoria ta, choć pojawia się w piśmiennictwie wielokrotnie, wymaga dalszych badań i potwierdzenia.

W mechanizmach wirulencji enterokoków biorą także udział tzw. **feromony płciowe**. Są to krótkie hydrofobowe peptydy, które pełnią rolę swoistego sygnału w procesie wymiany materiału genetycznego pomiędzy szczepami *E. faecalis* [10]. Komórka bakteryjna potencjalnego biorcy wydziela feromon, który oddziałuje z białkami dawcy kodowanymi plazmidowo, aktywując gen AS, czego następstwem jest rozpoczęcie koniugacji. Wytwarzane feromony są swoiste dla konkretnych plazmidów, np.: feromon cAD1 – plazmid pAD1.

W ten sposób, na drodze horyzontalnego transferu genów, bakterie uzyskują i modyfikują swoją odporność na antybiotyki (plazmid warunkujący oporność na tetracyklinę pCF10, feromon cCF10) [5], możliwość wytwarzania innych czynników wirulencji, np. cytolyzyny (plazmid kodujący aktywność cytolyzyny pOB1, feromon cOB1) [7]. Niektóre feromony płciowe posiadają także właściwości chemotaktyczne dla neutrofilów oraz powodują wzrost wytwarzania przez nie enzymów lizosomalnych oraz zewnątrzkomórkowych nadtlenków [12]. Zwiększone miano enzymów lizosomalnych skorelowane jest natomiast z rozwojem wielu stanów patologicznych zębów i tkanek przyzębia, takich jak przewlekła choroba przyzębia oraz zmiany okołowierzchołkowe związane z zapaleniem miazgi. Enzymy lizosomalne wpływają także na resorpcje kości wyrostka zębodołowego poprzez destrukcję oraz hamowanie tworzenia nowej tkanki kostnej [52].

**Kwas lipotejchowy (LTA)** jest związkem organicznym zawierającym część lipidową diacylglicerolową

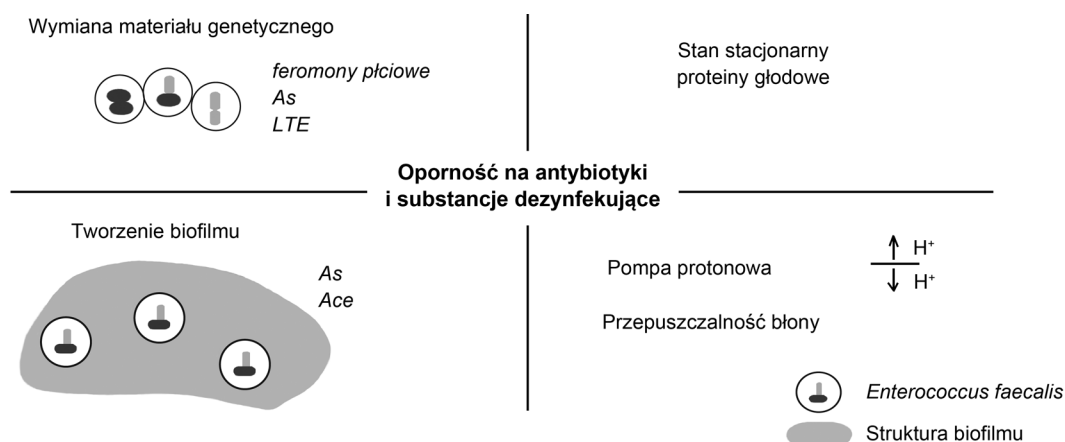
oraz powtarzające się jednostki glicerofosforanowe. LTA jest wbudowany w błonę komórkową bakterii Gram-dodatnich. Pełni funkcję receptora w agregacji i koniugacji plazmidów bakteryjnych pomiędzy komórkami enterokoków [11]. Jednak jego zasadniczą rolą jest stymulacja odpowiedzi prozapalnej w reakcji na czynnik infekcyjny. Następuje to poprzez pobudzenie leukocytów do wzmożonego uwalniania cytokin, takich jak: TNF alfa, IL-1beta, IL-6, makrofagów do produkcji prostaglandyny PGE2 oraz monocytów do wytwarzania anionów nadtlenowych [56]. Wszystkie wymienione wyżej czynniki wykrywane są w zmianach okołowierzchołkowych i odpowiadają za uszkodzenia tkanek tej okolicy w przebiegu procesów zapalnych. Inne znaczenie LTA to stymulacja uwalniania mediatorów w fazie ostrej, co powoduje wzrost przepuszczalności naczyń krwionośnych oraz angiogenezę. Natomiast poprzez hamowanie wytwarzania śródbłonkowych czynników wzrostu zaburza angiogenezę, wpływając na powolny rozwój przewlekłych stanów patologicznych okolicy otaczającej wierzchołek zęba [54]. Typowym ich objawem jest rozrzedzenie i zniszczenie struktury kostnej, a LTA może mieć istotny wpływ w przebiegu tego procesu. Badania *in vitro* wykazały ponadto wpływ kwasu lipotejchowego na indukcję apoptozy ludzkich komórek osteoblastycznych [49] oraz wpływ na ekspresję związków regulujących dojrzewanie komórek osteoklastycznych: ligandu RANKL na osteoblastach i osteoprotegryny OPG [59]. Wzrost ekspresji RANKL z jednoczesną redukcją ekspresji OPG stymuluje proces różnicowania, dojrzewania i aktywacji osteoklastów, powodując niszczenie tkanki kostnej w przebiegu chorób przyzębia [59].

Laboratoryjna ocena podatności komórek bakteryjnych na działanie antybiotyków dostarczyła innych ważnych informacji na temat znaczenia cząsteczek LTA. Potwierdzono rolę kwasu lipotejchowego w wytwarzaniu oporności na przenikanie antybiotyków do wnętrza komórek, w zmniejszaniu wrażliwości na działanie detergentów oraz wzmocnienie przeżywalności enterokoków w środowisku pozbawionym składników odżywczych [44]. Kwas lipotejchowy może być tym samym odpowiedzialny za brak skuteczności opatrunków wewnątrzkanałowych, aplikowanych w trakcie leczenia endodontycznego, mających na celu eradykację *E. faecalis*.

#### 4. Mechanizmy zjadliwości *E. faecalis*

Warunkiem uznania bakterii za chorobotwórcze jest posiadanie przez nie zdolności do przylegania, wnikania i wzrostu w tkankach. Zjadliwość bakterii jest ponadto warunkowana przez mechanizmy obronne, pozwalające unikać działania systemu odpornościo-





Rys. 2. Mechanizmy zjadliwości *E. faecalis* warunkujące oporność na substancje dezynfekujące i antybiotyki

wego gospodarza i jednocześnie umożliwić współzawodnictwo o przetrwanie z innymi bakteriami bytującymi w tej samej niszy (Rys. 2).

W obrębie jamy ustnej miejscem bytowania chorobotwórczych szczepów *E. faecalis* jest wewnątrz korzeni zębowych. Po wnikięciu do kanału korzeniowego *E. faecalis* kolonizuje ścianę zębinową. Poprzez kwas lipotejchojowy wiąże się z częścią mineralną zębów, natomiast dzięki adhezynie powierzchniowej Ace przylega do kolagenu. Środowisko to charakteryzuje się szeregiem niesprzyjających czynników bytowych: niedobór składników pokarmowych, obecność innych bakterii i ich toksyn oraz działanie różnego rodzaju chemioterapeutyków. Patogen wytworzył szereg mechanizmów przystosowawczych do bytowania w tych warunkach. Posiada zdolność wnikania do wnętrza kanalików zębiny, gdzie staje się niewidoczny dla immunologicznego układu odpornościowego gospodarza. W środowisku tlenowym, bogatym w składniki odżywcze *E. faecalis* wnika do wnętrza kanalików zębiny na średnią głębokość 1483  $\mu\text{m}$ . W warunkach beztlenowych głębokość wnikania zmniejsza się do 1166  $\mu\text{m}$ , a najmniejszą głębokość kolonizacji kanalików, na poziomie 620  $\mu\text{m}$  osiąga w środowisku beztlenowym, pozbawionym składników odżywczych [22]. Po zaaplikowaniu do światła kanału korzeniowego wodorotlenku wapnia, związku powszechnie stosowanego w leczeniu endodontycznym, pH gwałtownie wzrasta. Jednak w głębi kanalików zębiny, daleko od światła kanału głównego, pH pozostaje na znacząco niższym poziomie, a bakterie bytujące w tym obszarze są mniej narażone na działanie uszkodzających substancji chemicznych [53]. Pomiar wykonany na powierzchni korzenia po dokanałowej aplikacji pasty wodorotlenkowo-wapniowej, wykazywały wartości pH 7,3–8,9, nie wywierające negatywnego wpływu na wzrost bakterii [29, 30]. Utrzymanie odpowiednio niskiego pH jest także możliwe dzięki działaniu pasywnych i aktywnych mechanizmów obronnych bakterii. Mechanizmem pasywnym

jest przepuszczalna błona *E. faecalis* pozwalająca na swobodny przepływ jonów, zaś aktywnym – działanie pompy protonowej, będącej integralną częścią błony. Transport protonów do komórki wspomaga utrzymanie wewnętrznej hemostazy jonowej i odczynu kwasowo-zasadowego na odpowiednio niskim poziomie [47]. Przy pH środowiska przewyższającym 11,5 *E. faecalis* nie jest zdolny do przetrwania [13]. Wyżej opisane kompensacyjne mechanizmy wewnętrzne patogenu pozostają nieaktywne. Jednak zębina kolonizowana przez bakterie, także posiada zdolności buforujące i w warunkach *in vivo* niemożliwe jest utrzymanie stałego pH na tak wysokim poziomie [18, 53]. Niskie pH, jako jeden z czynników stresowych, wpływa również na zmianę metabolizmu komórki bakteryjnej. Zwiększa się synteza i transport nukleotydów, a zmniejsza ekspresja genów odpowiedzialnych za wytwarzanie energii, metabolizm węglowodanów i aminokwasów [37].

*E. faecalis* wytwarza cytolizynę oraz szereg bakteriocyn o działaniu toksycznym na inne bakterie, zarówno Gram-dodatnie jak i Gram-ujemne [33]. Dzięki temu, w przetrwałych przewlekłych infekcjach endodontycznych, liczba gatunków bakterii innych niż enterokoki jest niska.

Enterokoki rozwinęły mechanizmy adaptacyjne do życia w środowisku o ograniczonym dostępie do składników odżywczych. Wytwarzana hialuronidaza powoduje depolimeryzację kwasu hialuronowego dostępnego w zębinie. Produkty rozpadu kwasu hialuronowego wykorzystywane są następnie w podstawowych procesach metabolicznych. Innym źródłem bakteryjnych substratów pokarmowych są składniki płynu surowiczego, występujące w kanalikach zębiny. Niedostatecznie szczelne zamknięcie otworu wierzchołkowego w przebiegu leczenia endodontycznego stanowi drogę przepływu dla surowicy i umożliwia dostęp do składników odżywczych. Jednak, gdy źródła energii zostaną drastycznie ograniczone, bakterie przechodzą w tzw. stan stacjonarny [37]. Komórki spowalniają i ograniczają

metaboliczne procesy syntezy oraz zmniejszają swoje rozmiary [27]. Po kilku tygodniach bytowania w warunkach oligotropowych powierzchnia komórki staje się wyraźnie pofałdowana z licznymi zagłębieniami. W odróżnieniu od komórek w fazie logarytmicznej, w fazie stacjonarnej komórki organizują się w pary. W stanie tym utrzymywana jest synteza specyficznych białek głodowych [21]. W jednym z badań podjęto próbę wyizolowania białek wytwarzanych przez komórki bakteryjne w środowisku pozbawionym glukozy oraz substratów pokarmowych. W warunkach oligotrofowych zidentyfikowano 51 białek O (O – oligotrophic proteins), natomiast całkowite ograniczenie dostępu glukozy skutkowało syntezą 42 białek Gls (Gls – glucose starvation-inducible proteins). W obu grupach badawczych stwierdzono występowanie 16 białek o tej samej strukturze. Autorzy badania uznali je za kluczowe w rozwoju stanu stacjonarnej bakterii *E. faecalis* i ich długoczasowej odporności na nieprzyjające warunki bytowe. W innym doświadczeniu poddano ocenie wrażliwość komórek bakteryjnych na działanie różnego rodzaju czynników fizycznych i chemicznych, po wcześniejszej inkubacji w środowisku pozbawionym glukozy [17]. Badane szczepy *E. faecalis*, przy braku dostępu do glukozy, wykazały wzrost odporności na następujące czynniki stresowe: wysoką temperaturę, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, odczyn kwaśny, etanol oraz podchloryn sodu stosowany w leczeniu endodontycznym zębów. Zmiany morfologiczne w budowie komórki bakteryjnej i synteza specyficznych białek stresowych (O i Gls), zachodzące w warunkach stresowych, stanowią element mechanizmów obronnych szczepu *E. faecalis*. Mechanizmy te mogą jednocześnie być odpowiedzialne za brak podatności komórek bakteryjnych na terapię stanów zapalnych korzeni zębowych [28].

Gatunek *E. faecalis* posiada zdolność formowania biofilmu. Biofilm definiowany jest jako wysoce zorganizowane skupisko bakterii otoczone białkowo-polisacharydową substancją – macierzą, która stanowi ok. 85% tej struktury [36]. Organizacja komórek bakteryjnych w strukturze biofilmu sprzyja wymianie pomiędzy nimi materiału genetycznego na drodze koniugacji. Ponadto zdolność formowania biofilmu ma kluczowe znaczenie dla rozwoju bakteryjnej odporności na działanie antybiotyków, chemioterapeutyków i substancji dezynfekujących, stosowanych w leczeniu endodontycznym. Istnieje kilka hipotez wyjaśniających to zjawisko. Pierwsza teoria mówi o zwolnionej, utrudnionej penetracji antybiotyków poprzez macierz biofilmu. Środki chemiczne są potencjalnie dezaktywowane w trakcie penetracji biofilmu [2] lub też absorbowane przez macierz otaczającą bakterie [7]. Badania laboratoryjne potwierdziły utrudnioną penetrację tej struktury przez związki chloranu stosowane w trakcie chemo-mechanicznego opracowania kanałów korzeniowych

[8]. Inna hipoteza zakłada zróżnicowanie środowiska chemicznego w obrębie biofilmu. Badania Hu i współpracowników wykazały, że na powierzchni biofilmu dochodzi do całkowitej konsumpcji tlenu, co powoduje zmianę mikrośrodowiska wewnątrz biofilmu na beztlenowe [24] i uniemożliwia tym samym działanie niektórych antybiotyków. Założenie to zostało potwierdzone w laboratoryjnej analizie skuteczności aminoglikozydów, która to była znacząco niższa w warunkach beztlenowych [48]. Wedle innej hipotezy enterokoki zorganizowane w biofilmie przyjmują specyficzny stan fenotypowy cechujący się wysoką odpornością na uszkodzające działanie substancji chemicznych [14]. Wszystkie powyższe hipotezy o roli biofilmu w mechanizmach obronnych enterokoków potwierdzają wysoki stopień zorganizowania i złożoność tej struktury.

## 5. Podsumowanie

*E. faecalis* jest organizmem komensalnym dla człowieka. W warunkach normalnych bytuje w jamie ustnej. W warunkach patologicznych, gdy dojdzie do zakażenia i rozwoju stanu zapalnego, wykrywany jest w przebiegu chorób miazgi i tkanek okołowierzchołkowych, a szczególnie w przetrwałych infekcjach endodontycznych. *E. faecalis* posiada złożone mechanizmy wirulencji umożliwiające kolonizację korzenia zębowego oraz przetrwanie w niesprzyjającym pH, w warunkach o ograniczonym dostępie substratów pokarmowych i glukozy. Białka adhezyjne AS, Ace i Esp umożliwiają enterokokom przyleganie do komórek gospodarza. Enzymy lityczne cytolizyna Cyl, żelatynaza GelE, hialuronidaza Hyl oraz proteza serynowa SpreE mają działanie toksyczne i powodują uszkodzenie atakowanych tkanek. W przebiegu zakażeń korzeni zębowych, po zastosowaniu konwencjonalnej terapii chemo-mechanicznej szczepy *E. faecalis* nie ulegają kompletnej eradykacji. Ze względu na wzrastającą oporność antybiotykowej bakterie są niepodatne na powszechnie stosowane w endodoncji środki do dezynfekcji i chemioterapeutyki. *E. faecalis* posiada także zdolność tworzenia biofilmu oraz zasiedlania wnętrza kanałów zębinowych, w wyniku czego staje się niewidoczny dla systemu odpornościowego gospodarza. *E. faecalis* jest drobnoustrojem, który wytworzył bardzo skomplikowane mechanizmy adaptacyjne. Niewątpliwie mikrobiologia endodontyczna musi skupić się na dokładnym ich zdefiniowaniu i zrozumieniu. Konieczne jest podjęcie nowych strategii leczenia chorób miazgi i tkanek endodontycznych, skierowanych bezpośrednio na zneutralizowanie tych czynników i mechanizmów wirulencji. Tylko dogłębne poznanie patogenu pozwoli na zapobieganie występowania zakażeń oraz minimalizację skutków ich występowania.

## Piśmiennictwo

- Abou-Rass M., Bogen G.: Microorganisms in closed periapical lesions. *Int. Endod. J.* **31**, 39–47 (1998)
- Anderl J.N., Franklin M.J., Stewart P.S.: Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1818–1824 (2000)
- Baumgartner J.C., Siqueira J.F., Xia T., Rocas I.N.: Geographical differences in bacteria detected in endodontic infection using polymerase chain reaction. *J. Endod.* **30**, 141–144 (2004)
- Chow J.W., Thal L.A., Perri M.B., Vazquez J.A., Donabedian S.M., Clewell D.B., Zerwos J.M.: Plasmid associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 274–277 (1993)
- Chatterjee A., Cook L.C., Shu C.C., Chen Y., Manias D.A., Ramkrishna D., Dunny G.M., Hu W.S.: Antagonistic self-sensing and mate-sensing signaling controls antibiotic-resistance transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 7086–7090 (2013)
- Clewell D.B., Weaver K.E.: Sex pheromones and plasmid transfer in *Enterococcus faecalis*. *Plasmid*, **21**, 175–184 (1989)
- Costerton J.W.: Introduction to biofilm. *Int. J. Antimicrobial Agents*, **11**, 217–222 (1999)
- De Beer D., Srinivasan R., Stewart P.S.: Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4339–4344 (1994)
- Distel J.W., Hatton J.F., Gillespie M.J.: Biofilm formation in medicated root canals. *J. Endod.* **28**, 689–693 (2002)
- Dunny G.M.: *Enterococcal* sex pheromones: signaling, social behavior, and evolution. *Annu. Rev. Genet.* **47**, 457–482 (2013)
- Ehrenfeld E.E., Kessler R.E., Clewell D.B.: Identification of pheromone-induced surface proteins in *Streptococcus faecalis* and evidence of a role for lipoteichoic acid in formation of mating aggregates. *J. Bacteriol.* **168**, 6–12 (1989)
- Ember J.A., Hugli T.E.: Characterization of the human neutrophil response to sex pheromones from *Streptococcus faecalis*. *Am. J. Pathol.* **134**, 797–805 (1989)
- Evans M., Davies J.K., Sundqvist G., Figdor D.: Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int. Endod. J.* **35**, 221–228 (2002)
- Foley I., Gilbert P.: In-vitro studies of the activity of glycopeptide combination against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* **40**, 667–672 (1997)
- Foulquie M., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., De Vuyst L.: The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food. Microbiol.* **106**, 1–24, (2006)
- Galli D.A., Friesenegger A., Wirth R.: Transcriptional control of sex-pheromone-inducible genes on plasmid pAD1 of *Enterococcus faecalis* and sequence analysis of a third structural gene for (ppD1-encoded) aggregation substance. *Mol. Microbiol.* **6**, 1297–1308 (1992)
- Giard J.C., Hartke A., Flahaut S., Benachour A., Boutibonnes P., Auffray Y.: Starvation-induced multiresistance in *Enterococcus faecalis* JH2-2. *Curr. Microbiol.* **32**, 264–271 (1996)
- Haapasalo H.K., Sirén E.K., Waltimo T.M.T., Ørstavik D., Haapasalo M.P.P.: Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int. Endod. J.* **33**, 126–131 (2000)
- Hallgren A., Claesson C., Saeedi B., Monstein H., Hanberger H., Nilsson L.E.: Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein and cytolysin genes and *in vitro* adhesion to urinary catheters of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* of clinical origin. *Int. J. Med. Microbiol.* **299**, 323–332 (2008)
- Hancock H.H., Sigurdsson A., Trope M., Moiseiwitsch J.: Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North Am population. *Oral Surg. Oral Med. Oral Radiol. Endod.* **91**, 579–586 (2001)
- Hartke A., Giard J.C., Laplace J.M., Auffray Y.: Survival of *Enterococcus faecalis* in an oligotrophic microcosm: changes in morphology, development of general stress resistance, and analysis of protein synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4238–4245 (1998)
- Hedge V.: *Enterococcus faecalis*; clinical significance and treatment considerations. *Endodontology*, **2**, 48–52 (2009)
- Hu K.D., Stewart P.S., Xia F., Huang C.T., McFeters G.A.: Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4035–4039 (1998)
- Kao S.M., Olmsted S.B., Viksnins A.S., Gallao J.C., Dunny G.M.: Molecular and genetic analysis of a region of plasmid pCF10 containing positive control genes and structural genes encoding surface proteins involved in pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **173**, 7650–7664 (1991)
- Kayaoglu G., Ørstavik D.: Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* **15**, 308–320 (2004)
- Kret B., Marre R., Schramm U., Wirth R.: Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect. Immun.* **60**, 25–30 (1992)
- Kjelleberg S., Albertson N., Flardh K., Holmquist L., Jouper-Jaan A., Marouga R., Ostling J., Svenblad B., Weichart D.: How do not-differentiating bacteria adapt to starvation? *Antonie van Leeuwenhoek*, **63**, 333–341 (1993)
- Laplace J.M., Thuault M., Hartke A., Boutibonnes P., Auffray Y.: Sodium hypochlorite stress in *Enterococcus faecalis*: influence of antecedent growth conditions and induced proteins. *Curr. Microbiol.* **34**, 284–289 (1997)
- Maniglia-Ferreira C., de Almeida Gomes F., Soares de Lima Guimarães N.L., de Moraes Vitoriano M., Ximenes T.A.: Alves dos Santos R. *In vitro* analysis of the pH alteration of the dentine after using different calcium hydroxide-based pastes. *RSBO*. **10**, 122–127 (2013)
- Montero J.C., Mori G.G.: Assessment of ion diffusion from a calcium hydroxide-propolis paste through dentin. *Braz. Oral. Res.* **26**, 318–322 (2012)
- Murray B.E.: The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**, 46–65 (1990)
- Nallapareddy S.R., Weinstock G.M., Murray B.E.: Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acm, a new member of the MSSCRAMM family. *Mol. Microbiol.* **47**, 1733–1747 (2003)
- Nes I.F., Diep D.B., Ike Y.: Enterococcal bacteriocins and antimicrobial proteins that contribute to niche control (w) Gilmore M.S., Clewell D.B., Ike Y, Shankar N.: Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston, 2014
- Peciulienė V., Reynaud A.H., Balciuniene I., Haapasalo M.: Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int. Endod. J.* **34**, 429–434 (2001)
- Piekarska K.: Enterokoki – czynniki wirulencji i chorobotwórczość. *Post. Mikrobiol.* **45**, 195–207 (2006)
- Portenier I., Waltimo T.M.T., Haapasalo M.: *Enterococcus faecalis* – the root canal survivor and star in post treatment disease. *Endodontic topics*, **6**, 135–159 (2006)
- Ran S., Liu B., Jiang W., Sun Z., Liang J.: Transcriptome analysis of *Enterococcus faecalis* in response to alkaline stress. *Front. Microbiol.* **6**, 795 (2015)
- Rocas I.N., Siqueira J.F., Santos K.R.M.: Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J. Endod.* **30**, 315–320 (2004)

39. Rich R.L., Kreikemeyer B., Owens R.T., LaBrenz S., Naraya S.V.L., Weinstok G.M., Murray B.E., HooK M.: Ace is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. *J. Biol. Chem.* **274**, 26939–26945 (1999)
40. Ruoff K.L., de la Maza L., Murtagh M.J., Spargo J.D., Ferraro M.J.: Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 435–437 (1990)
41. Sedgley C.M., Lennan S.L., Clewell D.B.: Prevalence, phenotype, and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiol. Immunol.* **19**, 95–101 (2004)
42. Sherman J.M.: The Streptococci. *Bacteriol. Rev.* **1**, 3–97 (1937)
43. Shin S.J., Lee J., Baek S.H., Lim S.S.: Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. *J. Endod.* **28**, 313–315 (2002)
44. Shungu D.L., Cornett J.B., Shockman G.D.: Morphological and physiological study of autolytic – defective *Streptococcus faecium* strains. *J. Bacteriol.* **138**, 598–608 (1979)
45. Siqueira J.F., Rocas I.: Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg. Oral Med. Oral Radiol. Endod.* **97**, 85–94 (2004)
46. Steck N., Hoffmann N., Sava I.G., Kim S.C., Hahne H, Tonkonogy S.L., Mair K., Krueger D., Pruteanu M., Shanahan F, Vogelmann R., Schemann M., Kuster B., Sartor R.B., Haller D.: *Enterococcus faecalis* Metalloprotease Compromises Epithelial Barrier and Contributes to Intestinal Inflammation. *Gastroenterology*, **141**, 959–971 (2011)
47. Stuart Ch.H., Schwartz S.A., Beeson T.J., Owatz C.B.: *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J. Endod.* **32**, 293–298 (2006)
48. Tack K.J., Sabath L.D.: Increased minimum inhibitory concentrations with anaerobiasis for tobramycin, gentamycin, and amikacyn, compared to latamoxef piperacyllin, chloramphenicol, and clindamycin. *Chemotherapy*, **3**, 204–210 (1985)
49. Tian Y., Zhang X., Zhang K., Song Z., Wang R., Huang S, Lin Z.: Effect of *Enterococcus faecalis* lipoteichoic acid on apoptosis in human osteoblast-like cells. *J. Endod.* **39**, 632–637 (2013)
50. Toledo-Arana A., Valle J., Solano C., Arrizubieta M.J., Cuarella C., Lamata M., Amorena B., Leiva J., Penades J.R., Lasa I.: The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 4538–4545 (2001)
51. Tomich P.K., An F.Y., Damle S.P., Clewell D.B.: Plasmid-related transmissibility and multiple drug resistance in *Streptococcus faecalis* subsp. *zymogenes* strain DS16. *Antimicrob. Agents Chemother.* **15**, 828–830 (1997)
52. Torabinejad M., Eby W.C., Naidorf I.J.: Inflammatory and immunological aspects of the pathogenesis of human periapical lesions. *J. Endod.* **11**, 479–488 (1985)
53. Tronstad L., Andreasen J.O., Hasselgren G., Kristerson L., Riis I.: pH changes in dentinal tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *J. Endod.* **7**, 17–21 (1989)
54. Wada K., Fujii E., Ishida K., Yoshioka T., Muraki T.: Effect of lipoteichoic acid on dermal vascular permeability in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **294**, 280–286 (2000)
55. Wang S., Liu K., Seneviratne C.J., Li X., Cheung G.S., Jin L., Chu C.H., Zhang C.: Lipoteichoic acid from an *Enterococcus faecalis* clinical strain promotes TNF- $\alpha$  expression through the NF- $\kappa$ B and p38 MAPK signaling pathways in differentiated THP-1 macrophages. *Biomed. Rep.* **5**, 697–702 (2015)
56. Waters Ch.M., Wells C.L., Dunny G.M.: The aggregation domain of aggregation substance, not the RGD motifs, is critical for efficient internalization by HT-29 enterocytes. *Infect. Immun.* **71**, 5682–5689 (2003)
57. Van Tyne D., Martin M.J., Gilmore M.S.: Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. *Toxins*, **5**, 895–911 (2013)
58. Vidana R., Sullivan A., Billström H., Ahlquist M., Lund B.: *Enterococcus faecalis* infection in root canals – host-derived or exogenous source? *Lett. Appl. Microbiol.* **52**, 109–115 (2010)
59. Zhao L., Chen J., Cheng L., Wang X., Du J., Wang F., Peng Z.: Effects of *Enterococcus faecalis* lipoteichoic acid on receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin expression in periodontal ligament fibroblasts. *Int. Endod. J.* **47**, 163–172 (2013)

# MODULACJA HUMORALNEJ ODPOWIEDZI ODPORNOŚCIOWEJ GĄSIENIC *GALLERIA MELLONELLA* PRZEZ ENZYMY PROTEOLITYCZNE BAKTERII *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Mariola Andrejko<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Zakład Immunobiologii, Instytut Biologii i Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii, UMCS

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

1. Wstęp. 2. Barciak większy (*Galleria mellonella*) jako organizm modelowy. 3. Wrażliwość gąsienic *G. mellonella* na zakażenie *P. aeruginosa*. 4. Wpływ proteaz *P. aeruginosa* na reakcje immunologiczne gąsienic *G. mellonella*. 4.1. Układ oksydazy fenolowej. 4.2. Lizozym (muramidaza, glikohydrolaza mukopeptydowa, EC 3.2.1.17). 4.3. Peptydy o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych (peptydy odpornościowe). 4.4. Apolipoforyna III (apoLp-III). 5. Podsumowanie

## Modulation of the humoral immune response in *Galleria mellonella* larvae by proteolytic enzymes produced by *Pseudomonas aeruginosa*

**Abstract:** The greater wax moth *G. mellonella* is a useful model organism for investigations of pathogenicity and identification of *P. aeruginosa* virulence factors. Strains differing in the protease profiles elicit different responses of the *G. mellonella* immune system to infection. The immune response depends on the bacterial strain used and the composition of the bacterial culture medium. Proteases in the initial phase of infection activate the immune system (involving increased lysozyme synthesis, induction of synthesis of immune peptides and metalloproteinase inhibitors, and altered apolipoprotein III levels), thereby increasing the antibacterial activity of insect hemolymph. As bacteraemia progresses, they overcome the humoral immune response of the host by inhibiting the phenoloxidase activity, degradation of immune peptides and apolipoprotein III. Different proteases exhibit different involvement in the degradation of key elements of insect immune response and/or proteins, while immune peptides display varied sensitivity to proteolytic activity. Elastase B has a double role during infection: it is an inducer of immune response (involving induction of antimicrobial peptide synthesis and metalloproteinase inhibitors, and increasing expression and activity of lysozyme and the level of apolipoprotein III) and a virulence factor involved in the degradation of antimicrobial peptides. Increased quantities and activity of lysozyme in the hemolymph of larvae infected with the *P. aeruginosa* indicates that lysozyme is not very sensitive to the activity of bacterial proteases. Induction of synthesis of humoral immune response factors in *G. mellonella* larvae in the presence of metalloproteinases (elastase B) implies the “danger” resistance model in this organism.

1. Introduction. 2. Greater wax moth *Galleria mellonella* as a model system. 3. Sensitivity of *G. mellonella* larvae to infection with *P. aeruginosa*. 4. Effect of *P. aeruginosa* proteases on *G. mellonella* immune response. 4.1. Phenoloxidase system. 4.2. Lysozyme (muramidase, mucopolysaccharide glycohydrolase, EC2.2.1.17). 4.3. Antimicrobial peptides (immune peptides). 4.4. Apolipoprotein-III. 5. Summary

**Słowa kluczowe:** enzymy proteolityczne *Pseudomonas aeruginosa*, humoralna odpowiedź immunologiczna *Galleria mellonella*, owad modelowy

**Key words:** humoral immune response of *Galleria mellonella*, model host, *Pseudomonas aeruginosa* proteolytic enzymes

## 1. Wstęp

Bakteria *Pseudomonas aeruginosa* jest drobnoustrojem szeroko rozpowszechnionym w przyrodzie. Naturalnym miejscem występowania tej bakterii są gleba, woda, ścieki, powietrze, powierzchnia roślin, organizmy ludzi i zwierząt. Jest groźnym oportunistycznym patogenem człowieka. U ludzi z upośledzoną odpornością, wywołuje zakażenia układu oddechowego (zwłaszcza u osób z mukowiscydozą), zakażenia ran, układu moczowego, kości, stawów, skóry oraz zapalenie rogówki. Małe wymagania odżywcze, różnorodny mechanizm oporności na antybiotyki, niewrażliwość na stosowane powszechnie środki dezynfekcyjne, łatwość rozprzestrzeniania się w środowisku wodnym

sprawiają, że bakteria *P. aeruginosa* należy do najpowszechniejszych i najgroźniejszych czynników etiologicznych wielu postaci zakażeń szpitalnych. Warunkiem efektywnego leczenia infekcji spowodowanych pałeczką *Pseudomonas* jest dokładne poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za chorobotwórczość tej bakterii.

Patogenne szczepy *P. aeruginosa* charakteryzują się szeregiem mechanizmów i czynników warunkujących zjadliwość tego organizmu. Czynniki te można podzielić na związane z powierzchnią komórki bakteryjnej: lipopolisacharydy (LPS), fimbrie, rzęski, śluz, lektyny oraz uwalniane na zewnątrz komórki: egzotoksynę A, egzoenzymy S, T, U i Y, enzymy proteolityczne, neuraminidazę, fosfolipazę hemolityczną i niehemolityczną oraz barwnik piocyjanień. Enzymy proteolityczne

\* Autor korespondencyjny: Zakład Immunobiologii, Instytut Biologii i Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii-Curie Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin; e-mail: mariola.andrejko@poczta.umcs.lublin.pl

warunkują inwazyjność i rozprzestrzenianie się patogenu (degradacja tkanek, liza komórek), modulację mechanizmów odpowiedzi odpornościowej gospodarza (degradacja czynników immunologicznych, aktywacja cytotoksycznych mediatorów gospodarza) a także aktywację toksyn bakteryjnych. Pałeczki *Pseudomonas* wytwarzają co najmniej cztery proteazy zewnątrzkomórkowe: elastazę B (LasB), elastazę A (LasA), serynową proteazę IV oraz alkaliczną proteazę [17].

U ludzi elastaza B jest ważnym czynnikiem wirulencji w infekcjach układu oddechowego, zakażeniach rogówki, tkanki łącznej i skóry po oparzeniach [64]. Uszkodzenie tkanek gospodarza związane jest z degradacją elastyny i kolagenu typu IV jak również z aktywacją tkankowych metaloproteaz (MMP's) [62, 79]. Obserwowano ponadto udział tej proteazy w modulacji mechanizmów odpowiedzi odpornościowej gospodarza przez degradację m.in. immunoglobulin IgA i IgG, białek surfaktantu SP-A i SP-D, elementów układu dopełniacza (C5a i C3) oraz peptydów antybakteryjnych ( $\alpha$ -defensyn i LL-37) [61, 78]. Należąca do metaloproteaz elastaza A, degraduje elastynę, zwiększa aktywność elastolityczną elastazy B poprzez modyfikację substratu, dzięki czemu jest zaangażowana w rozwój infekcji rogówki i chronicznych infekcji układu oddechowego [72]. Serynowa proteaza IV o masie cząsteczkowej 26 kDa jest aktywna wobec składników układu dopełniacza C3 i C1, immunoglobuliny IgG, plazminogenu, fibrynogenu. Enzym ten degraduje również komórki nabłonkowe rogówki, przez co stanowi ważny czynnik etiologiczny zakażeń rogówki. Alkaliczna proteaza (AP) odgrywa istotną rolę w rozwoju zapalenia rogówki, bakteriemii, infekcji ucha środkowego, zakażeń układu oddechowego u chorych na mukowiscydozę. AP degraduje składniki układu dopełniacza C1q i C3, fibrynogen, fibrynę, lamininę, jak również interferon (INF- $\gamma$ ) i czynnik martwicy nowotworów (TNF- $\alpha$ ) [17].

W badaniach patogenności i czynników wirulencji bakterii *P. aeruginosa* stosowane są organizmy modelowe takie jak *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* oraz coraz częściej barciak większy *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). Ten ostatni organizm wydaje się być niedoceniany przez wielu badaczy choć należy odnotować, że w ciągu 12 lat (od 2000 do 2012 roku) ponad 7-krotnie wzrosła ilość oryginalnych prac dostępnych w bazie Web of Science, opisujących badania wirulencji ludzkich patogenów z użyciem gąsienic *G. mellonella* [29]. Pomimo tego, niewiele jest publikacji dotyczących zależności w układzie gospodarz (*G. mellonella*) – patogen (*P. aeruginosa*). Dokładne poznanie mechanizmów patogenyzy bakterii *P. aeruginosa*, jest ważne ze względu na opracowanie skutecznych sposobów unieszkodliwienia tego groźnego patogenu. Natomiast poznanie procesów składających się na wrodzoną odpowiedź odpornościową owada może

przyczynić się do odkrycia nowych skutecznych metod zwalczania szkodników. Poniższe opracowanie dotyczy molekularnych i biochemicznych aspektów interakcji tych dwóch organizmów, ze szczególnym uwzględnieniem roli bakteryjnych enzymów proteolitycznych w procesie indukowania i przełamania odpowiedzi odpornościowej gąsienic barciaka większego.

## 2. Barciak większy (*Galleria mellonella*) jako organizm modelowy

Barciak większy w naturalnych warunkach jest szkodnikiem pasiek. Jest organizmem kosmopolitycznym, łatwo namnaża się na sztucznych pożywkach a koszty hodowli dużej liczby owadów są niskie. Gąsienice mają względnie duży rozmiar (12–20 mm), co umożliwia stosunkowo łatwą iniekcję badanych patogenów a także pobieranie próbek np. hemolimfy, ciała tłuszczowego i in. Znacznym ułatwieniem dla eksperymentatora jest możliwość precyzyjnego zaaplikowania dokładnej ilości komórek mikroorganizmów, miejscowo, *per os* czy też przez iniekcję, co jest utrudnione u większości gospodarzy nie będących ssakami. Dodatkową zaletą jest możliwość uzyskania wyników w krótkim czasie, nawet w ciągu 24–48 godzin. Ponadto, hodowla barciaka w laboratorium może być prowadzona w zakresie temperatur od 25 do 37°C, co jest istotne ze względu na udowodniony wpływ temperatury na wytwarzanie czynników wirulencji przez drobnoustroje [19, 36, 45, 83]. Należy podkreślić, że w ostatnich latach zwrócono uwagę na duże podobieństwo strukturalne i funkcjonalne pomiędzy wieloma składnikami wrodzonej odporności ssaków i owadów. Dlatego też, użycie bezkręgowców jako organizmu modelowego jest wskazane szczególnie gdy celem badań są interakcje pomiędzy patogenem a wrodzonym układem odpornościowym gospodarza, ponieważ owady nie mają odporności nabytej, opartej na limfocytach pamięci immunologicznej, które powstały u kręgowców podczas ewolucji. Wirulencja wielu patogenów jest podobna u gąsienic *G. mellonella* i ssaków, włączając człowieka, dlatego też poznanie mechanizmów regulujących funkcjonowanie układu odpornościowego owadów może dostarczyć cennych informacji na temat wrodzonego układu odpornościowego ssaków [45, 50, 83].

Chociaż genom barciaka większego *G. mellonella* nie został dotychczas zsekwencjonowany, w laboratoriach na całym świecie coraz chętniej stosuje się gąsienice barciaka większego *G. mellonella* jako alternatywny organizm modelowy w badaniach:

- interakcji patogen-gospodarz,
- mechanizmu patogenyzy drobnoustrojów (w tym mikroorganizmów patogennych dla człowieka),

- czynników wirulencji drobnoustrojów,
- skuteczności leków terapeutycznych.

Barciak większy *G. mellonella* okazał się przydatnym modelem mini gospodarza w badaniach infekcji patogennymi grzybami, jak również odpowiedzi odpornościowej gospodarza po zakażeniu tymi drobnoustrojami, a także do testowania skuteczności substancji przeciwko grzybom [19, 83]. Jak podkreśla wielu autorów, owad ten zapewnia wyjątkową możliwość jednoczesnego zbadania molekularnych mechanizmów patogenności grzybów oraz działania środków przeciwgrzybowych. Szczególnie obiecujące rezultaty otrzymano stosując gąsienice *G. mellonella* w badaniach infekcji takimi grzybami jak *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. czyli gatunkami ważnymi ze względu na szerokie rozprzestrzenienie i częstość występowania zakażeń u ludzi. W większości badań stwierdzono znaczącą korelację pomiędzy wirulencją tych organizmów u barciaka oraz u modelowych organizmów ssaków. Należy zaznaczyć, że istotną zaletą gąsienic *G. mellonella* w przypadku badań infekcji patogennymi grzybami jest możliwość wykonywania eksperymentów w temperaturze fizjologicznej ssaków, co jest niemożliwe w przypadku innych modeli bezkręgowych, u których doświadczenia są standardowo wykonywane w temperaturze 22–30°C.

Gąsienice *G. mellonella* są z powodzeniem stosowane do analizowania patogenności drożdży z gatunku *C. albicans*. Na przykład, uszeregowano szczepy *Candida* według wzrastającej zjadliwości w stosunku do gąsienic *Galleria*, co w dużym stopniu odpowiada wirulencji szczepów obserwowanej u ssaków, w tym u człowieka [24]. W badaniach tych wykorzystywano m.in. obserwacje zmian w gęstości hemocytów występujących w hemolimfie owadów. Otrzymane wyniki sugerują, że bakterie patogenne powodują wyraźny spadek ilości hemocytów podczas gdy szczepy niepatogenne tylko nieznacznie zmieniają ilość tych komórek. Zaobserwowano też, że o stopniu zjadliwości badanych szczepów mogą świadczyć zmiany w ekspresji wybranych przeciwdrobnoustrojowych peptydów pojawiających się w hemolimfie zakażonego owada. Ponadto wykazano, że pre-ekspozycja na drożdże chroni gąsienice przed letalną infekcją *C. albicans*, co jest związane z większą ekspresją peptydów przeciwdrobnoustrojowych w organizmie owada [13, 14]. Wykorzystanie *G. mellonella* pozwoliło zidentyfikować wiele czynników wpływających na wirulencję mutantów *C. albicans* [33].

Gąsienice *G. mellonella* są stosowane w badaniach korelacji pomiędzy produkcją toksyn a wirulencją grzyba z gatunku *A. fumigatus*. Na przykład, owady stosowano do ustalenia roli gliotoksyny, metabolitu który wykazuje immunosupresyjną i apoptotyczną aktywność w stosunku do efektorowych komórek odpornościowych w warunkach *in vitro* [74]. Wyka-

zono również, że zjadliwość grzybów wobec gąsienic barciaka jest zależna od stadium kiełkowania konidiów, co jest związane z różnicami w skuteczności przebiegu procesu fagocytozy [75].

Stwierdzono, że te same geny ulegają ekspresji w czasie zakażenia grzybem *C. neoformans* ssaków oraz gąsienic *G. mellonella*, co może ułatwić badania czynników wirulencji *in vivo* oraz skuteczności terapii przeciwgrzybowej. Można wymienić kilka genów takich jak CAP59, GRA1, RAS1, PKA1 uznanych za istotne w procesie infekcji ssaków, pełniących jak się okazało podobną rolę w interakcji z układem odpornościowym *Galleria* [83]. W jednym z wielu badań dotyczących działania czynników przeciwgrzybowych, testowano działanie dwu antybiotyków amfoterycyny B i flucytozyny do zwalczania infekcji *C. neoformans*. Okazało się, że zastosowanie mieszanki antybiotyków jest skuteczniejsze i znacznie przedłuża życie gąsienic *G. mellonella* w porównaniu z terapią z użyciem jednego antybiotyku [65].

Gąsienice *Galleria* są wrażliwe zarówno na kliniczne jak i środowiskowe szczepy grzybów z rodzaju *Fusarium* oraz podobnie jak w przypadku wcześniej opisanych gatunków grzybów, zaobserwowano pozytywną korelację w szybkości uśmiercania owadów oraz myszy przez ten mikroorganizm. Ponadto okazało się, że gąsienice skuteczniej i szybciej zamierają w temperaturze 30°C w porównaniu z temperaturą 37°C, dlatego też wyciągnięto wniosek, że na efektywność działania grzybów *Fusarium* oprócz takich czynników jak rodzaj szczepu, dawka konidiów, którą infekowane są zwierzęta, duży wpływ ma temperatura w jakiej rozwija się zakażenie [23].

Barciak większy *G. mellonella* jest wrażliwy na szereg bakterii patogennych dla człowieka, dlatego też jest wykorzystywany w badaniach czynników wirulencji tych mikroorganizmów, oraz do testowania skuteczności przeciwbakteryjnej różnych antybiotyków. Owad uznany został za alternatywny model organizmu-gospodarza do badania przebiegu infekcji różnych gatunków *Burkholderia cepacia* complex (Bcc). Wykazano związek zmniejszonej wirulencji Bcc ze zwiększoną przeżywalnością gąsienic *G. mellonella* kiedy porównywano odpowiednio zmutowany szczep Bcc do szczepu dzikiego [81, 83]. Mutanty *B. mallei* mające mniejszą zjadliwość w przypadku chomików i myszy wykazują podobnie obniżoną zjadliwość w stosunku do gąsienic *G. mellonella*. Ponadto, udało się zidentyfikować trzy nowe geny wirulencji, stąd wykorzystanie gąsienic barciaka daje możliwość szybkiej i precyzyjnej identyfikacji genów w przypadku *B. mallei*, *B. pseudomallei* i innych patogenów [77].

Celem kolejnych przykładowych badań, w których stosowane są gąsienice *G. mellonella* jest analiza czynników wirulencji, szczególnie enzymów proteolitycznych wytwarzanych przez *Enterococcus faecalis*.

Zaobserwowano, że bakteria produkuje metaloproteinazy niszczące czynniki układu odpornościowego obecne zarówno w hemolimfie barciaka jak i w ludzkiej surowicy. Na przykład, pozakomórkowa żelatynaza (GelE) degradowuje indukowane peptydy odpornościowe (cekropiny), które odgrywają kluczową rolę w obronie gospodarza we wczesnej fazie zakażenia bakteryjnego. Przepuszczalnie GelE może też odgrywać istotną rolę w patogenezie enterokoków u ludzi. Natomiast, nie stwierdzono wpływu proteaz serynowych (SprE) wytwarzanych przez bakterię *E. faecalis* na składniki układu odpornościowego zarówno u owadów jak i u ludzi [70, 83].

Gąsienice *G. mellonella* wykorzystywane są w badaniach patogenezy bakterii *Yersinia pseudotuberculosis*, głównie w badaniach interakcji patogenu z fagocytami. Został skonstruowany mutant mający mutacje w genie dla dysmutazy nadtlenkowej (*sodC*), wykazujący większą wrażliwość na nadtlenki w porównaniu ze szczepem dzikim. Wykazano, że w temperaturze 37°C, bakterie mają obniżoną zdolność do kolonizacji organizmu owada, podobnie ich działanie jest osłabione w stosunku do myszy. Ponadto, wyniki tych testów przyczyniły się do potwierdzenia istotnej roli dysmutaz nadtlenkowych w przełamaniu odporności komórkowej podczas zakażenia zarówno organizmu owada jak i ssaka [20].

Kolejnym przykładem zastosowania *G. mellonella* są badania dotyczące przebiegu infekcji bakterii *Streptococcus*. Autorzy zaobserwowali prawie liniową pozytywną korelację pomiędzy dawkami LD<sub>50</sub> tej bakterii u gąsienic *G. mellonella* oraz u myszy infekowanych różnymi klinicznymi szczepami *Streptococcus* [51, 68].

Gąsienice *G. mellonella* są też coraz częściej wykorzystywane w badaniach aktywności przeciwbakteryjnej różnych antybiotyków wobec wielu bakterii patogenych m.in. *Acinetobacter baumannii* czy *Francisella tularensis*. Zamieszczone poniżej przykładowe badania ilustrują potencjał *G. mellonella* jako wygodnego układu do wstępnego testowania skuteczności antybiotyków przed ich zastosowaniem w modelowych organizmach ssaków.

Po zainfekowaniu owadów referencyjnym szczepem bakterii *A. baumannii* zaobserwowano, że liczba zabitych gąsienic zależy nie tylko od podanej dawki bakterii ale i od poinfekcyjnej temperatury inkubacji. W temperaturze 37°C uzyskano zdecydowanie wyższą śmiertelność owadów niż w temperaturze 30°C. Ponadto stwierdzono, że zastosowanie antybiotyków mających aktywność *in vitro* w stosunku do zakażających szczepów bakterii znacznie wydłużało przeżycie gąsienic barciaka w porównaniu z antybiotykami, na które bakteria jest oporna [71].

Barciak większy jest stosowany do testowania aktywności przeciwbakteryjnej antybiotyków w warunkach *in vivo* w przypadku jednego z groźniejszych dla ludzi

patogenów bakteryjnych *Francisella tularensis* LVS, bakterii będącej przyczyną tularemii. Zastosowanie terapii antybiotykami takimi jak ciprofloksacyna, lewofloksacyna oraz streptomycyna przed lub po inokulacji bakterii znacznie przedłużało okres przeżycia owadów [11].

Jednymi z pierwszych, którzy opublikowali wyniki badań dotyczące patogenezy oraz czynników wirulencji bakterii *P. aeruginosa*, w których użyte zostały gąsienice barciaka byli m.in. Aston i wsp. [12], Chadwick i Aston [18], Lysenko [47–48, 52–55], Lysenko i Kučera [56]. Niszczenie hemocytów w hemolimfie *G. mellonella* przez proteinazę *P. aeruginosa* zaobserwowali Madziara-Borusewicz i Lysenko [58]. Należy jeszcze wspomnieć o badaniach dotyczących toksyczności proteazy *P. aeruginosa* dla gąsienic barciaka oraz badaniach, w których wykazano różnice w patogenności mutantów LPS *P. aeruginosa* [32, 44].

W ostatnich latach coraz częściej, stosuje się gąsienice *G. mellonella* w badaniach dotyczących mechanizmów patogenezy bakterii *P. aeruginosa*. Między innymi, zaobserwowano korelację pomiędzy wzrostem wartości dawki LD<sub>50</sub> oszacowanej na podstawie śmiertelności gąsienic barciaka większego a zwiększoną przeżywalnością myszy zakażonych różnymi mutantami klinicznego szczepu *Pseudomonas* (PA14) [43].

Inni badacze stosują gąsienice *G. mellonella* w badaniach dotyczących roli oraz komponentów systemu sekrecji typu III (TTSS) w patogenezie *P. aeruginosa*. Stwierdzono m.in. że główną rolę w zabijaniu barciaka odgrywają białka efektorowe ExoT i ExoU, które wykazują również toksyczność w stosunku do komórek jajnika chomika chińskiego linii komórkowej CHO [63]. Gąsienice *G. mellonella* stosowane są również jako model badawczy do wyjaśnienia fizjologicznych aspektów interakcji gospodarz-patogen (*G. mellonella* – *P. aeruginosa*) a także procesów składających się na wrodzoną odpowiedź odpornościową owada [3–10]. Praca ta powstała w dużym stopniu w oparciu o badania własne, wskazujące na przydatność tego organizmu do testowania zjadliwości jak i identyfikacji czynników wirulencji *Pseudomonas*.

### 3. Wrażliwość gąsienic *G. mellonella* na zakażenie *P. aeruginosa*

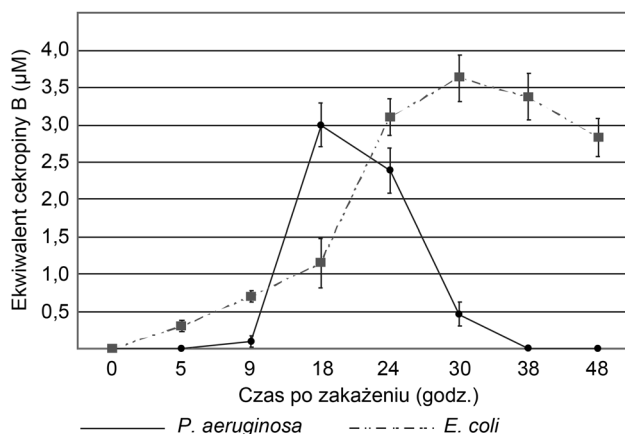
Zakażenie gąsienic *G. mellonella* bakteriami *P. aeruginosa* (LD<sub>50</sub> wynosi 10–20 komórek) powoduje śmierć osobników po 38–40 godzinach od infekcji. Zmarłe gąsienice są silnie zmelanizowane, tracą turgor oraz niekiedy integralność. Zaobserwowano również destrukcję tkanek i organów wewnętrznych. Po zakażeniu entomopatogenem szczepem *Pseudomonas* wytwarzającym barwnik – piocyjaninę, owady przybierają charakterystyczne niebieskozielone zabarwienie.



Należy zaznaczyć, że gąsienice przeżywają zakażenie bardzo dużymi dawkami (nawet  $6 \times 10^8$ ) saprofitycznej bakterii *E. coli*, ponadto w tych warunkach następuje aktywacja układu odpornościowego owada. Po infekcji bakterią *P. aeruginosa* również następuje indukcja odpowiedzi odpornościowej, ale zaobserwowano wyraźne różnice w kinetyce pojawiania się i zanikania aktywności przeciwbakteryjnej w hemolimfie owadów zakażonych bakteriami saprofitycznymi i entomopatogennymi. Po zakażeniu gąsienic bakterią *E. coli* aktywność przeciwbakteryjna pojawia się już po 5 godzinach, natomiast po iniekcji bakterii *P. aeruginosa* aktywność jest wykrywana dopiero po 9 godzinach zakażenia. Maksymalną aktywność w przypadku entomopatogena obserwuje się po 18 godzinach, po czym następuje drastyczny spadek aktywności, aż do całkowitego jej zaniku po około 38 godzinach od zakażenia. W przypadku bakterii *E. coli* najwyższą aktywność notuje się zwykle po około 30 godzinach i na podobnym poziomie utrzymuje się w kolejnych godzinach po infekcji (rys. 1).

Na podstawie powyższych obserwacji można wywnioskować, że w ciągu pierwszych godzin zakażenia owadów bakterią *P. aeruginosa*, podobnie jak w przypadku *E. coli*, następuje aktywacja reakcji obronnych gospodarza. Następnie w miarę rozwoju infekcji, dochodzi do przełamania tych reakcji i ten etap jest charakterystyczny tylko dla zakażenia bakterią entomopatogenną. Zaobserwowano również, że w czasie trwania infekcji wyraźnie wzrasta poziom aktywności proteolitycznej w hemolimfie owada. Pojawia się w takim razie pytanie, jaką rolę w modulacji reakcji obronnych owada odgrywają enzymy proteolityczne?

Toksyczność płynów pochodzących z gąsienic barciaka uzależniona jest od rodzaju podłoża,



Rys. 1. Porównanie aktywności przeciwbakteryjnej hemolimfy gąsienic *G. mellonella* po zakażeniu entomopatogennym szczepem ATCC 27853 *P. aeruginosa* lub bakterią saprofityczną *E. coli*. Aktywność przeciwbakteryjną oznaczano metodą dyfuzji radialnej w podłożu agarowym zawierającym bakterię wskaźnikową *E. coli* D31. Hemolimfa była zbierana po czasie od podania komórek bakterii wskazanym na wykresie. Średnia  $\pm$  SD.

w którym namnażane są bakterie. Wartości średnich dawek śmiertelnych ( $LD_{50}$ ) płynów pochodzących z podłoża minimalnego – M9, okazały się kilkudziesięciokrotnie mniejsze w porównaniu do dawek  $LD_{50}$  płynów pochodzących z podłoża LB. Znacznie bardziej toksyczne są supernatanty zawierające alkaliczną proteazę, w porównaniu do tych zawierających głównie elastazę B, co może wskazywać na istotną rolę alkalicznej proteazy w przełamaniu mechanizmów obronnych owada [9]. Nie można jednak wykluczyć obecności innych czynników w płynie pochodzącym, które mogą dodatkowo zwiększać toksyczność tych preparatów. Na przykład, Miyata i wsp. [63] podkreślają znaczącą rolę ADP-rybozylotransferazy (ExoT) i fosfolipazy (ExoU) *P. aeruginosa* w zabijaniu gąsienic *G. mellonella*. Należy podkreślić, że wytwarzanie elastazy B oraz alkalicznej proteazy zarówno przez szczep entomopatogenny jak i kliniczne szczepy *P. aeruginosa* potwierdzono w warunkach *in vivo*, w zakażonych gąsienicach *G. mellonella*, co wyraźnie sugeruje, że te dwa czynniki wirulencji pełnią istotną rolę podczas infekcji bakterią *P. aeruginosa*. Analiza PCR potwierdziła obecność genu *lasB* kodującego elastazę B oraz genu *aprA* kodującego alkaliczną proteazę w genomach wszystkich badanych szczepów *P. aeruginosa* [8, 9].

#### 4. Wpływ proteaz *Pseudomonas aeruginosa* na reakcje odpornościowe *Galleria mellonella*

Owady wykształciły bardzo sprawnie działający układ odpornościowy, zapewniający wysoką skuteczność obrony przeciwzakaźnej, składający się z zewnętrznych barier ochronnych, do których należą bariery fizykochemiczne i odporność behawioralna, oraz z wewnętrznych mechanizmów odpowiedzi odpornościowej (odpowiedź komórkowa i humoralna) [37]. Oparta na nieswoistej odpowiedzi odpornościowej reakcja owada na zakażenie patogenem, wykazuje wiele elementów wspólnych z występującą u człowieka. U kręgowców możemy wyróżnić dwa typy odporności: wrodzoną oraz nabytą, podczas gdy bezkręgowce jako filogenetycznie starsze dysponują tylko dobrze rozwiniętym układem odporności wrodzonej, nie wytwarzają przeciwciał jak również komórek o charakterze limfocytów. Jednakże uzyskane w ostatnich latach wyniki badań sugerują możliwość specyficznego rozpoznawania patogenów oraz funkcjonowanie mechanizmów pamięci immunologicznej u owadów i innych bezkręgowców, co może świadczyć o istnieniu alternatywnych mechanizmów odporności [25].

W badaniach przeprowadzonych w warunkach *in vivo* wykazano, że szczepy *P. aeruginosa*, charakteryzujące się odmiennym profilem enzymów proteolitycznych, wywołują zróżnicowaną reakcję układu

odpornościowego *G. mellonella* w odpowiedzi na infekcję tymi bakteriami. Końcowy efekt zakażenia w każdym przypadku jest jednakowy, bakterie powodują śmierć owada po około 38–40 godzinach od iniekcji, jednak zaobserwowano znaczne różnice w przebiegu odpowiedzi odpornościowej, zależne od użytego szczepu *P. aeruginosa* oraz od składu podłoża, w którym bakterie są hodowane [8]. Inni autorzy wykazali, że kliniczne izolaty *P. aeruginosa* różnią się ekspresją elastazy B i alkalicznej proteazy [80, 90]. Ponadto, odmienne czynniki wirulencji są wytwarzane w zależności od miejsca czy też czasu trwania infekcji [76]. Ekspresja wielu czynników zjadliwości, takich jak: elastaza B (*lasB*), elastaza A (*lasA*), proteaza alkaliczna (*aprA*) jest regulowana przez systemy *quorum sensing* (QS). Komórki *P. aeruginosa* dysponują dwoma systemami QS homologicznymi do LuxR1: system *las* obejmujący białka LasR i LasI i system *rhl* obejmujący białka RhlR i RhlI [89]. Duan i Surette [31] wykazali, że poziom ekspresji składników systemu *quorum sensing* jest zależny od warunków wzrostu, wpływając tym samym na ekspresję czynników zjadliwości regulowanych przez ten system np. ekspresja genu *aprA* w podłożu M9 zaczyna się już w fazie logarytmicznej podczas gdy w bogatym podłożu LB we wczesnej fazie stacjonarnej.

Odpowiedź humoralna u owadów indukowana jest w wyniku zranienia lub zakażenia organizmu. Obejmuje głównie działanie składników rozpuszczonych w hemolimfie, do których zalicza się między innymi, układ oksydazy fenolowej, lizozym, peptydy odpornościowe oraz inne białka, które oprócz podstawowych dla nich funkcji biorą udział w reakcjach obronnych organizmu, jak np. apolipoforyna III.

#### 4.1. Układ oksydazy fenolowej

Aktywacja układu oksydazy fenolowej jest jedną z najszybszych reakcji immunologicznych organizmu owada. W układ zaangażowana jest oksydaza fenolowa typu lakazy, która bierze udział w procesach ciemnienia i twardnienia oskórka oraz gojenia ran, oraz oksydaza fenolowa typu tyrozynazy (fenolaza), która uczestniczy w rozpoznawaniu ciał obcych, tworzeniu toksycznych chinonów oraz zmelanizowanych otoczek w trakcie inkapsulacji. Aktywacja proPO następuje w rezultacie uruchomienia kaskady enzymów proteolitycznych, określanej jako układ oksydazy fenolowej lub system profenolooksydazy. Układ oksydazy fenolowej jest zespołem reakcji biochemicznych zależnych od jonów  $Ca^{+2}$ , w które zaangażowane są przynajmniej dwie proteazy serynowe. Końcową reakcją systemu proPO jest konwersja profenolooksydazy do formy aktywnej drogą ograniczonej proteolizy.

Wpływ patogenów na układ oksydazy fenolowej owada może przybierać różne formy. U gąsienic *G. mel-*

*lonella* zainfekowanych nicieniem *Steinernema feltiae* obserwowano zmniejszenie aktywności układu profenolooksydazy (proPo) [15]. Natomiast owadobójcze białka produkowane przez Gram-ujemne bakterie *Xenorhabdus* spp., symbionta entomopatogennych nicieni, aktywują układ proPO prowadząc do intensywnego tworzenia melaniny i w konsekwencji do śmierci owadów [91].

U gąsienic *G. mellonella* zainfekowanych bakterią *P. aeruginosa* pojawiają się brunatne plamy na powierzchni ciała świadczące o aktywacji układu fenolooksydazy, który prowadzi do całkowitej melanizacji ciała w momencie śmierci. Stwierdzono, że szczepy *Pseudomonas* indukują wzrost aktywności układu profenolooksydazy w hemolimfie, ale zarówno poziom jak i kinetyka tych zmian wyraźnie zależą od użytego do infekcji szczepu bakteryjnego. W przypadku bakterii produkujących alkaliczną proteazę, notuje się wyraźny wzrost poziomu aktywności enzymu już w pierwszych 6 godzinach od zakażenia. Następnie, wraz z rozwojem bakteriemii w hemolimfie następuje stopniowy spadek aktywności oksydazy fenolowej. Warto wspomnieć, że poziom aktywności enzymu w hemolimfie gąsienic *G. mellonella* immunizowanych zabitymi wysoką temperaturą komórkami *P. aeruginosa* okazał się zdecydowanie wyższy (nawet 4,5-krotnie) niż po iniekcji żywych bakterii [8].

Wiadomo, że warunki środowiskowe regulują ekspresję wielu czynników zjadliwości, dzięki czemu bakteria szybko adaptuje się do zmian otoczenia, na przykład wytwarzanie przez bakterię egzotoksyny A, elastazy B i alkalicznej proteazy jest uzależnione od obecności żelaza [82]. Zastosowanie do hodowli bakterii podłoży znacznie różniących się składem (bogate – LB lub minimalne – M9) może wywoływać zmiany składników powierzchniowych komórki, włącznie z czynnikami wirulencji, co z kolei może utrudniać prawidłowe rozpoznanie bakterii przez układ odpornościowy *G. mellonella* oraz spowodować odmienną reakcję układu profenolooksydazy. Rozpoznanie ciał obcych w zainfekowanym organizmie jest istotnym elementem odpowiedzi odpornościowej. U owadów w rozpoznaniu immunologiczne zaangażowane są receptory PRR (pattern recognition receptors) układu odpornościowego gospodarza, które rozpoznają powierzchniowe determinanty o określonej strukturze molekularnej (PAMPs, pathogen associated molecular patterns, wzorce molekularne związane z patogenami) zlokalizowane w ścianach komórkowych mikroorganizmów. Można przypuszczać, że wpływ na aktywność systemu proPO jest jednym z mechanizmów stosowanych przez bakterię *P. aeruginosa* do przełamania odpowiedzi odpornościowej zainfekowanych owadów. Natomiast, wykryte różnice w kinetyce i poziomie aktywności oksydazy, zależne od szczepu bakteryjnego zakażającego owada, mogą sugerować że bakteria *P. aerugi-*

*nosa* wykorzystuje podczas patogenezы różne czynniki wirulencji i/lub różne strategie przełamывania odporności gospodarza [8].

#### 4.2. Lizozym (muramidaza, glikohydrolaza mukopeptydowa, EC 3.2.1.17)

Innym składnikiem hemolimfy owada, którego poziom i aktywność wzrasta podczas zakażenia bakteryjnego jest lizozym. Enzym wykazuje aktywność bakteriologiczną – degraduje peptydoglikan, budujący ścianę komórkową bakterii poprzez hydrolizę wiązania  $\beta$ -1,4-glikozydowego. Lizozym *G. mellonella* wywiera działanie w stosunku do żywych i martwych bakterii, zarówno Gram-dodatnich jak i niektórych Gram-ujemnych oraz grzybów [42, 84]. Jest białkiem odpornościowym konstytutywnie obecnym w hemolimfie na niskim poziomie a jego aktywność wzrasta gwałtownie po zakażeniu i immunizacji [60, 92]. W oparciu o doświadczenia wykonane z użyciem EWL stwierdzono, że lizozym *G. mellonella* wykazuje synergistyczne działanie z niektórymi peptydami przeciwbakteryjnymi i apolipoforyną III, obecnymi w hemolimfie owada. Aktywność muramidazowa lizozymu ułatwia dostęp peptydów antybakteryjnych do błony komórkowej bakterii [95, 96]. Obserwowano również, że w obecności lizozymu bakteria *E. coli* staje się bardziej wrażliwa na attacyny, cekropiny i defensyny [34].

Podczas zakażenia gąsienic *G. mellonella* bakterią *P. aeruginosa* zmiany poziomu aktywności lizozymu w hemolimfie są zależne od użytego do zakażenia szczepu oraz od stosowanej do hodowli drobnoustrojów pożywki. Iniekcja owadom bakterii produkujących elastazę B jak również szczepów wytwarzających zarówno elastazę B jak i elastazę A i proteazę IV, powoduje początkowo wyraźny spadek, a po około 12 godzinach od infekcji wzrost aktywności lizozymu (nawet 2-krotny w porównaniu do aktywności w hemolimfie owadów niezakażonych). W przypadku szczepów wytwarzających alkaliczną proteazę aktywność bakteriologiczna nie wykazuje istotnych zmian w porównaniu z poziomem kontrolnym. Zaobserwowany spadek aktywności lizozymu w pierwszych godzinach od zakażenia może być spowodowany mobilizacją układu odpornościowego, a tym samym zaangażowaniem lizozymu w różne mechanizmy przeciwważakzne [8].

Wyniki badań wskazują, że wzrost aktywności lizozymu jest skorelowany ze wzrostem jego poziomu w hemolimfie zainfekowanych owadów. Po 18–30 godzinach infekcji obserwowano nawet ponad 60% wzrost stężenia lizozymu w hemolimfie, w porównaniu z niezakażonymi owadami kontrolnymi. Dopiero po około 42 godzinach następuje stopniowy spadek stężenia lizozymu, co można tłumaczyć zahamowaniem biosyntezy enzymu spowodowanym intensywnym rozwojem bak-

terii *P. aeruginosa* w hemolimfie zakażonych gąsienic [5]. Stężenie lizozymu w hemocytach i ciele tłuszczowym gąsienic *G. mellonella* zainfekowanych szczepem entomopatogennym *P. aeruginosa*, stopniowo wzrasta a następnie po 24–30 godzinach, ulega zmniejszeniu, co może być rezultatem intensywnej sekrecji tego białka z miejsca syntezy do hemolimfy, jak również osłabienia funkcji ciała tłuszczowego spowodowane rozprzestrzeniającą się infekcją bakteryjną. Wzrost zarówno stężenia jak i aktywności lizozymu w hemolimfie gąsienic zakażonych bakterią *P. aeruginosa* wskazuje, że enzym ten jest mało wrażliwy na działanie proteaz wytwarzanych przez bakterię podczas patogenezы [5].

Z danych literaturowych wiadomo, że metaloproteazy wytwarzane przez mikroorganizmy patogenne funkcjonują nie tylko jako czynniki wirulencji, ale również mogą uczestniczyć w mechanizmach indukcji odpowiedzi odpornościowej gospodarza [1]. Elastaza B *P. aeruginosa*, należąca do rodziny metaloproteaz podobnych do termolizyny, okazała się doskonałym induktorem odpowiedzi odpornościowej *G. mellonella* powodując m.in. wzrost aktywności i poziomu lizozymu. Jednak na podstawie uzyskanych wyników nie można stwierdzić czy jest to spowodowane zwiększoną sekrecją białka z miejsc syntezy, jakimi są komórki ciała tłuszczowego i hemocyty, czy może ze zwiększoną ekspresją lizozymu [4]. Należy zaznaczyć, że w eksperymentach *in vitro*, po ekspozycji hemolimfy owadów na działanie enzymów proteolitycznych, wytwarzanych przez różne szczepy *P. aeruginosa*, aktywność lizozymu nie ulega zmianie i pozostaje na poziomie kontrolnym. Te obserwacje mogą wskazywać na obecność w hemolimfie, inhibitorów hamujących aktywność proteaz. Obecność w hemolimfie *G. mellonella* inhibitorów, które są aktywne przeciwko metaloproteazom (IMPI) jak również serynowym proteazom (ISPI) obserwowali m.in. Wedde i wsp. [85] oraz Fröblius i wsp. [35]. IMPI's wykazują aktywność w stosunku do metaloproteaz z rodziny M4 wytwarzanych przez bakterie patogenne jako czynniki wirulencji m.in. w stosunku do elastazy B *P. aeruginosa* [22]. Po iniekcji gąsienicom barciaka elastazy B następuje indukcja syntezy inhibitorów hamujących aktywność metaloproteaz na porównywalnym poziomie do termolizyny [4].

Fracje proteolityczne, które wykazują nieznaczną aktywność w warunkach *in vitro* przeciwko lizozymowi, zawierają przede wszystkim alkaliczną proteazę, co może sugerować, że właśnie ten enzym jest zaangażowany w degradację lizozymu, wymaga to jednak potwierdzenia w dalszych badaniach. Natomiast proteaza serynowa *P. aeruginosa* – proteaza IV, nie powoduje degradacji lizozymu w warunkach *in vitro*, pomimo tego, że enzym zawiera w swojej strukturze 13 reszt lizyny, które mogą stanowić potencjalne miejsca cięcia dla tej proteazy [3].

### 4.3. Peptydy o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych (peptydy odpornościowe)

W humoralnej odpowiedzi odpornościowej owadów, kluczową rolę odgrywają peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMP's), które są aktywowane bądź syntetyzowane *de novo* głównie w ciele tłuszczowym i hemocytach, skąd są wydzielane do hemolimfy zakażonych gąsienic. Peptydy o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych to zazwyczaj niewielkie cząsteczki o charakterze kationowym, zawierające 12–50 aminokwasów o masie cząsteczkowej od 3 do 10 kDa. Peptydy oddziałują na ujemnie naładowaną błonę komórkową bakterii, prowadząc do utworzenia w niej kanałów i depolaryzacji a nawet fragmentacji, czego efektem jest śmierć drobnoustroju. Każdy gatunek wytwarza zazwyczaj zestaw peptydów odpornościowych zróżnicowanych pod względem właściwości biochemicznych i spektrum aktywności. U *G. mellonella* poznano jak dotąd kilkanaście peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Są wśród nich peptydy  $\alpha$ -helikalne (cecropiny A i D, moricyny), peptydy o strukturze stabilizowanej mostkami disiarczkowymi (defensyny, gallerimycyna), peptydy bogate w prolinę, peptydy bogate w glicynę (głoweryny) a także peptydy anionowe [16, 26, 41, 46, 49, 59, 67, 88]. Różnice w zestawie peptydów i kinetyce ich pojawiania się w hemolimfie gąsienic *G. mellonella* obserwowano po zakażeniu owadów różnymi bakteriami i grzybami [60].

W wyniku zakażenia gąsienic bakteriami *P. aeruginosa*, następuje indukcja syntezy peptydów odpornościowych, podobnie jak po iniekcji do hemocelu komórek saprofitycznej bakterii *E. coli*. W hemolimfie gąsienic obserwowano pojawienie się aktywności przeciwbakteryjnej, ale czas pojawienia się oraz poziom tej aktywności jest wyraźnie zależny od użytego do infekcji szczepu *Pseudomonas*. Zdecydowanie najlepszym induktorem aktywności przeciwbakteryjnej w hemolimfie okazała się bakteria entomopatogenna (ATCC 27853), wytwarzająca cztery proteazy wykorzystywane jako czynniki wirulencji. Najwyższy poziom aktywności, odpowiadający 20  $\mu$ M cecropiny B, oceniony metodą dyfuzyjną na podstawie strefy zahamowania wzrostu bakterii wskaźnikowej *E. coli*, stwierdzono w hemolimfie gąsienic po 18 godzinach infekcji. Natomiast, szczepy kliniczne *P. aeruginosa* wytwarzające przede wszystkim alkaliczną proteazę, mało efektywnie indukują syntezę peptydów odpornościowych u zainfekowanych owadów. Należy zaznaczyć, że aktywność przeciwbakteryjna indukowana obecnością w hemolimfie bakterii patogennej *P. aeruginosa* okazała się zdecydowanie niższa w porównaniu z aktywnością obserwowaną po zakażeniu owadów bakterią saprofityczną *E. coli*. Ponadto, w przypadku saprofita aktywność przeciwbakteryjna pozostaje na wysokim poziomie

nawet po 48 godzinach po iniekcji bakterii do jamy ciała owada. Natomiast, po zakażeniu patogenem nie obserwuje się aktywności przeciwko *E. coli* w hemolimfie owadów, już po 30 godzinach [7, 8]. Pojawienie się aktywności przeciwbakteryjnej w hemolimfie jest związane z syntezą peptydów o masie poniżej 6,5 kDa. Udział poszczególnych proteaz *P. aeruginosa* w indukcji peptydów odpornościowych w hemolimfie barciaka większego wymaga szczegółowych badań. Dotychczas udało się wykazać, że stymulacja humoralnej reakcji obronnej gąsienic *G. mellonella*, m.in. poprzez zwiększenie aktywności przeciwbakteryjnej w hemolimfie na skutek indukcji syntezy peptydów odpornościowych ma miejsce po iniekcji do hemocelu owada elastazy B [7, 8].

Badania przeprowadzone na gąsienicach *G. mellonella* i *D. melanogaster* dowiodły, że obecność enzymów proteolitycznych jest odbierana przez organizm gospodarza jako „sygnał zagrożenia”. W wyniku aktywności proteinaz endo- i egzogennych w hemolimfie powstają fragmenty peptydowe mające zdolność do indukcji syntezy humoralnych czynników odpowiedzi immunologicznej. Proteinazy biorą też udział w bezpośredniej aktywacji kaskad sygnałowych indukujących syntezę peptydów odpornościowych. U *G. mellonella* stwierdzono, że w wyniku działania termolizyny, znanego induktora mechanizmów odpowiedzi odpornościowej, wytwarzane są fragmenty peptydowe (o masie cząsteczkowej < 3 kDa) wykazujące zdolność do indukcji humoralnych czynników odpowiedzi odpornościowej [39]. Substratem dla metaloproteinaz jest kolagen typu IV [2].

Wiadomo, że czynniki wirulencji takie jak enzymy proteolityczne, wytwarzane przez bakterie podczas zakażenia, niszczą przede wszystkim struktury ciała owada bądź osłabiają lub niszczą komórki i humoralne odczyny obronne. Na przykład, selektywna degradacja cecropin i attacyn w hemolimfie *Hyalophora cecropia* zachodzi pod wpływem proteaz wytwarzanych przez bakterie *B. thuringiensis* [28] jak również przez bakterie *Xenorhabdus nematophilus* związane mutualistycznie z nicieniami *Steinernema carpocapsae* [38]. Proteazy produkowane przez takie patogeny jak *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus pyogenes* degradują peptydy przeciwbakteryjne występujące u człowieka, LL-37 i  $\alpha$ -defensyny [78]. W przypadku gąsienic *G. mellonella* zakażonych bakterią *P. aeruginosa* wyraźny spadek aktywności przeciwbakteryjnej w hemolimfie owadów po 30 godzinach infekcji, może być rezultatem proteolitycznej degradacji peptydów spowodowanej przez enzymy wytwarzane przez tę bakterię w czasie patogenez [8].

Wrażliwość peptydów przeciwbakteryjnych *Galleria* na proteazy produkowane przez *P. aeruginosa* udowodniono w warunkach *in vitro*. Na przykład, aktywność przeciwbakteryjna w hemolimfie immunizowanych owadów jest całkowicie hamowana po ekspozycji na

płyny pochodzące zawierające cztery enzymy proteolityczne (elastaza A, elastaza B, proteaza IV i alkaliczna proteaza) produkowane przez szczep entomopatogeny *P. aeruginosa*. Natomiast, bakterie hodowane w podłożu minimalnym M9 i wytwarzające w tych warunkach głównie alkaliczną proteazę, mają mniejszy wpływ na aktywność przeciwbakteryjną, co wskazuje, że ten enzym tylko w niewielkim stopniu wpływa na degradację peptydów odpowiedzialnych za aktywność przeciwbakteryjną w hemolimfie zakażonych owadów [9, 10]. Jednym z enzymów wytwarzanych przez większość szczepów *P. aeruginosa* jest elastaza B i udział tej metaloproteazy w degradacji peptydów odpornościowych *G. mellonella* został potwierdzony w warunkach *in vitro*. Wstępnie ustalono również, że w tych warunkach peptydy przeciwbakteryjne nie są degradowane przez serynową proteazę IV [7, 8].

Przedstawione wyniki badań wskazują na zróżnicowane zaangażowanie proteaz *P. aeruginosa* w degradację peptydów odpornościowych i/lub na różną wrażliwość peptydów na proteolityczną aktywność badanych enzymów. Można również wnioskować, że pojawienie się bakterii patogennej w hemocelu owada jest sygnałem dla układu odpornościowego gospodarza do uruchomienia reakcji obronnej. Wydaje się, że w procesie patogenyzy enzymy proteolityczne mogą odgrywać odmienną rolę, co zostało wykazane na przykładzie elastazy B, w początkowej fazie infekcji powodują aktywację układu odpornościowego, tym samym zwiększając aktywność przeciwbakteryjną hemolimfy zakażonego owada, następnie w miarę postępującej bakteriemii, mogą degradować niektóre białka/peptydy np. peptydy odpornościowe.

#### 4.4. Apolipoforyna III (apoLp-III)

Apolipoforyna jest ważnym składnikiem hemolimfy owadów zaangażowanym w transport lipidów, aktywację układu odpornościowego, rozpoznawanie determinant molekularnych drobnoustrojów oraz w procesie apoptozy [69, 94]. ApoLp-III należy do rodziny wymiennych apolipoprotein opisanych zarówno u kręgowców jak i bezkręgowców. Cechą wspólną tych białek jest obecność w strukturze cząsteczki amfipatycznych  $\alpha$ -helis [66]. Synteza apoLp-III u owadów zachodzi głównie w ciele tłuszczowym, skąd białko jest uwalniane do hemolimfy. Wiadomo, że apoLp-III wiąże kwasy lipotejchowe (LTA), które są składnikami ścian komórkowych bakterii Gram-dodatnich, lipopolisacharyd (LPS) bakterii Gram-ujemnych,  $\beta$ -1,3-glukan obecny w ścianie komórkowej drożdży oraz uczestniczy w ich detoksykacji [40, 57, 73, 87]. ApoLp-III wykazuje również aktywność przeciwbakteryjną [86, 93].

Poziom apoLp-III w hemolimfie barciaka znacznie wzrasta po zakażeniu bakteriami Gram-ujemnymi,

takimi jak *E. coli* i *Klebsiella pneumoniae*, czy też bakterią Gram-dodatnią *Micrococcus luteus* [93]. Dane literaturowe wskazują, że białko to zwiększa aktywność bakteriolityczną lizozymu oraz bierze udział w aktywacji syntezy peptydów przeciwdrobnoustrojowych [30]. ApoLp-III może współpracować z peptydami odpornościowymi zwiększając ich skuteczność w zwalczaniu drobnoustrojów, wzmacniać odpowiedź komórkową (fagocytoza i enkapsulacja) oraz aktywować kaskadę oksydazy fenolowej. Wyniki badań wskazują, że trzy czynniki obecne konstytutywnie w hemolimfie *G. mellonella*, takie jak apoLp-III, lizozym oraz peptyd anionowy 2 (jeden z peptydów przeciwbakteryjnych), działają synergistycznie przeciwko bakteriom. Wydaje się że, apoLp-III zwiększa enzymatyczną aktywność lizozymu, podczas gdy peptyd stymuluje nie-enzymatyczną aktywność enzymu [96].

W warunkach *in vitro* zaobserwowano wyraźną degradację apoLp-III gąsienic *G. mellonella*, po inkubacji hemolimfy owada z płynami pochodzącymi bakterii entomopatogennej *P. aeruginosa*. W tym przypadku, zmniejszenie ilości białka a nawet jego całkowita degradacja jest prawdopodobnie związane z działaniem proteazy serynowej – proteazy typu IV. ApoLp-III jest degradowana stopniowo, o czym świadczy pojawienie się w hemolimfie czterech produktów o masie cząsteczkowej 15, 13,3, 11,9 oraz 9,5 kDa (po 30 minutach) oraz tylko pojedynczego produktu degradacji o masie 5,6 kDa – po 60 minutach inkubacji. Analiza sekwencji peptydu wykazała, że produkt ten stanowi fragment apoLp-III licząc od 71 aminokwasu dojrzałego białka. Wyniki te wyraźnie wskazują, że apoLp-III *G. mellonella* jest substratem dla proteazy serynowej *P. aeruginosa*, która hydrolizuje białka po karboksylowej stronie lizyny. Analiza strukturalna apoLp-III uwidoczniła obecność 8 reszt lizyny na N-końcu (reszty 1–70) oraz 9 reszt na C-końcu (118–163), które są potencjalnymi miejscami cięcia dla proteazy IV. Fragment cząsteczki od 71 do 117 aminokwasu nie zawiera reszt lizyny a obliczona teoretycznie masa cząsteczkowa tego fragmentu wynosi około 5,515 kDa [3, 9, 10].

Po zakażeniu owada entomopatogenną bakterią *P. aeruginosa*, wraz z czasem trwania infekcji, zmienia się poziom apoLp-III w hemolimfie, hemocytach oraz w ciele tłuszczowym gąsienic *G. mellonella*. Spadek ilości apoLp-III w hemocytach i ciele tłuszczowym, obserwowany odpowiednio po 3,5 oraz 24 godzinach od zakażenia, jest prawdopodobnie rezultatem intensywniejszej sekrecji tego białka do hemolimfy, gdzie bierze udział w odpowiedzi odpornościowej. W hemolimfie, w krótkim czasie po infekcji, poziom apoLp-III wzrasta, natomiast po 24 godzinach ilość białka zmniejsza się i pojawiają się produkty degradacji o masie około 15 i 13,3 kDa, które są szczególnie dobrze widoczne po 24 godzinach od zakażenia, natomiast po 48 godzinach

dominują produkty degradacji o masie 12 i 9,5 kDa. Wyniki uzyskane w warunkach *in vivo*, w zakażonym owadzie, potwierdziły, że w proteolityczną degradację apoLp-III zaangażowana jest serynowa proteaza IV. Należy dodać, że degradacja apoLp-III i innych elementów układu odpornościowego, wydaje się być skorelowana z ogólnym wzrostem aktywności proteolitycznej w hemolimfie gąsienic zakażonych entomopatogenną bakterią *P. aeruginosa* [6]. Natomiast na podstawie wyników badań uzyskanych po zakażeniu owadów szczepami klinicznymi *P. aeruginosa*, charakteryzującymi się obniżonym poziomem ekspresji proteaz, można stwierdzić, że alkaliczna proteaza, która jest głównym enzymem produkowanym przez te bakterie, ma niewielki udział w proteolitycznej degradacji apoLp-III *G. mellonella* [8, 10].

Należy zaznaczyć, że wzrost poziomu apoLp-III w hemolimfie gąsienic, obserwowany w krótkim czasie po zakażeniu bakterią *P. aeruginosa* jest dowodem, że wydzielane przez patogena proteazy mogą stymulować humoralne odczyny obronne owada. Wiadomo, że u bezkręgowców indukcja mechanizmów odpowiedzi immunologicznej następuje po rozpoznaniu PAMPs, albo po rozpoznaniu cząstek sygnałowych powstałych w wyniku uszkodzenia organizmu gospodarza przez ciało obce lub w wyniku działania czynników wirulencji patogenów [21]. Istotną rolę w tym modelu indukcji odpowiedzi immunologicznej odgrywają metaloproteazy z rodziny termolizyny, do której należy elastaza B (LasB) *P. aeruginosa*. W badaniach, w których jako organizm modelowy zastosowano barciaka większego zaobserwowano, że po iniekcji do hemolimfy LasB, w subletalnej dawce, ilość apoLp-III wzrasta nawet 1,6-krotnie po 24 godzinach od iniekcji enzymu, natomiast w przypadku termolizyny obserwowano tylko 1,3-krotny wzrost w porównaniu do poziomu obserwowanego u owadów kontrolnych.

## 5. Podsumowanie

Barciak większy *G. mellonella* okazał się przydatnym organizmem modelowym do badań na poziomie całego organizmu jak i cząstkowych reakcji składających się na odpowiedź odpornościową owadów oraz do testowania patogenności i identyfikacji czynników wirulencji bakterii *P. aeruginosa*.

Wyniki badań przedstawione w opracowaniu sugerują, że odmienny wpływ różnych szczepów *P. aeruginosa* na poszczególne elementy układu odpornościowego *G. mellonella* można wytłumaczyć różnym profilem enzymów proteolitycznych produkowanych przez bakterie podczas zakażenia gąsienic. W każdym przypadku efektem infekcji jest śmierć owadów, jednak zaobserwowano znaczne różnice w przebiegu odpowie-

dzi odpornościowej, zależne od użytego szczepu oraz od składu podłoża, w którym bakterie są hodowane. Odmienna wrażliwość gąsienic *G. mellonella* na różnorodne szczepy i mutanty najprawdopodobniej odzwierciedla różnice w wytwarzanych czynnikach wirulencji, zarówno tych związanych ze ścianą komórkową jak i sekrecyjnymi.

Enzymy proteolityczne wytwarzane przez bakterię *P. aeruginosa* w początkowej fazie infekcji powodują aktywację układu odpornościowego przez: zwiększenie syntezy lizozymu, indukcję syntezy peptydów odpornościowych i inhibitorów metaloproteaz, zmianę poziomu apolipoforyny III, tym samym zwiększając aktywność przeciwbakteryjną hemolimfy zakażonych owadów. W miarę rozwoju bakteriemii przełamują humoralną odpowiedź odpornościową gospodarza przez: hamowanie aktywności układu oksydazy fenolowej, degradację peptydów odpornościowych oraz apolipoforyny III.

Poszczególne proteazy wykazują zróżnicowane zaangażowanie w degradację tych kluczowych elementów odpowiedzi odpornościowej owadów i/lub różna też jest wrażliwość białek i peptydów odpornościowych na aktywność proteolityczną. Peptydy przeciwbakteryjne są podatne na proteolizę pod wpływem elastazy B oraz w niewielkim stopniu alkalicznej proteazy. Apolipoforyna III jest substratem dla proteazy IV oraz alkalicznej proteazy. Peptydy przeciwbakteryjne są niewrażliwe na proteolizę pod wpływem proteazy IV w warunkach *in vitro*.

Elastaza B bakterii *P. aeruginosa* pełni podczas zakażenia podwójną rolę: induktora odpowiedzi odpornościowej gąsienic oraz czynnika wirulencji. Jako czynnik aktywujący mechanizmy odpowiedzi odpornościowej powoduje indukcję syntezy peptydów przeciwdrobnoustrojowych i inhibitorów metaloproteaz, oraz zwiększenie poziomu ekspresji i aktywności lizozymu a także poziomu apolipoforyny III. Elastaza B jako czynnik wirulencji bierze udział w degradacji peptydów przeciwbakteryjnych.

Wzrost stężenia jak i aktywności lizozymu w hemolimfie gąsienic *G. mellonella* zakażonych bakterią *P. aeruginosa* wskazuje, że lizozym jest mało wrażliwy na działanie proteaz tej bakterii, na przykład, proteaza serynowa IV nie powoduje degradacji lizozymu w warunkach *in vitro*, pomimo tego, że enzym zawiera w swojej strukturze reszty lizyny, stanowiące potencjalne miejsca cięcia dla tej proteazy.

Wydaje się, że u *G. mellonella* w indukcję syntezy humoralnych czynników odpowiedzi odpornościowej zaangażowane są różne mechanizmy tj. zależny od obecności obcych struktur (model odporności „infectious-non self”) jak i bakteryjnych czynników wirulencji odbieranych przez organizm gospodarza jako „sygnał zagrożenia”.

## Piśmiennictwo

- Altancicek B., Linder M., Linder D., Preissner K.T., Vilcinskas A.: Microbial metalloproteinases mediate sensing of invading pathogens and activated innate immune response in the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. *Infect. Immun.* **75**, 175–183 (2007)
- Altancicek B., Vilcinskas A.: Metamorphosis and collagen-IV-fragments stimulate innate immune response in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Dev. Comp. Immunol.* **30**, 1108–1118 (2006)
- Andrejko M., Cytryńska M., Jakubowicz T.: Apolipoprotein III is a substrate for protease IV from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Letters* **243**, 331–337 (2005)
- Andrejko M., Mizerska-Dudka M.: Elastase B of *Pseudomonas aeruginosa* stimulates the humoral immune response in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* **107**, 16–26 (2011)
- Andrejko M., Mizerska-Dudka M., Jakubowicz T.: Changes in *Galleria mellonella* lysozyme level and activity during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Folia Microbiol.* **53**, 147–151 (2008a)
- Andrejko M., Mizerska-Dudka M., Jakubowicz T.: Changes in *Galleria mellonella* apolipoprotein III level during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J. Invertebr. Pathol.* **97**, 14–19 (2008b)
- Andrejko M., Mizerska-Dudka M., Jakubowicz T.: Antibacterial activity *in vivo* and *in vitro* in the hemolymph of *Galleria mellonella* infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Comp. Biochem. Physiol. B*, **152**, 118–123 (2009)
- Andrejko M., Zdybicka-Barabas A., Cytryńska M.: Diverse effects of *Galleria mellonella* infection with entomopathogenic and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Invertebr. Pathol.* **115**, 14–25 (2014)
- Andrejko M., Zdybicka-Barabas A., Janczarek M., Cytryńska M.: Three *Pseudomonas aeruginosa* strains with different protease profiles. *Acta Biochim. Polonica*, **60**, 83–90 (2013)
- Andrejko M., Zdybicka-Barabas A., Wawrzoszek M., Cytryńska M.: Diverse susceptibility of *Galleria mellonella* humoral immune response factors to the exoprotease activity of entomopathogenic and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Zool. Sci.* **30**, 345–351 (2013)
- Aperis G., Fuchs B.B., Anderson C.A., Warner J.E., Calderwood S.B., Mylonakis E.: *Galleria mellonella* as a model host to study infection by the *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Microb. Infect.* **9**, 729–734 (2007)
- Aston W.P., Chadwick J.S., Henderson M.J.: Effect of cobra venom factor on the *in vivo* immune response in *Galleria mellonella* to *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Invertebr. Pathol.* **27**, 171–176 (1976)
- Bergin D., Brennan M., Kavanagh K.: Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. *Microbes Infect.* **5**, 1389–1395 (2003)
- Bergin D., Murphy L., Keenan J., Clynes M., Kavanagh K.: Pre-exposure to yeast protects larvae of *Galleria mellonella* from a subsequent lethal infection by *Candida albicans* and is mediated by the increased expression of antimicrobial peptides. *Microbes Infect.* **8**, 2105–2112 (2006)
- Brivio M.F., Pagani M., Restelli S.: Immune suppression of *Galleria mellonella* (Insecta, Lepidoptera) humoral defenses induced by *Steinernema feltiae* (Nematoda, Rhabditida): involvement of the parasite cuticle. *Exp. Parasitol.* **1001**, 149–156 (2002)
- Brown S.E., Howard A., Kasprzak A.B., Gordon K.H., East P.D.: A peptidomic study reveals the impressive antimicrobial peptide arsenal of the wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **39**, 792–800 (2009)
- Caballero A.R., Moreau J.M., Engel L.S., Marquart M.E., Hill J.M., O'Callaghan R.J.: *Pseudomonas aeruginosa* protease IV enzyme assays and comparison to other *Pseudomonas* proteases. *Anal. Biochem.* **290**, 330–337 (2001)
- Chadwick J.S., Vilk E.: Endotoxins from several bacterial species as immunizing agents against *Pseudomonas aeruginosa* in *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* **13**, 410–415 (1969)
- Chamilos G.M., Lionakis R., Lewis R., Kontogiannis D.: Role of mini-host models in the study of medically important fungi. *Lancet Infect. Dis.* **7**, 42–55 (2007)
- Champion O.L., Cooper I.A., James S.L., Ford D., Karlyshev A., Wren B.W., Duffield M., Oyston P.C., Titball R.W.: *Galleria mellonella* as an alternative infection model for *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microbiology*, **155**, 1516–1522 (2009)
- Chamy L.E., Leclerc V., Caldelari I., Reichhart J.M.: Sensing of “danger signals” and pathogen-associated molecular patterns defines binary signaling pathways “upstream” Toll. *Nat. Immunol.* **9**, 1165–1170 (2008)
- Clermont A., Wedde M., Seitz V., Podsiadlowski L., Lenze D., Hummel M., Vilcinskas A.: Cloning and expression of an inhibitor of microbial metalloproteinases from insects contributing to innate immunity. *Biochem. J.* **382**, 315–322 (2004)
- Coleman J.J., Muhammed M., Kasperkovitz P.V., Vyas J.M., Mylonakis E.: *Fusarium* pathogenesis investigated using *Galleria mellonella* as a heterologous host. *Fungal Biol.* **115**, 1279–1289 (2011)
- Cotter G., Doyle S., Kavanagh K.: Development of an insect model for the *in vivo* pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **27**, 163–169 (2000)
- Cytryńska M.: O odporności bez przeciwciał. *Post. Biol. Komórki*, **36**, 309–324 (2009)
- Cytryńska M., Mak P., Zdybicka-Barabas A., Suder P., Jakubowicz T.: Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. *Peptides*, **28**, 533–546 (2007)
- Cytryńska M., Zdybicka-Barabas A., Jabłoński P., Jakubowicz T.: Detection of antibacterial polypeptide activity *in situ* after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **299**, 274–276 (2001)
- Dalhammar G., Steiner H.: 1984. Characterization of inhibitor A, a protease from *Bacillus thuringiensis* which degrades attacins and cecropins, two classes of antibacterial proteins in insects. *Eur. J. Biochem.* **139**, 247–252 (1984)
- Desbois A.P., Coote P.J.: Utility of greater wax moth larva (*Galleria mellonella*) for evaluating the toxicity of efficacy of new antimicrobial agents. *Adv. Appl. Microbiol.* **78**, 25–49 (2012)
- Dettloff M., Kaiser B., Wiesner A.: Localization of injected apolipoprotein III *in vivo* – new insights into the immune activation process directed by this protein. *J. Insect Physiol.* **47**, 789–797 (2001)
- Duan K., Surette M.G.: Environmental regulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Las and Rhl quorum-sensing systems. *J. Bacteriol.* **189**, 4827–4836 (2007)
- Dunphy G.B., Morton D.B., Kropinski A., Chadwick J.M.: Pathogenicity of lipopolysaccharide mutants of *Pseudomonas aeruginosa* for larvae of *Galleria mellonella*: bacterial properties associated with virulence. *J. Invertebr. Pathol.* **47**, 48–55 (1986)
- Dunphy G.B., Oberholzer U., Whiteway M., Zakarian R.J., Boomer I.: Virulence of *Candida albicans* mutants toward larval *Galleria mellonella* (Insecta, Lepidoptera, Gallieriae). *Can. J. Microbiol.* **49**, 514–524 (2003)
- Engström A., Engström P., Tao Z.J., Carlsson A., Bennich H.: Insect immunity: The primary structure of the antibacterial protein attacin F and its relation to two native attacins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J.* **3**, 2065–2070 (1984)

35. Fröblius A.C., Kanost M.R., Götz P., Vilcinskas A.: Isolation and characterization of novel inducible serine protease inhibitors from larval hemolymph of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Eur. J. Biochem.* **267**, 2046–2053 (2000)
36. Fuchs B., Mylonakis E.: Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 346–351 (2006)
37. Gliński Z., Jarosz J.: Zjawiska odporności przeciwważkowej u bezkręgowców. Wydawnictwo UMCS, Lublin (1997)
38. Götz P., Boman H.G., Boman A.: Interaction between insect immunity and insect pathogenic nematode with symbiotic bacteria. *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B* **212**, 333–350 (1981)
39. Griesch J., Wedde M., Vilcinskas A.: Recognition and regulation of metalloproteinase activity in the haemolymph of *Galleria mellonella*, a new pathway mediating induction of humoral immune responses. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **30**, 461–472 (2000)
40. Halwani A.E., Niven D.F., Dunphy G.B.: Apolipoprotein-III and the interactions of lipoteichoic acids with the immediate immune responses of *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* **76**, 233–241 (2000)
41. Hancock R.E.W., Brown K.L., Mookherjee N.: Host defence peptides from invertebrates – emerging antimicrobial strategies. *Immunobiol.* **211**, 315–322 (2006)
42. Hultmark D.: Insect lysozymes (w) Lysozymes: Model Enzymes in Biochemistry and Biology, red. P. Jollès, Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, 1996, s. 87–102
43. Jander G., Rahme L.G., Ausubel F.M.: Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J. Bacteriol.* **182**, 3843–3845 (2000)
44. Jarrell K.F., Kropinski A.M.: The virulence of protease and cell surface mutants of *Pseudomonas aeruginosa* for the larvae of *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* **39**, 395–400 (1982)
45. Kavanagh K., Reeves E.P.: Exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**, 101–112 (2004)
46. Kim C.H., Lee J.H., Kim I., Seo S.J., Son S.M., Lee K.Y., Lee I.H.: Purification and cDNA cloning of a cecropin-like peptide from the great wax moth, *Galleria mellonella*. *Mol. Cells*, **17**, 262–266 (2004)
47. Kučera M., Lysenko O.: The mechanism of pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* V. Isolation and properties of the proteinases toxic for larvae of the greater wax moth *Galleria mellonella* L. *Folia Microbiol.* **13**, 288–294 (1968)
48. Kučera M., Lysenko O.: The mechanism of pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* VIII. Isolation of hemolymph proteins from *Galleria mellonella* larvae and their digestibility by the toxic protease. *J. Invertebr. Pathol.* **17**, 203–210 (1971)
49. Lee Y.S., Yun E.K., Jang W.S., Kim I., Lee J.H., Park S.Y., Ryu K.S., Seo S.J., Kim C.H., Lee I.H.: Purification, cDNA cloning and expression of an insect defensin from the great wax moth, *Galleria mellonella*. *Insect Mol. Biol.* **13**, 65–72 (2004)
50. Lionakis M.S.: *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts. *Virulence*, **2**, 521–527 (2011)
51. Loh J.M.S., Adenwalla N., Wiles S., Proft T.: *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. *Virulence*, **4**, 419–428 (2013)
52. Lysenko O.: The mechanism of pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula. I. The pathogenicity of strain N-06 for larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* **5**, 78–82 (1963)
53. Lysenko O.: The mechanism of pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula. II. A toxic substance produced in filtrates of cultures. *J. Invertebr. Pathol.* **5**, 83–88 (1963)
54. Lysenko O.: The mechanism of pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula. III. The effect of N-06 toxin on the oxygen consumption of *Galleria* prepupae. *J. Invertebr. Pathol.* **5**, 89–93 (1963)
55. Lysenko O.: The mechanism of pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula. IV. The antigenic character of the toxin produced by strain N-06. *J. Invertebr. Pathol.* **5**, 94–97 (1963)
56. Lysenko O., Kučera M.: The mechanism of pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*. VI. The toxicity of proteinases for larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella* L. *Folia Microbiol.* **13**, 295–299 (1968)
57. Ma G., Hay D., Li D., Asgard S., Schmidt O.: Recognition and inactivation of LPS by lipophorin particles. *Dev. Comp. Immunol.* **30**, 619–626 (2006)
58. Madziara-Borusiewicz K., Lysenko O.: The mechanism of pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*. VII. The influence of toxic proteinase on hemocytes of *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* **17**, 138–140 (1971)
59. Mak P., Chmiel D., Gacek G.J.: Antibacterial peptides of the moth *Galleria mellonella*. *Acta Biochim. Pol.* **48**, 1191–1195 (2001)
60. Mak P., Zdybicka-Barabas A., Cytryńska M.: A different repertoire of *Galleria mellonella* antimicrobial peptides in larvae challenged with bacteria and fungi. *Dev. Comp. Immunol.* **34**, 1129–1136 (2010)
61. Mariencheck W.I., Alcorn J.F., Palmer S.M., Wright J.R.: *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D. *Am. J. Respir. Cell Mol.* **28**, 528–537 (2003)
62. Matsumoto K., Shams N.B., Hanninen L.A., Kenyon K.R.: Proteolytic activation of corneal matrix metalloproteinases by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Curr. Eye Res.* **11**, 1105–1109 (1992)
63. Miyata S., Casey M., Frank D.W., Ausubel F.M., Drenkard E.: 2003. Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect. Immun.* **71**, 2404–2413 (2003)
64. Miyoshi S-I., Shinoda S.: Microbial metalloproteinases and pathogenesis. *Microbes Infect.* **2**, 91–98 (2000)
65. Mylonakis E., Moreno R., El Khoury J.B., Idnurm A., Heitman J., Calderwood S.B., Ausubel F.M., Diener A.: *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect. Immun.* **73**, 3842–3850 (2005)
66. Narayanaswami V., Ryan R.O.: Molecular basis of exchangeable apolipoprotein function. *Biochim. Biophys. Acta*, **1438**, 15–36 (2000)
67. Nguyen L.T., Haney E.F., Vogel H.J.: The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.* **29**, 464–472 (2011)
68. Olsen R.J., Watkins M.E., Cantu C.C., Beres S.B., Musser J.M.: Virulence of serotype M3 group A *Streptococcus* strains in wax worms (*Galleria mellonella* wax). *Virulence*, **2**, 111–119 (2011)
69. Oztug M., Martinon D., Weers P.M.M.: Characterization of the apolp-III/LPS complex: insight into the mode of binding interaction. *Biochemistry*, **51**, 6220–6227 (2012)
70. Park S., Kim K.M., Lee J.H., Seo S.J., Lee I.H.: Extracellular gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a defense system in insect hemolymph and human serum. *Infect. Immun.* **75**, 1861–1869 (2007)
71. Peleg A.Y., Jara S., Monga D., Eliopoulos G.M., Moellering R.C., Jr., Mylonakis E.: *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutic. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 2605–2609 (2009)
72. Peters J.E., Galloway D.R.: Purification and characterization of an active fragment of the LasA protein from *Pseudomonas aeruginosa*: enhancement of elastase activity. *J. Bacteriol.* **172**, 2236–2240 (1990)
73. Pratt C.C., Weers P.M.M.: Lipopolysaccharide binding of an exchangeable apolipoprotein, apolipoprotein III, from *Galleria mellonella*. *Biol. Chem.* **385**, 1113–1119 (2004)



74. Reeves E.P., Messina C.G., Doyle S., Kavanagh K.: Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. *Mycopathologia*, **158**, 73–79 (2004)
75. Renwick J., Daly P., Reeves E.P., Kavanagh K.: Susceptibility of larvae of *Galleria mellonella* to infection by *Aspergillus fumigatus* is dependent upon stage of conidial germination. *Mycopathologia*, **161**, 377–384 (2006)
76. Rumbaugh K.P., Griswold J.A., Hamood A.N.: *Pseudomonas aeruginosa* strains obtained from patients with tracheal, urinary tract and wound infection: variations in virulence factors and virulence genes. *J. Hosp. Infect.* **43**, 211–218 (1999)
77. Schell M.A., Lipscomb L., DeShazer D.: Comparative genomics and an insect model rapidly identify novel virulence genes of *Burkholderia mallei*. *J. Bacteriol.* **190**, 2306–2313 (2008)
78. Schmidtchen A., Frick I.-M., Anderson E., Tapper H., Björck L.: Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol. Microbiol.* **46**, 157–168 (2002)
79. Schmidtchen A., Holst E., Tapper H., Björck L.: Elastase-producing *Pseudomonas aeruginosa* degrade plasma proteins and extracellular products of human skin and fibroblasts, and inhibit fibroblast growth. *Microb. Pathogenesis*, **34**, 47–55 (2003)
80. Schmidtchen A., Wolff H., Hansson C.: Differential proteinase expression by *Pseudomonas aeruginosa* derived from chronic leg ulcers. *Acta Derm. Venereol.* **81**, 406–409 (2001)
81. Seed K.D., Dennis J.J.: Development of *Galleria mellonella* as an alternative infection model for the *Burkholderia cepacia* complex. *Infect. Immun.* **76**, 1267–1275 (2008)
82. Shigematsu T., Fukushima J., Oyama M., Tsuda M., Kawamoto S., Okuda K.: Iron-mediated regulation of alkaline proteinase production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Immunol.* **45**, 579–590 (2001)
83. Vilcinskis A.: Lepidoptera as model mini-hosts for human pathogens and as a resource for peptide antibiotics (w) *Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera*, red. M.R. Goldsmith, F. Marec, CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, 2009, s. 293–305
84. Vilcinskis A., Matha V.: Antimycotic activity of lysozyme and its contribution to antifungal humoral defense reactions in *Galleria mellonella*. *Anim. Biol.* **6**, 19–29 (1997)
85. Wedde M., Weise C., Kopaček P., Franke P., Vilcinskis A.: Purification and characterization of an inducible metalloprotease inhibitor from the hemolymph of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*. *Eur. J. Biochem.* **255**, 535–543 (1998)
86. Weers P.M.M., Ryan R.O.: Apolipoprotein III: Role model apolipoprotein. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **36**, 231–240 (2006)
87. Whitten M.M.A., Tew I.F., Lee B.L., Ratcliffe N.A.: A novel role for an insect apolipoprotein (apolipoprotein III) in  $\beta$ -1,3-glucan pattern recognition and cellular encapsulation reactions. *J. Immunol.* **172**, 2177–2185 (2004)
88. Wimley W.C., Hristova K.: Antimicrobial peptides: successes, challenges and unanswered questions. *J. Membr. Biol.* **239**, 27–34 (2011)
89. Winzer K., Williams P.: Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**, 131–143 (2001)
90. Woods D.E., Schaffer M.S., Rabin H.R., Campbell G.D., Sokol P.A.: Phenotypic comparison of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a variety of clinical sites. *J. Clin. Microbiol.* **24**, 260–264 (1986)
91. Yang J., Zeng H.-M., Lin H.-F., Yang X.-F., Liu Z., Guo L.-H., Yuan J.-J., Qiu D.-W.: An insecticidal protein from *Xenorhabdus budapestensis* that results in prophenoloxidase activation in the wax moth, *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* **110**, 60–67 (2012)
92. Yu K.H., Kim K., Lee J., Lee H., Kim S., Cho K., Nam M., Lee I.: Comparative study on characteristics of lysozymes from the hemolymph of three lepidopteran larvae, *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*, *Agrius convolvuli*. *Dev. Comp. Immunol.* **26**, 707–713 (2002)
93. Zdybicka-Barabas A., Cytryńska M.: Involvement of apolipoprotein III in antibacterial defense of *Galleria mellonella* larvae. *Comp. Biochem. Physiol. B*, **158**, 90–98 (2011)
94. Zdybicka-Barabas A., Cytryńska M.: Apolipoproteins and insect immune response. *ISJ*, **10**, 58–68 (2013)
95. Zdybicka-Barabas A., Mak P., Klys A., Skrzypiec K., Mendyk E., Fiołka M.J., Cytryńska M.: Synergistic action of *Galleria mellonella* anionic peptide 2 and lysozyme against Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1818**, 2623–2635 (2012)
96. Zdybicka-Barabas A., Stączek S., Mak P., Skrzypiec K., Mendyk E., Cytryńska M.: Synergistic action of *Galleria mellonella* apolipoprotein III and lysozyme against Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1828**, 1449–1456 (2013)

# KULTURY STARTEROWE W PIEKARSTWIE – MOŻLIWOŚĆ ODZWIERCIEDLENIA TRADYCYJNEGO PROCESU FERMENTACJI POPRZECZ KSZTAŁTOWANIE MIKROBIOTA ZAKWASÓW PIEKARSKICH W PRZEMYSŁOWEJ PRODUKCJI PIECZYWA

Katarzyna Piasecka-Jóźwiak<sup>1\*</sup>, Beata Chabłowska<sup>1</sup>, Ilona Stefańska<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Technologii Fermentacji, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego  
im. prof. Waclawa Dąbrowskiego, Warszawa

<sup>2</sup>Zakład Mikrobiologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Wpłynęło w październiku 2015 r.  
Zaakceptowano w kwietniu 2016 r.

1. Wstęp. 2. Bioróżnorodność mikrobiologiczna zakwasów. 3. Zdolność do rozwoju i adaptacji LAB w różnych typach zakwasów. Współzawodnictwo bakterii wprowadzonych z kulturą starterową z autochtoniczną mikrobiota zakwasów. 4. Niektóre właściwości LAB umożliwiające im konkurencyjną przewagę w ciastach zakwasowych. 5. Mikrobiota zakwasów ze zbóż niechlebowych i pseudozbóż. 6. Dobieranie składu kultur starterowych z autochtonicznych gatunków LAB czy unifikacja w oparciu o gatunki najbardziej rozpowszechnione. 7. Podsumowanie

## **Starter cultures for baked goods – the traditional fermentation process by formation of sourdough microbiota in the industrial bread production**

*Abstract:* Application of sourdough, an old fermentation technology, in artisanal bakery allows us to obtain bread with specific flavor and texture. In recent years, this technology has been also reintroduced to the industrial practice, especially due to increased consumer demand for natural bread, without technological additives and preservatives, characterized by traditionally aroma and taste. In order to ensure reproducible and constant quality of bread, specific starter cultures containing lactic acid bacteria (LAB) or, optionally, LAB and yeast strains, are used. The paper discusses issues related to the biodiversity of LAB species representing biota of natural sourdoughs obtained from different cereals. It also presents the specific properties of the LAB strains which allow them to colonize and dominate in the sourdough environment. Moreover, in this review we focus on the role of autochthonous bacterial strains in starter cultures. The use of such strains results in better quality of bread, its original sensory properties and allows the industry to avoid the standardization of taste and smell of baked goods.

1. Introduction. 2. Microbial biodiversity of sourdough. 3. The ability of LAB to grow and adapt to different types of sourdough. Competition of bacteria introduced with the starter culture with the autochthonous microbiota of sourdough. 4. Selected properties of LAB giving them a competitive advantage in sourdough. 5. Microbiota of sourdough non-bread cereals and pseudo-cereals. 6. Selection of LAB autochthonous species for the starter cultures (composition) versus the unification based on the most prevalent species. 7. Summary

**Słowa kluczowe:** bakteryjne kultury starterowe, zakwasy piekarskie

**Key words:** bacterial starter cultures, sourdough

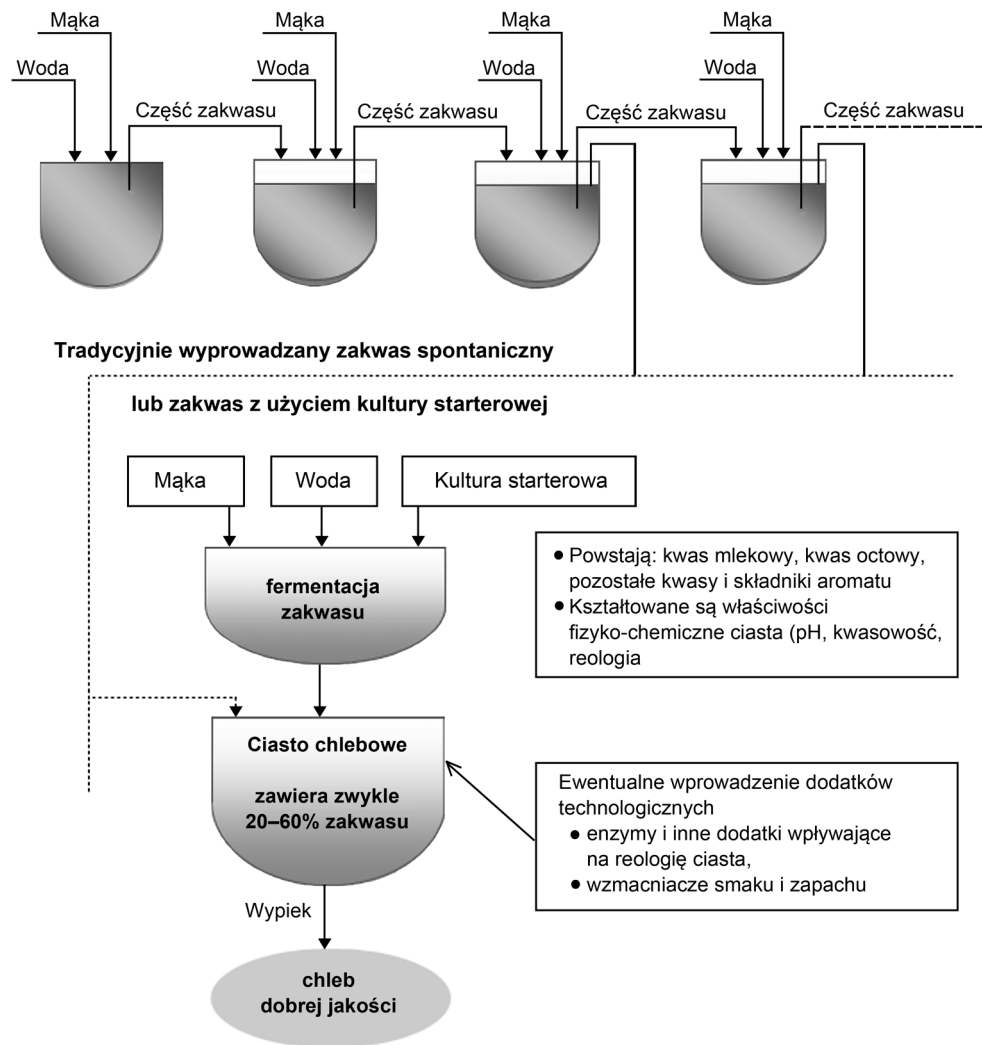
## **1. Wstęp**

Kultury starterowe stosowane są powszechnie w przemyśle spożywczym od lat 60. XX wieku. Początkowo celem ich wprowadzania było przede wszystkim podniesienie poziomu higieny i bezpieczeństwa produkcji żywności poprzez inicjowanie fermentacji i opanowanie środowiska przez drobnoustroje zawarte w kulturach. W tamtym okresie drobnoustroje włączane w skład kultur starterowych izolowane były z różnych środowisk i pochodziły w większości z uznanych kolekcji kultur. Za dobre źródło bakterii fermentacji mlekowej (lactic acid bacteria, LAB) uważane były na przykład fermentowane produkty mleczarskie [61, 62].

Mikroorganizmy do kultur starterowych dobierano na podstawie ich poznanych właściwości oraz ustalonych warunków prawidłowego przebiegu procesu produkcyjnego. Taki dobór składu kultur starterowych uznano z czasem za jedną z przyczyn ujednoczenia smaku i utraty tradycyjnych cech organoleptycznych wielu produktów m.in. pieczywa.

W ostatnich latach dominował pogląd, że kultury starterowe powinny zawierać mikroorganizmy charakterystyczne dla mikrobiota danego środowiska np. zakwasów piekarskich, kiszzonek warzywnych, przetworów mlecznych otrzymanych w efekcie spontanicznej fermentacji. Dlatego też środowiska naturalnie fermentowanej żywności (tradycyjnie fermentowanych

\* Autor korespondencyjny: Zakład Technologii Fermentacji, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Waclawa Dąbrowskiego, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa; tel. 22 606 36 56; e-mail: katarzyna.piasecka@ibprs.pl



Rys. 1. Wpływ zastosowania kultury starterowej na skrócenie procesu przygotowania ciasta chlebowego

wyrobów) stały się przedmiotem intensywnych badań mikrobiologicznych mających na celu wykazanie ich bioróżnorodności poprzez izolację i identyfikację możliwie największej liczby drobnoustrojów, które zaczęto włączać w skład kultur starterowych nowej generacji [17]. Kultury starterowe stosowane są nie tylko do zapewnienia stałej i powtarzalnej jakości zakwasów i wypieków, lecz również w celu skrócenia procesu technologicznego w piekarni (rys. 1).

Jednymi z najczęściej badanych środowisk były tradycyjnie prowadzone/rzemieślnicze zakwasy piekarskie, przede wszystkim żytnie i pszenne, w których poszukiwano szczepów bakterii fermentacji mlekowej i drożdży [30]. Pieczywo zakwasowe wytwarzane było tradycyjnie na Północy Europy ze względu na wykorzystywanie w piekarstwie mąki żytniej, natomiast na południu kontynentu proces fermentacji z udziałem LAB stosowano do polepszenia cech technologicznych mąki niskiej jakości, najczęściej pszennej. Pieczywo przygotowywane z udziałem mąki żytniej (w różnych proporcjach do mąki pszennej lub będącej jedynym

surowcem) oraz jęczmiennej jest charakterystyczne dla Europy Środkowej, Wschodniej i Skandynawii. Mąka żytnia stosowana jako surowiec „wymusza” ukwaszanie ciast ponieważ zawiera ona, w stosunku do mąki pszennej, znacznie mniej glutenu, którego obecność powoduje powstawanie pożądanej struktury ciasta pszennego. Proces fermentacji, prowadzonej przez bakterie fermentacji mlekowej, umożliwia powstanie siatki z pentozanów zatrzymującej wodę i dwutlenek węgla oraz pęcznienie skrobi, co w konsekwencji nadaje pieczywu właściwe cechy, takie jak np. porowatość i elastyczność miękkiszu. Sposób otrzymywania pieczywa zakwasowego jest bardzo różnorodny w zależności od regionu geograficznego i tradycji kulturowych. Różne rodzaje chlebów i bułek pszennych wypiekanych z ciast ukwaszanych są charakterystyczne dla krajów rejonu Morza Śródziemnego, np. francuskie *pain au levain*, *madre* lub *biga* we Włoszech [10]. Tradycyjne włoskie ciasta *Panettone* lub *Pandoro* są otrzymywane z działem ciasta zakwasowego [40, 52]. We Włoszech zakwasy stosowane są w produkcji około 30% pieczywa

w wyniku czego powstaje ponad 200 różnych typów wypieków regionalnych.

W piśmiennictwie istnieją umowne klasyfikacje ciast zakwasowych różniące się w zależności od tego czy są formułowane na potrzeby badań naukowych czy praktyki przemysłowej [10, 27, 44, 82, 87]. W zależności od inicjowania fermentacji ciasta, sposobu i warunków fizycznych prowadzenia procesu fermentacji, zakwasy dzieli się na trzy podstawowe typy. Typ pierwszy to zakwasy prowadzone w sposób tradycyjny, najczęściej poprzez fermentację spontaniczną. Charakteryzują się ciągłym sposobem propagacji, to jest codziennym lub częstszym zaszczepianiem (inokulowaniem) nowej porcji mąki wymieszanej z wodą częścią zakwasu (tzw. zaczątkiem) i powtarzaniem takiego sposobu postępowania przez dłuższy czas, co służy utrzymaniu mikroorganizmów zakwasu w stanie wysokiej aktywności metabolicznej. Proces przebiega w temperaturze od 20°C do 30°C. Zakwasy typu pierwszego wykorzystywane są w produkcji tradycyjnych rodzajów pieczywa: Panaetone, Pugliese, Toscanon, zakwasowy chleb French, pieczywo San Francisco. Zakwasy typu drugiego prowadzone są w temperaturze powyżej 30°C, przy dużej wydajności ciasta w celu otrzymania zakwasu o wysokiej kwasowości i aromacie. Ten typ ciasta wykorzystywany jest najczęściej w produkcji przemysłowej pieczywa. Obecnie w wyprowadzeniu tego typu zakwasu na ogół stosowane są bakteryjne lub bakteryjno-drożdżowe kultury starterowe [86, 90]. Typ trzeci ciast zakwasowych odnosi się do fermentacji rozpoczynanej przez zastosowanie kultury starterowej, a następnie kontynuowanej przez codzienne odświeżanie. Natomiast w produkcji przemysłowej odnosi się do suszonego zakwasu stosowanego jako nośnik smaku i aromatu. W zależności od typu ciasta i sposobu propagacji oraz warunków procesu ustala się specyficzny skład mikrobiota [50, 87, 89, 92].

## 2. Bioróżnorodność mikrobiologiczna zakwasów

Wyniki wieloletnich badań, prowadzonych w różnych krajach, wskazują na związek mikroorganizmów zasiedlających ciasta zakwasowe z regionem geograficznym, gatunkiem zboża, z którego sporządzona jest mąka, rodzajem mąki (całoziarnowa lub oczyszczona), co wiąże się z zawartością popiołu, stopniem jej rozdrobnienia, oraz ze sposobem prowadzenia zakwasów (proporcja mąki i wody czyli wydajność ciasta, temperatura, czas prowadzenie, liczba odnawień zakwasu) [5, 21, 33, 83, 85, 87].

W ekosystemach ciast fermentowanych stwierdzono obecność zróżnicowanych gatunków bakterii fermentacji mlekowej [6, 8, 88]. Największy wpływ na przebieg fermentacji ciast zakwasowych mają, charakterystyczne

dla tych środowisk, LAB hetrofermentywne, w mniejszym stopniu szczepy fakultatywnie heterofermentywne i obligatoryjnie homofermentywne [6, 8, 86]. Spośród ponad sześćdziesięciu gatunków bakterii fermentacji mlekowej, występujących w ciastach zakwasowych, większość należy do rodzaju *Lactobacillus*; w mniejszej liczbie reprezentowane są rodzaje *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium* i *Leuconostoc*. Biorąc pod uwagę, że środowisko zakwasów jest specyficzną, złożoną niszą ekologiczną, trudną do odtworzenia przy użyciu podłoży laboratoryjnych, należy założyć, że wiele związanych z tym środowiskiem drobnoustrojów, nie zostało jeszcze poznanych [49, 50]. W zakwasach piekarskich powszechnie stwierdza się obecność takich gatunków, jak *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. pentosus*, *L. sanfranciscensis*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. alimentarius*, *L. paralimentarius*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. amylophilus*, *L. delbruecki*, *L. helveticus*, *L. mindensis*. Wraz z intensyfikacją eksploracji mikrobiota ciast zakwasowych stale powiększa się liczba gatunków *Lactobacillus* spp. wykrywanych w ciastach, wyizolowano także bakterie należące do innych rodzajów jak na przykład *Weissella cibaria*, *Weissella confusa*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidililactici*. Gatunkami nietypowymi, rzadziej izolowanymi z zakwasów są *Carnobacterium divergens*, *Carnobacterium maltaromaticum* i *Carnobacterium piscicola* [4, 25]. Niektóre spośród bakterii spotykanych w ciastach są szeroko rozpowszechnione w żywności, przede wszystkim produktach fermentowanych; należą do tej grupy *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. amylovorus* [6, 87]. Istnieją także szczepy LAB, które w dotychczasowych badaniach mikrobiologicznych wykryto wyłącznie w środowisku zakwasów np. *L. acidifarinae*, *L. hammesi*, *L. secaliphilus*, *L. zymae*, *L. rosiae* [13]. Ze środowiskiem zakwasów związane są również gatunki *L. pontis*, *L. panis*, *L. paralimentarius*, *L. frumenti*, *L. mindensis*, wyizolowane z ciast pszennych i opisane jako mikroflora autochtoniczna. Spośród bakterii fakultatywnie heterofermentywnych gatunkiem najczęściej spotykanym w zakwasach jest *L. plantarum*, natomiast wśród obligatoryjnie heterofermentywnych wymieniane są szczepy z gatunków *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. buchneri*, *L. sanfranciscensis* oraz należące do gatunków *Weissella cibaria* i *Weissella confusa* [69, 70, 78, 80, 88].

Wprowadzanie do rutynowej praktyki laboratoryjnej technik molekularnych spowodowało reklasyfikację niektórych szczepów LAB izolowanych z ekosystemów zakwasów. Przykładowo, niektóre szczepy przypisane początkowo do gatunku *L. plantarum* zostały obecnie zaliczone do gatunków *L. paraplantarum* lub *L. pentosus* [77].

Spośród szeregu czynników determinujących skład mikrobiota zakwasów jednymi z najważniejszych są surowiec, z którego powstała mąka oraz sposób jej

Tabela I  
Bakterie fermentacji mlekowej związane z ekosystemami zakwasów z mąki ze zbóż chlebowych (pszenica i żyto)  
niechlebowych (jęczmień) i pseudozbóż (gryka)

Rodzaj zboża	Gatunki bakterii fermentacji mlekowej wyizolowane z zakwasów	Piśmiennictwo
Pszenica	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	[22, 38]
	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. brevis</i>	[72]
	<i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. paralimentarius</i> , <i>Weissella cibaria</i>	[91]
	<i>L. sanfranciscensis</i>	[95, 96]
	<i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1. [32]
	<i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. farciminis</i>	[23]
	<i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Leuconostoc citreum</i> , <i>L. lactis</i> subs. <i>lactis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>Weissella confusa</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	[7]
	<i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>P. pentosaceus</i>	[58]
	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. sake</i> , <i>L. acetotolerans</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Carnobacterium divergens</i>	[25]
	<i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. hammesi</i> , <i>L. paralimentarius</i> , <i>L. spicheri</i> , <i>L. sakei</i>	[78]
	<i>L. plantarum</i> , <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. rossiae</i> , <i>L. paraalimentarius</i>	[69]
	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>W. cibaria</i> , <i>P. pentosaceus</i>	[31]
	<i>L. plantarum</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	[65]
	<i>L. plantarum</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. graminis</i>	[81]
Żyto	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. fermentum</i>	[34]
	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i>	[71]
	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. fructivorans</i> , <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>Pediococcus</i> spp.	[73]
	<i>L. fermentum</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>W. viridescens</i>	[74]
	<i>L. reuteri</i> , <i>L. panis</i> , <i>L. amylovorus</i>	[67]
	<i>L. amylovoru</i> , <i>L. pontis</i> , <i>L. frumenti</i> , <i>L. reuteri</i>	[55]
Otręby żytnie	<i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. mindensis</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. pontis</i> , <i>L. panis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. frumenti</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. reuteri</i>	[44]
Jęczmień	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i>	[94]
Gryka	<i>L. plantarum</i> , <i>W. cibaria</i> , <i>Leuconostoc holzapfelii</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. gallinarum</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. vaginalis</i> , <i>P. pentosaceus</i>	[53, 54]

przemiału; od nich bowiem zależy obecność związków mających istotny wpływ na wzrost mikroorganizmów. Należą do nich ilość i rodzaj węglowodanów dostępnych do fermentacji (maltoza, sacharoza, glukoza, fruktoza), obecność aminokwasów, kwasów tłuszczowych, witamin, mikroelementów, a także błonnika pokarmowego,  $\beta$ -glukanu, polifenoli, kwasów fitynowych. Składniki te i enzymatyczna aktywność mąki stymulują aktywność metaboliczną bakterii, co wpływa na ilość syntetyzowanych kwasów (mlekowego i octowego) oraz związków tworzących aromat ciast i pieczywa [28, 33, 68, 90].

Przykłady LAB związanych ze środowiskiem zakwasów z różnych mąk przedstawiono w tabeli I. Najwięcej uwagi poświęcono zakwasom z żyta i pszenicy, będących podstawowymi zbożami chlebowymi. W tabeli uwzględniono również bakterie związane z ekosystemami zbóż niechlebowych i pseudozbóż, gdyż obecnie zaczynają one odgrywać coraz większą rolę w pro-

dukcji pieczywa. Wynika to z trendów związanych z tzw. zdrowym żywieniem i wzrastającym zapotrzebowaniem na żywność funkcjonalną, ekologiczną, a także bezglutenową.

Szeroko opisanym obligatoryjnie heterofermentatywnym gatunkiem autochtonicznym dla zakwasów, zwłaszcza pszennych, jest *L. sanfranciscensis*. Bakterie te zostały po raz pierwszy scharakteryzowane i opisane jako *L. sanfrancisco* w 1971 roku przez Kline i Sugihara [38]. Na podstawie badań materiału genetycznego zidentyfikowano w tym gatunku około 50 szczepów [2, 36, 84]. Jak dotychczas jest to gatunek izolowany wyłącznie z zakwasów i uważany za najlepiej zaadaptowany do specyficznych warunków ciast zakwasowych i konkurencyjny wobec innych LAB [22, 84]. Decydują o tym unikatowe cechy *L. sanfranciscensis*, wyrażające się wysoką efektywnością wykorzystywania znajdujących się w środowisku ciasta węglowodanów: maltozy

i fruktozy, a także rybozy i glukonianu, wysokimi uzdolnieniami proteolitycznymi i aktywnością kwaszącą, syntezą związków o charakterze antymikrobiologicznym, bogactwem uwalnianych prekursorów związków lotnych, a także fizjologicznym powinowactwem do drożdży obecnych w zakwasach.

*L. sanfranciscensis* jest auksotrofem w odniesieniu do 12 aminokwasów, natomiast wykazuje zdolność do syntezy m.in. argininy, lizyny, cysteiny, asparagianinu. Obecność dwóch genów dla oligo-1,6-glukozydazy (LSA\_05810; LSA\_01770) wskazuje na zdolność do hydrolizy wiązania  $\alpha$ -1,6-D-glukozydowego oligosacharydów powstających ze skrobi i glikogenu (izomaltoza, izomaltotrioza, izomaltuloza, panoza). Wzrost *L. sanfranciscensis*, przy wykorzystaniu maltozy jako źródła węgla, przebiega szybciej przy obecności w środowisku takich związków jak fruktoza, cytrynian lub  $\alpha$ -ketoglutaran, które mogą stanowić alternatywne akceptory elektronów [84,90].

Poza bakteriami fermentacji mlekowej drugą ważną grupę drobnoustrojów tworzących ekosystem ciast zakwasowych stanowią drożdże. Wchodzą one w różnego rodzaju interakcje z bakteriami i współkształtującą właściwości zakwasów piekarskich i ciast. Wzajemne oddziaływania określonych gatunków LAB i drożdży mają duży wpływ na skład ekosystemów i dominację określonych gatunków w zależności od sposobu prowadzenia ciast. W przypadku zakwasów pszennych fermentujących spontanicznie obecność i wzrost *L. sanfranciscensis*, preferującego jako źródło energii maltozę, stwarza korzystne warunki do rozwoju nie metabolizujących maltozy drożdży *Saccharomyces exiguus* i *Candida humilis*. W efekcie hydrolizy maltozy z udziałem konstytutywnej, wewnątrzkomórkowej fosforylasy maltozy *L. sanfranciscensis* uwalniana jest do środowiska glukoza, co dostarcza substratu do wzrostu tych drożdży, nadając wzajemnym relacjom drobnoustrojów charakter związku mutualistycznego [2, 85]. W ekosystemach ciast zakwasowych powstają stabilne konsorcja LAB i drożdży, w których interakcje pomiędzy drobnoustrojami są zależne od szeregu czynników, jak na przykład temperatury i czasu prowadzenia fermentacji, rodzaju mąki i wydajności ciasta. W tworzeniu takich związków w zakwasach pszennych poza *L. sanfranciscensis* biorą udział szczepy z gatunku *L. plantarum* [45], natomiast w zakwasach żytnich występują stabilne związki pomiędzy *L. reuteri*, *L. johnsonii* a *Issachienkia orientalia*. Zdolność do tworzenia związków bakteryjno-drożdżowych ma charakter szczepowy, a nie gatunkowy [47, 49, 50, 70, 85].

W ciastach zakwasowych zidentyfikowano ponad 20 gatunków drożdży, w większości należących do rodzajów *Saccharomyces* i *Candida* [63]. W nowszych publikacjach jako częsty izololat wymieniany jest gatunek *Issatchienkia orientalis*, będący teleomorfem *Candida*

*krusei*. Gatunkiem najczęściej izolowanym z zakwasów żytnich, dobrze adaptującym się do tego środowiska jest *S. cerevisiae* [3, 16, 45]. Badania zakwasów żytnich pochodzących z rzemieślniczych piekarni, działających w różnych regionach Polski, wykazały powszechną obecność drożdży *S. cerevisiae* [4]. Każda z grup drobnoustrojów, aktywnych w procesie fermentacji, spełnia określone zadanie i dopiero suma ich oddziaływań pozwala uzyskać dojrzały zakwas, a następnie pieczywo o odpowiednich właściwościach. Niniejsze rozważania uwzględniają rolę drożdży w kształtowaniu cech zakwasów piekarskich jedynie w odniesieniu do ich specyficznych relacji z bakteriami fermentacji mlekowej. W celu zapewnienia powtarzalnej i pożądanej jakości zakwasów i pieczywa stosowane są kultury starterowe zarówno bakteryjno-drożdżowe jak i bakteryjne, zawierające jeden lub więcej szczepów LAB. W skład bakteryjno-drożdżowych starterów piekarskich włączane są *S. cerevisiae* i *S. exiguus* oraz drożdże z rodzaju *Candida* i *Torulopsis*, które biorą udział w kształtowaniu cech smakowo-zapachowych pieczywa [24, 28, 29, 44, 56, 59]. W miarę postępu badań nad drobnoustrojami zakwasów piekarskich opracowywane są również nowe kultury starterowe o specyficznych zastosowaniach.

### 3. Zdolność do rozwoju i adaptacji LAB w różnych typach zakwasów. Niektóre właściwości LAB umożliwiające im konkurencyjną przewagę w ciastach zakwasowych

Na kształtowanie się i stabilność mikrobiologicznych ekosystemów zakwasów istotny wpływ mają warunki w jakich prowadzona jest fermentacja, głównie temperatura, a także wartość pH i potencjał oksydo-redukcyjny [44]. Przykładowo związek bakterii *L. sanfranciscensis* i drożdży *Candida humilis* utrzymuje się trwale w zakwasach pszennych i żytnich w temperaturze pomiędzy 20°C a 30°C, przy odświeżaniu co 12–24 godziny, gdy zakwas poprzedniej fazy stanowi 5–20% kolejnej fazy ciasta [83]. Wykazano również, że *L. sanfranciscensis* nie rośnie przy wartościach pH niższych niż 3,8–4,0 [80]. Z kolei konsorcjum *L. reuteri*, *L. johnsonii* i *I. orientalis* utrzymuje się w zakwasach pszennych i żytnich dopóki ich temperatura pozostaje w zakresie 35–40°C, przy czym drożdże *I. orientalis* wymagają do wzrostu odpowiedniej ilości tlenu, dlatego ich rozwojowi sprzyja obecność w zakwasie otrąb, zwiększających porowatość ciasta [85]. Jak już wspomniano, interakcje pomiędzy drożdżami a bakteriami w zakwasach mogą mieć charakter szczepowy, a nie gatunkowy [59]. Obecność w zakwasach pszennych drożdży *S. cerevisiae* i bakterii *L. sanfranciscensis*, *L. paralimentarius*, *L. brevis* oraz w mniejszej liczbie *P. pentosaceus* i *W. cibaria* może powodować wolniej-

szy wzrost obydwu grup drobnoustrojów (ze względu na antagonizm o źródło węgla) oraz zwiększenie przez bakterie syntezy niektórych metabolitów mogących hamować wzrost drożdży np. mannitolu [59]. Sygnalizowano również możliwość negatywnego oddziaływania *L. paralimentarius* na wzrost *L. sanfranciscensis* [57].

Ewolucyjne przystosowania metaboliczne bakterii fermentacji mlekowej pozwalają im między innymi na adaptację do środowiska ciasta, a ich metabolity przyczyniają się do kształtowania właściwości reologicznych i organoleptycznych ciasta oraz jakości sensorycznej pieczywa. Związane jest to z możliwością wykorzystywania przez LAB różnych źródeł węgla i akceptorów elektronów, a także przekształcaniem aminokwasów w związki tworzące aromat pieczywa.

W wyniku fermentacji heksoz przez homofermentywne LAB szlakiem EMP (poprzez glikolizę) powstaje kwas mlekowy, podczas gdy fermentacja glukozy szlakiem fosfoketolazy pentozowej przez bakterie heterofermentywne prowadzi do powstawania, oprócz kwasu mlekowego, kwasu octowego, CO<sub>2</sub> i etanolu, w zależności od dostępności kosubstratów pozwalających na regenerację zredukowanych kofaktorów. Biorąc pod uwagę zapotrzebowanie na regenerację zredukowanych kofaktorów, homofermentywne i heterofermentywne LAB z rodzaju *Lactobacillus* wykazują różny wpływ na reakcje redox (potencjał oksydoredukcyjny) w ciastach [17, 18]. Disacharydy są rozkładane przy udziale specyficznych hydrolaz i fosfhydrolaz do monosacharydów.

Przewaga konkurencyjna heterofermentywnych bakterii fermentacji mlekowej w ciastach zakwasowych jest związana z ich łączną zdolnością do wykorzystania maltozy jako źródła węgla oraz kosubstratów takich jak tlen i fruktoza jako akceptorów elektronów, co jest sprzężone ze zwiększoną syntezą kwasu octowego [8, 60]. Tlen i fruktoza są redukowane odpowiednio do H<sub>2</sub>O i mannitolu, czemu towarzyszy utlenianie NADH, NADPH do odpowiednio NAD i NADP.

Większość szczepów *L. sanfranciscensis* fermentuje glukozę i maltozę, ale nie jest zdolna do wykorzystywania fruktozy jako źródła węgla. Szczepy te jednak wykazują aktywność dehydrogenazy mannitolu i redukują fruktozę do mannitolu z wysoką specyficznością [39]. Preferencyjne zużywanie fruktozy jako akceptora elektronów jest obserwowane w przypadku większości obligatoryjnie heterofermentatywnych pałeczek *Lactobacillus* spp.

Obligatoryjnie homofermentatywne i fakultatywnie heterofermentatywne laktobacillusy degradują maltozę i fruktozę po wyczerpaniu dostępnej w środowisku glukozy [20]. Fermentacja pentoz przez obligatoryjnie i fakultatywnie heterofermentatywne LAB prowadzona jest szlakiem fosfoketolazy pentozanowej. Stwierdzono, że heterofermentatywne bakterie *L. brevis*, *L. fermentum* i *Lactobacillus hilgardii* podczas wzrostu w zakwa-

sach charakteryzują się symultanicznym metabolizmem maltozy i pentoz [20].

Akumulacja tioli przez *L. reuteri* i *L. sanfranciscensis* chroni komórki bakteryjne przed stresem oksydacyjnym. Tirole podlegają następnie reakcjom wymiany z mostkami dwusiarczkowymi w białkach i w ten sposób zakłócają polimeryzację białek glutenowych w ciastach pszennych. Technologiczną konsekwencją tego procesu jest zwiększenie rozpuszczalność białek glutenowych, co w efekcie zmienia reologię ciast i ułatwia proteolityczny rozkład protein mąki [17]. Degradacja białek zbożowych podczas fermentacji zakwasów ma zasadniczy wpływ na zapach pieczywa, a także jego teksturę i objętość [19].

Większość zakwasowych LAB nie wykazuje związanej ze ścianą komórkową aktywności proteolitycznej, choć niektórzy autorzy wskazują na zdolność nielicznych szczepów do hydrolizy frakcji białek glutenowych tj. albumin, globulin i gliadyn [12, 14, 97]. W celu zaspokojenia zapotrzebowania na związki azotowe bakterie fermentacji mlekowej zużywają głównie peptydy hydrolizowane w większości przez wewnątrzkomórkowe peptydazy [20]. Metabolizm aminokwasów przez LAB przyczynia się do powstawania związków zapachowych, a zatem kształtowania się aromatu ciast zakwasowych i pieczywa. Przykładowo ornityna, jest prekursorem powstającej podczas pieczenia 2-acetyl-1-pyrroliny, kształtującej zapach skórki pieczywa. Szczepy LAB np. *L. amylolyticus*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. frumenti*, *L. pontis*, *L. reuteri*, *L. sakei* i niektóre szczepy *L. sanfranciscensis* konwertują (przekształcają) ornitynę do argininy poprzez szlak deiminazy argininy – ADI (arginine deiminase pathway). Szlak ten przyczynia się do homeostazy pH i tolerancji bakterii fermentacji mlekowej na kwasy.

#### 4. Mikrobiota zakwasów ze zbóż niechlebowych i pseudozbóż

W ostatnich latach poświęca się coraz więcej uwagi badaniom ekosystemów zakwasów otrzymanych ze zbóż niechlebowych (owies, jęczmień), prosa, ze starych odmian pszenicy (samopsza, płaskurka, orkisz), z pseudo zbóż (gryka, quinoa) i innych roślin nie wykorzystywanych dotychczas w Europie do produkcji pieczywa jak cassawa, amarantus [89]. Obecne zainteresowanie tymi surowcami wynika z bogactwa zawartych w nich składników odżywczych i prozdrowotnych, ponadto większość z nich nie zawiera glutenu.

Zakwasy przygotowane z mąki otrzymanej z takich surowców stanowią specyficzne nisze ekologiczne. Badania ich bioróżnorodności wykazały obecność gatunków bakterii, znanych ze środowisk zakwasów pszennych i żytnich, często jednak dominują w tych

środowiskach gatunki specyficznie do nich przystosowane. Przykładem jest występowanie i utrzymywanie się *L. brevis* w zakwasach jęczmiennych, co jest związane ze zdolnością tego gatunku do degradowania  $\beta$ -glukanu zbożowego, obecnego w jęczmieniu w stosunkowo dużych ilościach [43, 94]. *L. plantarum* jest gatunkiem powszechnie występującym w zakwasach niezależnie od rodzaju mąki, z której zostały sporządzone. Jest to związane z jego zdolnością do wykorzystywania różnych węglowodanów [37, 47, 51] oraz do syntezy większości aminokwasów. Opisano na przykład szczep *L. plantarum* będący auksotrofem w odniesieniu tylko do 3 aminokwasów [84]. Obecność szczepów z gatunku *L. plantarum* wykazywana jest również w naturalnie fermentujących, tradycyjnych produktach z prosa, kukurydzy, amarantusa, orkiszu. W zakwasach z gryki, fermentujących przy udziale autochtonicznej bioty LAB, stwierdzono obecność gatunków z rodzajów *Pediococcus pentosaceus*, *P. acidilactici* i *Weissella cibaria* [54, 56]. Różnorodność gatunków LAB wchodzących w skład mikrobiota zakwasów z gryki zależy od warunków prowadzenia procesu. Na przykład przy prowadzeniu zakwasu gryczanego w temperaturze 35°C, wydajności ciasta 275 i odświeżaniu co 24 godziny, po 2–5 dni fermentacji stwierdzono przede wszystkim obecność *L. plantarum*, zanikały natomiast obecne na początku fermentacji szczepy z gatunków *L. fermentum*, *L. gallinarum*, *L. crispatus*, *L. vaginalis*, *Leuconostoc holzapfelii*. Z kolei przy fermentacji w 25°C, wydajności ciasta 200 i przeszczepianiu co 12 h dominowały *P. pentosaceus* i *L. amylovorus*; wykazano także obecność *L. plantarum*, *W. cibaria*, *L. holzapfelii*, *L. sakei* [53].

##### **5. Komponowanie składu kultur starterowych z autochtonicznych gatunków LAB czy unifikacja w oparciu o gatunki najbardziej rozpowszechnione**

W piśmiennictwie przeważał w ostatnich latach pogląd, że w kulturach starterowych do zakwasów piekarskich powinny być wykorzystywane autochtoniczne szczepy bakterii fermentacji mlekowej, które są lepiej przystosowane do specyficznych warunków panujących w ekosystemie ciast i dostępnych w nich substratów. Jest to związane z coraz większym zainteresowaniem zastosowaniem nietypowych dla piekarstwa surowców, w tym mąk bezglutenowych [14]. Jakość pieczywa otrzymywanego z takich mąk może ulec znacznej poprawie przy wykorzystaniu technologii opartej na zakwasach [11, 26]. Wprowadzenie do badań bioróżnorodności zakwasów piekarskich technik umożliwiających monitorowanie dynamiki zmian składu populacji mikroorganizmów podczas prowadzenia fermentacji – jak PCR-DGGE (PCR i elektroforeza

we wzrastającym stężeniu czynnika denaturującego) pozwoliło na wykazanie zdolności bakterii i drożdży do adaptacji i opanowania środowiska, a także zdominowania mikrobiota zakwasów [44, 45, 47, 53, 54, 57, 86].

W komercyjnych kulturach starterowych najpowszechniej stosowanymi szczepami bakterii są *L. plantarum*, *L. sanfranciscensis*, *L. brevis* oraz *L. reuteri*, *L. pontis*. W aktualnych publikacjach i patentach proponowane są dla piekarstwa kultury starterowe o specyficznych właściwościach, np. zapewniające wydłużenie czasu przydatności pieczywa do spożycia dzięki zastosowaniu szczepów bakterii wykazujących zdolność do syntezy kwasu propionowego lub aktywność przeciupleśniową [9, 15, 48, 79]. W kulturach starterowych do pieczywa pszennego mogą znaleźć zastosowanie szczepy LAB syntetyzujące egzopolisacharydy, które wpływają korzystnie na właściwości reologiczne ciast i sprzyjają powstawaniu właściwej tekstury pieczywa [35, 75, 76, 93]. Dominacji określonych szczepów LAB w zakwasach sprzyja także zdolność do syntezy bakteriocyn jak w przypadku *L. reuteri*. Pomimo tej właściwości *L. reuteri* zastosowany jako składnik kultury starterowej nie utrzymuje się w zakwasach z gryki [55].

W zakwasach żytnich, po wielokrotnych przeszczepieniach, obecność szczepów bakterii, wprowadzonych z kulturą starterową, stwierdzano najczęściej w przypadku gatunków *L. sanfranciscensis*, *L. johnsonii*, *L. reuteri* a także *L. pontis*, *L. panis*, *L. frumenti*, *L. fermentum*, *L. crispatus*. Przy czym głównym czynnikiem selekcyjnym była temperatura prowadzenia zakwasów; niektóre szczepy bakterii rosły lepiej poniżej 30°C inne powyżej tej temperatury [45]. W odniesieniu do ekosystemów ciast pszennych wykazano stabilność starterów złożonych z *L. sanfranciscensis* lub *L. plantarum*, przy czym niektóre szczepy zasiedlały ekosystem zakwasów wspólnie ze szczepami autochtonicznymi gatunków *P. pentosaceus*, *L. rosiae* [47].

Konkurencja środowiskowa pomiędzy szczepami LAB wprowadzonymi z kulturą starterową a autochtoniczną biotą bakteryjną zakwasów prowadzić może do eliminacji LAB pochodzących z kultury starterowej [54, 86, 94]. Specyfikę zakwasów z różnych surowców jako zróżnicowanych nisz ekologicznych do zasiedlania przez bakterie z kultur starterowych potwierdziły badania, w których porównano skład bioty LAB w zakwasach pszennych i z udziałem mąki jęczmiennej [94]. Spośród 19 szczepów reprezentujących 10 gatunków bakterii, wchodzących w skład kultur starterowych, zastosowanych do wszystkich zakwasów, w zakwasach pszennych, po dwumiesięcznym prowadzeniu zakwasów dominowały bakterie z gatunku *L. plantarum*. Natomiast w analogicznie przygotowanych zakwasach jęczmienno-pszennych i jęczmiennych, poza *L. plantarum*, utrzymywała się większa liczba gatunków w tym *L. paralimentarius* (w mieszanym) i *L. brevis*; nieocze-



kiwanie w żadnym zakwasie nie wykryto obecności *L. sanfranciscensis*, pomimo wprowadzenia 3 szczepów tego gatunku w kulturach starterowych [94].

W przypadku gdy jako składniki kultur starterowych do fermentacji takich surowców jak: gryka, quinoa, amarantus, proso, kukurydza i ryż stosowano autochtoniczne szczepy LAB z gatunków *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. paralimentarius*, *L. pontis*, skład mikrobiota tych zakwasów pozostawał stabilny pomimo wielokrotnego przeszczepiania [86]. W ostatnio przeprowadzonych badaniach wykazano przydatność wybranych szczepów *L. plantarum* do prowadzenia zakwasów pszennych. Szczepy te dominowały lub razem z *L. sanfranciscensis* współdominowały w środowisku tych zakwasów [81]. Zapewnia to uzyskanie zakwasów (i ciast) o dobrych parametrach technologicznych. Potwierdzono jednocześnie, że szczepy autochtoniczne łatwiej uzyskują przewagę w środowisku, zatem ich pochodzenie jest istotne przy komponowaniu składu kultur [81].

Badania wskazują, że z punktu widzenia produkcji pieczywa w ciągłym systemie przemysłowym uniwersalne powinno być wykorzystywanie kultur starterowych zawierających szczepy *Lactobacillus plantarum*, ponieważ ten gatunek jest nie tylko szeroko rozpowszechniony w zakwasach, ale również wykazuje zdolność do dominacji w ekosystemie.

Większość badań dotyczących dominacji *L. plantarum* przeprowadzono jednak w ciastach pszennych. W zakwasach z mąk niechlebowych i pseudozbóż występują w większej liczbie składniki mogące wpływać na wzrost bakterii, takie jak np. związki mineralne, błonnik, polifenole. Zatem przy projektowaniu starterów do pieczywa należy uwzględnić różne gatunki i szczepy LAB w zależności od przeznaczenia kultury starterowej. Biorąc pod uwagę jakość otrzymanego pieczywa pszenne wykazano, że zastosowanie kultur starterowych zawierających szczepy *L. plantarum* lub *Leuconostoc* spp. w przemysłowym procesie produkcji pieczywa pszenne pozwala osiągnąć odpowiednie parametry technologiczne ciasta (kwasowość, pH, zawartość kwasu mlekowego i octowego) jeżeli fermentacja jest prowadzona przez około 20 godzin i każdorazowo proces jest powtarzany od początku, tj. od inokulacji mąki i wody przy użyciu startera [66]. W takim systemie produkcji nie jest konieczne uzyskanie stabilnego konsorcjum mikroorganizmów zakwasu w długim czasie, nie ma też zagrożenia, że mikroorganizmy startera zostaną zdominowane przez drobnoustroje autochtoniczne. Zapewniona jest natomiast powtarzalna jakość zakwasu i ciasta. Mimo wielokrotnego potwierdzenia, że zastosowanie *L. plantarum* wpływa pozytywnie na cechy zakwasów i otrzymanego pieczywa, stosowanie jednoskładnikowej kultury starterowej może jednak prowadzić do zubożenia cech smakowo-zapa-

chowych pieczywa i jego ujednolicenia [33]. Zakwasy otrzymywane przy użyciu kilku gatunków i szczepów LAB różnią się nie tylko pod względem zawartości kwasów organicznych lecz także związków tworzących aromat czy też egzopolisacharydów istotnych w kształtowaniu tekstury pieczywa. Skład kultur starterowych można zatem dobrać, uwzględniając np. różnorodność szczepów gatunków *Weissella* spp., *Pediococcus* spp. i innych [1] uzyskując unikalne, charakterystyczne dla wyrobu i piekarni cechy sensoryczne pieczywa.

## 6. Podsumowanie

W przemysłowej produkcji pieczywa kultury starterowe są powszechnie stosowane w celu uzyskiwania pieczywa dobrej jakości. Wprowadzanie zróżnicowanych kultur starterowych jest w zgodzie z aktualnym trendem konsumenckim polegającym na powrocie do tradycyjnych metod produkcji żywności, gdyż zastępuje lub ogranicza używanie technologicznych dodatków piekarskich (np. polepszacze, enzymy, kwasy). Różnorodność bakterii fermentacji mlekowej, zasiedlających specyficzne nisze ekologiczne zakwasów, sięga około 60 gatunków przy czym szczególnie rozpowszechnione są heterofermentatywne LAB z rodzaju *Lactobacillus*. Do kultur starterowych dla piekarstwa selekcjonowane są szczepy bakterii charakteryzujące się zdolnością do szybkiego zakwaszania środowiska ciasta, syntezy związków kształtujących aromat pieczywa, wpływających pozytywnie na właściwości reologiczne ciast i teksturę pieczywa, a także jednoczesną zdolnością do szybkiego opanowywania i zasiedlania środowiska zakwasów. Różnicowanie składu kultur starterowych jest również jednym ze sposobów przeciwdziałania ujednoliceniu smaku pieczywa [64]. Obecnie, poszukuje się również szczepów syntetyzujących związki o charakterze antypleśniowym co pozwala na wydłużenie trwałości pieczywa [41, 42]. Wzrastająca popularność pieczywa z udziałem mąk innych niż tradycyjnie stosowane pszenne i żytnia (tzw. mąki niechlebowe i z pseudozbóż) wymaga dostosowania technologii oraz składu kultur starterowych do tych surowców. W takich kulturach starterowych najlepiej sprawdzają się szczepy bakterii wywodzące się z ekosystemów tych środowisk.

## Piśmiennictwo

1. Alfonzo A., Ventimiglia G., Corona O., Di Gerlando R., Gaglio R., Francesca N., Settanni L.: Diversity and technological potential of lactic acid bacteria of wheat flours. *Food Microbiol.* **36**, 343–354 (2013)
2. De Angelis M., Di Cagno R., Gallo G., Curci M., Siragusa S., Crecchio C., Parente E., Gobbetti M.: Molecular and functional characterization of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains isolated from sourdoughs. *Int. J. Food Microbiol.* **114**, 69–82 (2007)

3. Brandt M.J., Hammes W.P., Gänzle M.G.: Effects of process parameters on growth and metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida humilis* during rye sourdough fermentation. *Eur. Food Res. Technol.* **218**, 333–338 (2004)
4. Chabłowska B., Piasecka-Jóźwiak K., Szkudzińska-Rzeszowski E., Kliszcz M., Rozmierska J., Stecka K.: Charakterystyka mikroflory naturalnie fermentujących zakwasów piekarskich pochodzących z różnych regionów polskich. *Pr. Inst. Lab. Bad. Przem. Spoż.* **62**, 31–40 (2007)
5. Coda R., Di Cagno R., Gobbetti M., Rizzello C. G.: Sourdough lactic acid bacteria: exploration of non-wheat cereal-based fermentation. *Food Microbiol. Lett.* **37**, 51–58 (2014)
6. Corsetti A., De Angelis M., Dellaglio F., Paparella A., Fox P.F., Settanni L., Gobbetti M.: Characterization of sourdough lactic acid bacteria based on genotypic and cell-wall protein analyses. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 641–654 (2003)
7. Corsetti A., Lavermicocca P., Morea M., Baruzzi F., Tosti N., Gobbetti M.: Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of southern Italy. *Int. J. Food Microbiol.* **64**, 95–104 (2001)
8. Corsetti A., Settanni L.: Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Res. Int.* **40**, 539–558 (2007)
9. Dal Bello E., Clarke C.I., Ryan L.A.M., Ulmer H., Schober T.J., Strom K., Sjorgren J., Van Sinderen D., Schnurer J. and Arendt E.K.: Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. *J. Cereal Sci.* **45**, 309–318 (2007)
10. Decock P., Capelle S.: Bread technology and sourdough technology. *Trends Food Sci. Tech.* **16**, 113–120 (2005)
11. Di Cagno R., De Angelis M., Corsetti A., Lavermicocca P., Arnault P., Tossut P., Gobbetti M.: Interactions between sourdough lactic acid bacteria and exogenous enzymes: effects on the microbial kinetics of acidification and dough textural properties. *Food Microbiol.* **20**, 67–75 (2003)
12. Di Cagno R., De Angelis M., Lavermicocca P., De Vincenzi M., Giovannini C., Faccia M., Gobbetti M.: Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 623–633 (2002)
13. Di Cagno R., De Angelis M., Gallo G., Settanni L., Berloco M.G., Siragusa S., Gobbetti M.: Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus rossiae* strains isolated from sourdough. *J. Appl. Microbiol.* **103**, 821–835 (2007)
14. Di Cagno R., Rizzello C.G., De Angelis M., Cassone A., Giuliani G., Benedusi A., Gobbetti M.: Use of selected sourdough strains of *Lactobacillus* for removing gluten and enhancing the nutritional properties of gluten-free bread. *J. Food Protect.* **71**, 1491–1495 (2008)
15. Garofalo C., Zannini E., Aquilanti L., Silvestri G., Fierro O., Picariello G., Clementi F.: Selection of sourdough lactobacilli with antifungal activity for use as biopreservatives in bakery products. *J. Agr. Food Chem.* **60**, 7719–7728 (2012)
16. Gatto V., Torriani S.: Microbial population changes during sourdough fermentation monitored by DGGE analysis of 16S and 26S rRNA gene fragments. *Ann. Microbiol.* **54**, 31–42 (2004)
17. Gänzle M.G.: From gene to function: metabolic traits of starter cultures for improved quality of cereal foods. *Int. J. Food Microbiol.* **134**, 29–36. (2009)
18. Gänzle M.G.: Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Curr. Opin. Food Sci.* **2**, 106–117. (2015)
19. Gänzle M.G., Loponen J., Gobbetti M.: Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. *Trends Food Sci. Tech.* **19**, 513–521 (2008)
20. Gänzle M.G., Vermeulen N., Vogel R.F.: Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiol.* **24**, 128–138 (2007)
21. Gobbetti M., De Angelis M., Corsetti A., Di Cagno R.: Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends Food Sci. Tech.* **16**, 57–69 (2005)
22. Gobbetti M., Corsetti A.: *Lactobacillus sanfrancisco* a key sourdough lactic acid bacterium: a review. *Food Microbiol.* **14**, 175–187 (1997)
23. Gobbetti M., Corsetti A., Rossi, J. La Rosa F., De Vincenzi S.: Identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat sourdoughs of central Italy. *Ital. J. Food Sci.* **6**, 85–94 (1994)
24. Gullo M., Romano A.D., Pulvirenti A., Giudici P.: *Candida humilis*-dominant species in sourdoughs for the production of durum wheat bran flour bread. *Int. J. Food Microbiol.* **80**, 55–59 (2003).
25. Gül H., Özçelik S., Sağdıç O., Certel M.: Sourdough bread production with lactobacilli and *S. cerevisiae* isolated from sourdoughs. *Process Biochem.* **40**, 691–697 (2005)
26. Hammes W.P., Brandt M.J., Francis K.L., Rosenheim J., Seitter M.F., Vogelmann S.A.: Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends Food Sci. Tech.* **16**, 4–11 (2005)
27. Hammes W.P., Gänzle M.G.: Sourdough breads and related products (w) Microbiology of fermented foods. Springer, US, 1997, s. 199–216
28. Hansen Å., Hansen B.: Flavour of sourdough wheat bread crumb. *Z. Lebensm. Unters. F.A.*, **202**, 244–249 (1996)
29. Hansen A., Schieberle P.: Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects. *Trends Food Sci. Tech.* **16**, 85–94 (2005)
30. Huys G., Daniel H.M., De Vuyst L.: Taxonomy and biodiversity of sourdough yeasts and lactic acid bacteria (w) Handbook on Sourdough Biotechnology, red. Gobetti M., Gänzle M., Springer US, 2013, s. 105–154
31. Iacumin L., Cecchini F., Manzano M., Osualdini M., Boscolo D., Orlic S., Comi G.: Description of the microflora of sourdoughs by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiol.* **26**, 128–135 (2009)
32. Infantes M., Tourneur C.: Etude de la flore lactique de levains naturels de panification provenant de différentes régions françaises. *Sci. Alim.* **11**, 527–545 (1991)
33. Katina K., Heiniö R.L., Autio K., Poutanen K.: Optimization of sourdough process for improved sensory profile and texture of wheat bread. *LWT-Food Sci. Technol.* **39**, 1189–1202 (2006).
34. Kazanskaya L., Afanasyeva O., Patt V.: Microflora of rye sours and some specific features of its accumulation in bread baking plants of the USSR (w) Developments in food science, Progress in cereal chemistry and technology, 5B, red. Holas J., Kratochvil F. Elsevier, London, 1983, s. 759–763
35. Ketabi A., Soleimani-Zad S., Kadivar M., Sheikh-Zeinodin M.: Production of microbial exopolysaccharides in the sourdough and its effects on the rheological properties of dough. *Food Res. Int.* **41**, 948–951 (2008)
36. Kitahara M., Sakata S., Benno Y.: Biodiversity of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains isolated from five sourdoughs. *Let. Appl. Microbiol.* **40**, 353–357 (2006)
37. Kleerebezem M., Boekhorst J., van Kranenburg R., Molenaar D., Kuipers O.P., Leer R., Siezen R.J.: Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 1990–1995 (2003)
38. Kline L., Sugihara T.F.: Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process II. Isolation and characterization of undescribed bacterial species responsible for the souring activity. *Appl. Microbiol.* **21**, 459–465 (1971)

39. Korakli M., Vogel R.F.: Purification and characterisation of manitol dehydrogenase from *Lactobacillus sanfranciscensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **220**, 281–286 (2003)
40. Lattanzi A., Minervini F., Di Cagno R., Diviccaro A., Antonielli L., Cardinali G., Gobbetti M.: The lactic acid bacteria and yeast microbiota of eighteen sourdoughs used for the manufacture of traditional Italian sweet leavened baked goods. *Int. J. Food Microbiol.* **163**, 71–79 (2013)
41. Lavermicocca P., Valerio F., Evidente A., Lazzaroni S., Corsetti A., Gobbetti M.: Purification and characterization of novel antifungal compounds by sourdough *Lactobacillus plantarum* 21B. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4084–4090 (2000)
42. Magnusson J., Ström K., Roos S., Sjögren J., Schnürer J.: Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **219**, 129–135 (2003)
43. Marklinder I., Johansson L.: Sour dough fermentation of barley flours with varied content of mixed-linked (1→3), (1→4) β-d-glucans. *Food Microbiol.* **12**, 363–371 (1995)
44. Meroth C.B., Hammes W.P., Hertel C.: Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 7453–7461 (2003a)
45. Meroth C.B., Walter J., Hertel C., Brandt M.J., Hammes W.P.: Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 475–482 (2003b)
46. Minervini F., De Angelis M., Di Cagno R., Gobbetti M.: Ecological parameters influencing microbial diversity and stability of traditional sourdough. *Int. J. Food Microbiol.* **171**, 136–146 (2014)
47. Minervini F., De Angelis M., Di Cagno R., Pinto D., Siragusa S., Rizzello C.G., Gobbetti M.: Robustness of *Lactobacillus plantarum* starters during daily propagation of wheat flour sourdough type I. *Food Microbiol.* **27**, 897–908 (2010a)
48. Minervini F., De Angelis M., Surico R.F., Di Cagno R., Gänzle M., Gobbetti M.: Highly efficient synthesis of exopolysaccharides by *Lactobacillus curvatus* DPPMA10 during growth in hydrolyzed wheat flour agar. *Int. J. Food Microbiol.* **141**, 130–135 (2010b)
49. Minervini F., Di Cagno R., Lattanzi A., De Angelis M., Antonielli L., Cardinali G., Gobbetti M.: Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of 19 sourdoughs used for traditional/typical Italian breads: interactions between ingredients and microbial species diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 1251–1264 (2012a)
50. Minervini F., Lattanzi A., De Angelis M., Di Cagno R., Gobbetti M.: Influence of artisan bakery-or laboratory-propagated sourdoughs on the diversity of lactic acid bacterium and yeast microbiotas. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 5328–5340 (2012b)
51. Molenaar D., Bringel F., Schuren F.H., De Vos W.M., Siezen R.J., Kleerebezem M.: Exploring *Lactobacillus plantarum* genome diversity by using microarrays. *J. Bacteriol.* **187**, 6119–6127 (2005)
52. Montanari C., Bargossi E., Lanciotti R., Chinnici F., Gardini F., Tabanelli G.: Effects of two different sourdoughs on the characteristics of Pandoro, a typical Italian sweet leavened baked good. *LWT-Food Sci. Technol.* **59**, 289–299 (2014)
53. Moroni A.V., Arendt E.K., Dal Bello F.: Biodiversity of lactic acid bacteria and yeasts in spontaneously-fermented buckwheat and teff sourdoughs. *Food Microbiol.* **28**, 497–502 (2011)
54. Moroni A.V., Arendt E.K., Morrissey J.P., Dal Bello F.: Development of buckwheat and teff sourdoughs with the use of commercial starters. *Int. J. Food Microbiol.* **142**, 142–148 (2010)
55. Müller M.R.A., Wolfrum G., Stolz P., Ehrmann M.A., Vogel R.F.: Monitoring the growth of *Lactobacillus* species during a rye flour fermentation. *Food Microbiol.* **18**, 217–227 (2001)
56. Oura E., Soumalainen H., Viskari R.: Breadmaking (w) Economic Microbiology. Vol. 7. Red. Rose A.H., Academic Press, New York, 1982, s. 87–146
57. Paramithiotis S., Chouliaras Y., Tsakalidou E., Kalantzopoulos G.: Application of selected starter cultures for the production of wheat sourdough bread using a traditional three-stage procedure. *Process Biochem.* **40**, 2813–2819 (2005)
58. Paramithiotis S., Tsiasiotou S., Drosinos E.: Comparative study of spontaneously fermented sourdoughs originating from two regions of Greece: Peloponnesus and Thessaly. *Eur. Food Res. Technol.* **231**, 883–8 (2010)
59. Paramithiotis S., Gioulatos S., Tsakalidou E., Kalantzopoulos G.: Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria in sourdough. *Process Biochem.* **41**, 2429–2433 (2006)
60. Paramithiotis S., Sofou A., Tsakalidou E., Kalantzopoulos G.: Flour carbohydrate catabolism and metabolite production by sourdough lactic acid bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 1417–1423 (2007).
61. Plessas S., Pherson L., Bekatorou A., Nigam P., Koutinas A.A.: Bread making using kefir grains as baker's yeast. *Food Chem.* **93**, 585–589 (2005)
62. Plessas S., Alexopoulos A., Mantzourani I., Koutinas A., Voidarou C., Stavropoulou E., Bezirtzoglou E.: Application of novel starter cultures for sourdough bread production. *Anaerobe*, **17**, 486–489 (2011)
63. Pulvirenti A., Solieri L., Gullo M., De Vero L., Giudici P.: Occurrence and dominance of yeast species in sourdough. *Let. Appl. Microbiol.* **38**, 113–117 (2004)
64. Ravyts F., De Vuyst L.: Prevalence and impact of single-strain starter cultures of lactic acid bacteria on metabolite formation in sourdough. *Food Microbiol.* **28**, 1129–1139 (2011)
65. Reale A., Di Renzo T., Succi M., Tremonte P., Coppola R., Sorrentino E.: Identification of lactobacilli isolated in traditional ripe wheat sourdoughs by using molecular methods. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 237–244 (2011)
66. Robert H., Gabriel V., Lefebvre D., Rabier P., Vayssier Y., Fontagné-Faucher C.: Study of the behaviour of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc* starters during a complete wheat sourdough breadmaking process. *LWT-Food Sci. Technol.* **39**, 256–265 (2006)
67. Rosenquist H., Hansen Å.: The microbial stability of two bakery sourdoughs made from conventionally and organically grown rye. *Food Microbiol.* **17**, 241–250 (2000)
68. Salim-ur-Rehman, Paterson A., Piggott J.R.: Flavour in sourdough breads: a review. *Trends Food Sci. Tech.* **17**, 557–566 (2006)
69. Settanni L., Valmorri S., van Sinderen D., Suzzi G., Paparella A., Corsetti A.: Combination of multiplex PCR and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis for monitoring common sourdough-associated *Lactobacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 3793–3796 (2006)
70. Siragusa S., Di Cagno R., Ercolini D., Minervini F., Gobbetti M., De Angelis M.: Taxonomic structure and monitoring of the dominant population of lactic acid bacteria during wheat flour sourdough type I propagation using *Lactobacillus sanfranciscensis* starters. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 1099–1109 (2009)
71. Salovaara H., Katunpää H.: An approach to the classification of lactobacilli isolated from Finnish sour rye dough ferments. *Acta Aliment. Pol.* **10**, 231–239 (1984)
72. Spicher G.: Die Mikroflora des Sauerteiges. I. Mitteilung: Untersuchungen über die Art der in Sauerteigen anzutreffenden stäbchenförmigen Milchsäurebakterien (Genus *Lactobacillus* Beijerinck). *Zeitblatt für Bakteriologie II Abt.* **113**, 80–106 (1959)
73. Spicher G.: Weitere Untersuchungen über die Zusammensetzung und die Variabilität der Mikroflora handelsüblicher Sauerteig-Starter. *Z. Lebensm. Unters. F.A.* **178**, 106–109 (1984)

74. Spicher G., Lönner C.: Die Mikroflora des Sauerteiges. XXI. Mitteilung: Die in Sauerteigen schwedischer Bäckereien vorkommenden Lactobacillen. *Z. Lebensm. Unters. F.A.* **181**, 9–13 (1985)
75. Tiekling M., Gänzle M. G.: Exopolysaccharides from cereal-associated lactobacilli. *Trends Food Sci. Tech.* **16**, 79–84 (2005)
76. Tingirikari J. M. R., Kothari D., Shukla R., Goyal A.P.: Structural and biocompatibility properties of dextran from *Weissella cibaria* JAG8 as food additive. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **65**, 686–691 (2014)
77. Torriani S., Felis G.E., Dellaglio F.: Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3450–3454 (2001)
78. Valcheva R., Korakli M., Onno B., Prévost H., Ivanova I., Ehrmann M.A., Vogel R.F.: *Lactobacillus hammesii* sp. nov., isolated from French sourdough. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 763–767 (2005)
79. Valerio F., Favilla M., De Bellis P., Sisto A., de Candida S., Lavermicocca P.: Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger* and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products. *Syst. Appl. Microbiol.* **32**, 438–448 (2009)
80. Valmorri S., Settanni L., Suzzi, G., Gardini F., Vernocchi P., Corsetti A.: Application of a novel polyphasic approach to study the lactobacilli composition of sourdoughs from the Abruzzo region (central Italy). *Lett. Appl. Microbiol.* **43**, 343–349 (2006)
81. Ventimiglia G., Alfonzo A., Galluzzo P., Corona O., Francesca N., Caracappa S., Settanni L.: Codominance of *Lactobacillus plantarum* and obligate heterofermentative lactic acid bacteria during sourdough fermentation. *Food Microbiol.* **51**, 57–68 (2015)
82. Vogel R. F., Böcker G., Stolz P., Ehrmann M., Fanta D., Ludwig W., Hammes W. P.: Identification of lactobacilli from sourdough and description of *Lactobacillus pontis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 223–229 (1994)
83. Vogel R.F., Ehrmann M.A., Ganzle M.G.: Development and potential of starter lactobacilli resulting from exploration of the sourdough ecosystem. *An tonie Van Leeuwenhoek*, **81**, 631–638 (2002)
84. Vogel R.F., Pavlovic M., Ehrmann M.A., Wiezer A., Liesegang H., Offschanka S., Voget S., Angelov A., Bocker G., Liebl W.: Genomic analysis reveals *Lactobacillus sanfranciscensis* as stable element in traditional sourdoughs. *Microb. Cell. Fact.* **10**, Suppl. 1, S6 (2011)
85. Vogelmann S.A., Hertel C.: Impact of ecological factors on the stability of microbial associations in sourdough fermentation. *Food Microbiol.* **28**, 583–589 (2011)
86. Vogelmann S.A., Seitter M., Singer U., Brandt M.J., Hertel C.: Adaptability of lactic acid bacteria and yeasts to sourdoughs prepared from cereals, pseudocereals and cassava and use of competitive strains as starters. *Int. J. Food Microbiol.* **130**, 205–212 (2009)
87. De Vuyst L., Neysens P.: The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends Food Sci. Tech.* **16**, 43–56 (2005)
88. De Vuyst L., Vancanneyt M.: Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* **24**, 120–127 (2007)
89. De Vuyst L., Van Kerrebroeck S., Harth H., Huys G., Daniel H.M., Weckx S.: Microbial ecology of sourdough fermentations: diverse or uniform? *Food Microbiol.* **37**, 11–29 (2014)
90. De Vuyst L., Vrancken G., Ravyts F., Rimaux T., Weckx S.: Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. *Food Microbiol.* **26**, 666–675 (2009)
91. De Vuyst L., Schrijvers V., Paramithiotis S., Hoste B., Vancanneyt M., Swings J., Messens W.: The biodiversity of lactic acid bacteria in Greek traditional wheat sourdoughs is reflected in both composition and metabolite formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 6059–6069 (2002)
92. Wick M., Stolz P., Böcker G., Lebeault J.M.: Influence of several process parameters on sourdough fermentation. *Acta Biotechnol.* **23**, 51–61 (2003)
93. Wolter A., Hager A.S., Zannini E., Czerny M., Arendt E.K.: Influence of dextran-producing *Weissella cibaria* on baking properties and sensory profile of gluten-free and wheat breads. *Int. J. Food Microbiol.* **172**, 83–91 (2014)
94. Zannini E., Garofalo C., Aquilanti L., Santarelli S., Silvestri G., Clementi F.: Microbiological and technological characterization of sourdoughs destined for bread-making with barley flour. *Food Microbiol.* **26**, 744–753 (2009)
95. Zapparoli G., De Benedictis P., Salardi C., Veneri G., Torriani S., Dellaglio F.: *Lactobacilli* of sourdoughs from Verona bakery: a preliminary investigation. *Adv. Food Sci.* **18**, 163–166 (1996)
96. Zapparoli G., Torriani S., Dellaglio F.: Differentiation of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains by randomly amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.* **166**, 325–332 (1998)
97. Zotta T., Piraino P., Ricciardi A., McSweeney P.L., Parente E.: Proteolysis in model sourdough fermentations. *J. Agr. Food Chem.* **54**, 2567–2574 (2006)

Magdalena Malinowska<sup>1</sup>, Beata Tokarz-Deptuła<sup>1\*</sup>, Wiesław Deptuła<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Immunologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński

<sup>2</sup>Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński

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

1. Wprowadzenie. 2. Charakterystyka mikrobiomu dróg oddechowych w warunkach fizjologicznych. 3. Mikrobiom dróg oddechowych w warunkach patologicznych. 4. Podsumowanie

### The respiratory tract microbiota in physiological and pathological conditions

**Abstract:** The human body is inhabited by millions of microorganisms, residing on and in the skin, in the gastrointestinal tract, on the mucous membranes of the upper respiratory tract and in the vagina. Lower respiratory tract has considered to be free of bacteria, but the current research on microorganisms, using 16S rRNA gene sequencing, led to the identification of the microbiome of this unique environment. It has been demonstrated that the bacterial flora of the lower respiratory tract is significantly different from that of the upper respiratory tract. Moreover, a difference in the microbiome of the lower respiratory tract of healthy individuals and patients suffering from chronic diseases such as asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD), has been shown.

1. Introduction. 2. Characteristics of the respiratory tracts microbiota in physiological conditions. 3. Respiratory tract microbiota in pathological conditions. 4. Summary

**Słowa kluczowe:** mikrobiom, układ oddechowy

**Key words:** microbiome, respiratory system

## 1. Wprowadzenie

Ludzkie ciało jest siedliskiem milionów symbiotycznych mikroorganizmów obejmujących m.in. powłoki skórne, przewód pokarmowy oraz część zewnętrzną, skórę i błony śluzowe układu moczowo-płciowego [20]. Ten „ludzki mikrobiom” odpowiada za około 1–3% masy ciała człowieka, a całkowita liczba drobnoustrojów znajdujących się w ludzkim organizmie jest ponad dziesięciokrotnie wyższa niż liczba komórek somatycznych [43]. Podobnie jak ciało człowieka, tak i zasiedlające je drobnoustroje to niezwykle złożony ekosystem, który warunkuje homeostazę makroorganizmu i jego zdrowie, jako że wpływa m.in. na stan immunologiczny organizmu [19, 37]. W 2007 roku amerykański National Institute of Health, rozpoczął program Human Microbiome Project (HMP), który zakładał określenie ludzkiej mikroflory oraz jej roli tak w zdrowym organizmie jak i w trakcie choroby. Projekt ten miał za zadanie scharakteryzować mikrobiom człowieka na poziomie sekwencji nukleotydowej całego genomowego DNA mikroorganizmów człowieka, sekwencji nukleotydowej mitochondrialnego RNA oraz zsyntetyzowanych białek bakteryjnych i produktów metabolizmu drobnoustrojów, pochodzących ze skóry, jamy ustnej i przewodu pokarmowego oraz układu moczowo-płcio-

wego. Zakładał on zbadanie i analizę różnic w ludzkiej mikroflorze, w tym różnic w zależności od populacji ludzi i ich genotypu, wieku, sposobu odżywiania, jak też środowiska życia i czynników socjalnych oraz ich stanu zdrowia [2, 25, 43].

W 2011 roku badania z tego zakresu poszerzono nowym projektem prowadzonym przez Narodowy Instytut Serca, Płuc i Krwi (NHLBI), który ma na celu określenie mikrobiomu układu oddechowego nie tylko u osób zdrowych, ale także zakażonych wirusem HIV (Lung HIV Microbiome Project) [28]. Dotychczas ze względu na brak skutecznych technik hodowli mikroorganizmów, które pozwoliłyby na odtworzenie ich siedliska, w tym izolację bakterii z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych uważano, że drogi oddechowe, głównie dolne (płuca) są jałowe [31]. Obecnie mikrobiom płuc analizowany jest najczęściej wysokowydajnym sekwencjonowaniem małego i wysoce konserwatywnego locus w bakteryjnym DNA – genu 16S rRNA zawierającego regiony hiperzmienne, które mogą stanowić „podpis” gatunkowo specyficznych sekwencji użytecznych do identyfikacji bakterii. Dzięki tym metodom wykazano, że dolne drogi oddechowe (płuca) zasiedlane są drobnoustrojami, które są odmienne od mikroflory górnych dróg oddechowych. Wykazano także, że flora bakteryjna płuc zdrowych ludzi znacznie

\* Autor korespondencyjny: Katedra Immunologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński, ul. Felczaka 3c, 71-412 Szczecin; tel. (91) 444 16 05; e-mail: kurp13@univ.szczecin.pl

różni się od flory bakteryjnej płuc osób z chorobami takimi jak chociażby astma czy przewlekła obturacyjna choroba płuc (PoChP) [13, 23].

## 2. Charakterystyka mikrobiomu dróg oddechowych w warunkach fizjologicznych

Chcąc przybliżyć mikrobiom dróg oddechowych, w tym dolnych dróg oddechowych konieczne jest wskazanie na czynniki, które wpływają i warunkują skład mikroorganizmów w tym układzie. Otóż wiadomo, że wzrost drobnoustrojów zależy od warunków odżywczych, temperaturowych oraz gazowych, w tym stężenia tlenu, stąd w badaniach dotyczących mikrobiomu dróg oddechowych ważne są m.in. warunki ludzkiego oddechu – zarówno w zdrowiu jak i w chorobie oraz dynamika migracji drobnoustrojów oraz ich eliminacja [11]. Wiadomo, że drogi oddechowe wraz z pęcherzykami płucnymi są stale narażone poprzez wymianę powietrza na działanie środowiska, gdyż każdej doby obszar ten wystawiony jest na ekspozycję ponad 8000 litrów wdychanego powietrza, w którym mikroorganizmy mogą występować w liczbie  $10^4$ – $10^6$  komórek bakteryjnych na  $1\text{ m}^3$ . Także ich występowanie i liczba w drogach oddechowych związana jest z mikroaspiracjami oraz z bezpośrednio występującymi zawiesinami, które występują wzdłuż powierzchni śluzówki tego układu [34]. Natomiast ich usuwanie z tych dróg następuje wskutek oczyszczania śluzowo-rzęskowego, kaszlu oraz w wyniku przeciwbakteryjnego mechanizmu odporności wrodzonej i nabytej [11]. Środowisko określające regionalne warunki wzrostu drobnoustrojów w płucach, dotyczy zarówno wspomnianych powyżej wspólnych cech dla wszystkich nisz ekologicznych tj. warunków odżywczych, temperaturowych, gazowych, ale także liczby i aktywacji stanu komórek odpornościowych gospodarza. W zdrowiu tj. w prawidłowych warunkach fizjologicznych czynniki te są na ogół niesprzyjające dla rozwoju bakterii, wpływając na stosunkowo ich niewielkie namnażanie, co pozwala na stwierdzenie, że głównym elementem, który kształtuje mikrobiom płuc w zdrowiu jest bilans migracji mikroorganizmów. Natomiast w trakcie choroby, warunki te zmieniają się na niekorzystne i to one głównie stwarzają dobre środowisko do namnażania się bakterii [10]. Dodatkowo płuca, podobnie jak i jelita, są organami pokrytymi błoną śluzową, jednakże ich cechy jak i ich budowa anatomiczna są na tyle odmienne, że to one właśnie powodują różnice w składzie populacji flory bakteryjnej [10]. Ponadto w przewodzie pokarmowym, w przeciwieństwie do dróg oddechowych, migracja bakterii jest jednokierunkowa – od jamy ustnej do jelita prostego (z wyjątkiem odruchu wymiotnego), na drodze której występują liczne bariery fizyczne i chemiczne. Aby wprowadzony doust-

nie mikroorganizm mógł znaleźć się w jelicie prostym, musi pokonać niskie pH znajdujące się w żołądku oraz wysokie pH dwunastnicy, a dodatkowo konkurować z innymi drobnoustrojami znajdującymi się w przewodzie pokarmowym. Z kolei przepływ powietrza i śluzu, a więc i mikroorganizmów w drogach oddechowych, w tym w dolnych drogach oddechowych – płucach jest dwukierunkowy, bez potrzeby pokonywania wspomnianych barier fizycznych, chemicznych czy biologicznych. Zatem mikrobiom dróg oddechowych z tego powodu jest bardziej dynamiczny, przejściowy, jako że zmienia się w czasie, ponieważ wynika to z ruchu powietrza w tym narządzie. Wyłączając tchawicę i oskrzela, które podobnie jak jelita zawierają glikolizowane białka wydzielane przez śluz, powierzchnia płuc zawiera tylko bogaty w lipidy surfaktant, który działa bakteriostatycznie przeciwko wybranym gatunkom bakterii np. niektórym szczepom *Escherichia coli*, oraz innym bakteriom Gram-ujemnych [46]. Zatem także ze względu i na te warunki, rejestruje się duże różnice w populacjach flory bakteryjnej tych narządów. Jak dotychczas w jamie ustnej zidentyfikowano około 247 filotypów (jednostka taksonomiczna różnej rangi, uwzględniająca szczepy, gatunki, rodzaje), zaliczanych do 9 typów bakterii, z tym, że w ślinie stwierdzono także obecność bakterii charakterystycznych dla mikrobiomu skóry np.: bakterie z rodzin *Staphylococcaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Burkholderiaceae* oraz *Neisseriaceae* i *Fusobacteriaceae* [20]. Z kolei na zębach, a w szczególności w cienkiej warstwy glikoprotein śliny, która je pokrywa występują bakterie Gram-dodatnie np. *Actinomyces* spp., *Streptococcus* (*S.*) *sanguinis*, *S. mutant* czy *S. oralis* [20]. Natomiast wśród flory drobnoustrojów dróg oddechowych najbardziej rozpowszechnione są bakterie z gromad: *Bacteroidetes* oraz *Firmicutes*, choć również w mniejszym stopniu występują *Proteobacteria* i *Actinobacteria* [31]. W drogach tych zarejestrowano obecność takich bakterii jak: *Prevotella* spp. (*Bacteroidetes*), *Porphyromonas* spp. (*Bacteroidetes*), *Streptococcus* spp. (*Firmicutes*), *Veillonella* spp. (*Firmicutes*), *Pseudomonas* spp. (*Proteobacteria*), *Haemophilus* spp. (*Proteobacteria*), *Neisseria* spp. (*Proteobacteria*). Przyjmuje się także, że skład mikroflory bakteryjnej tego układu jest różny w zależności od regionu dróg oddechowych, co jest wynikiem różnych siedlisk w różnych obszarach dróg oddechowych [31]. Przegroda nosowa, jako początek układu oddechowego, wyścielona jest nabłonkiem wielorzędownym migawkowym i wraz z licznymi komórkami śluzowymi stanowi kluczowe miejsce dla zakażeń bakteryjnych i wirusowych. Rasmussen i wsp. wykazali, że typowymi bakteriami dla tego obszaru są: *Corynebacterium* spp., *Aureobacterium* spp., *Rhodococcus* spp., a także: *Staphylococcus* (*S.*) *epidermidis*, *S. capitis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis* oraz *S. warneri* [40]. Stwierdzono także, że gatunki *Haemophilus influ-*

*enzae* i *Streptococcus pneumoniae*, dzięki obecności specyficznego enzymu – proteazy IgA1, mogą dominować w określonych obszarach błony śluzowej przegrody nosowej [40]. Z kolei inne badania stwierdzają, że mikroflora jamy nosowej jest zdominowana przez *Actinobacteria*, tj.: *Propionibacterium* spp. i *Corynebacterium* spp. oraz przez bakterie z gromady *Firmicutes*, w tym *S. aureus* i *S. epidermidis* [16, 41]. Oprócz jamy nosowej drobnoustroje występują także w zatokach przynosowych, jako że w ich obrębie istnieją dobre warunki dla rozwoju mikroorganizmów. W kontekście występowania tam komensali bakteryjnych należy stwierdzić, że zatoki, a w zasadzie ich błona śluzowa istotnie kształtuje homeostazę organizmu oraz wpływa na występowanie chorób [17]. Wykazano, że przy przewlekłym zapaleniu zatok przynosowych (chronic rhinosinusitis – CRS) u ludzi obniżone jest zróżnicowanie bakteryjne w porównaniu do grupy kontrolnej oraz to, że u pacjentów z CRS obniża się liczba bakterii kwasu mlekowego, a wzrasta liczba *Corynebacterium tuberculoostrealiticum*. Natomiast badając mikrobiom płuc u 14 pacjentów (w tym zdrowych palaczy) pobierając od nich próbki BAL (popłuczyny pęcherzykowo-oskrzelowe, bronchoalveolar lavage) wykazano obecność następujących drobnoustrojów w płucach: *Pseudomonas* spp., *Streptococcus* spp., *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp., *Haemophilus* spp., *Veilonella* spp. oraz *Porphyromonas* spp. [1, 13]. Obserwacje te wykazały także duże zróżnicowanie mikroflory w zależności od mikrośrodowiska poszczególnych obszarów płuc. Wykazano, że bakterie z rodzaju *Haemophilus* dominowały w lewym górnym płacie płuca, a z kolei minimalna liczba komórek bakteryjnych tego gatunku była w innym mikroanatomicznym obszarze innego płata płuc [13]. Wykazano, że mikrobiom układu oddechowego oprócz bakterii, reprezentowany jest także przez grzyby, które znajdują się w różnych miejscach organizmu człowieka (jelita, drogi rodne), w tym w płucach ponad 75 rodzajów [31]. Dowiedziono, że grzyby zasiedlające drogi oddechowe człowieka to głównie rodzaje *Aspergillus*, *Candida*, *Cladosporium*, *Malassesia*, *Saccharomyces*, a ich skład i liczba gatunkowa uzależniona jest w głównej mierze od miejsca w drogach oddechowych, które są kolonizowane [5,31]. Badania Charlsona i wsp. wykazały, że u osób zdrowych najczęściej obecne były grzyby z rodzajów: *Davidiellaceae*, *Cladosporium*, *Eurotium* i *Penicillium* [4, 36]. Podobnie van Woerdena stwierdził, że najbardziej rozpowszechnionymi gatunkami były *Cladosporium cladosporium* i *Eremothecium sinicaudum*, które zwykle izolowane są z wody i roślin [36, 45]. Tworzące przetrwalniki formy nitkowate grzybów rodzajów *Aspergillus* i *Scedosporium* są także powszechne w środowisku, stąd ich spory są regularnie wdychane i usuwane, bez wywoływania zmian chorobowych u osób z prawidłową odpornością [44].

Wirusy jako składniki mikrobiomu układu oddechowego stanowią najmniej scharakteryzowany element, chociaż ich wpływ na ludzkie zdrowie i homeostazę jest duży. Jak do tej pory w tym ekosystemie stwierdzono obecność wirusów ssaczy i bakteryjnych (bakteriofagów) i wykazano, że ich skład zmienia się zasadniczo w zależności od regionu układu oddechowego [31, 47]. Wykazano, że występujące wirusy w przewodzie oddechowych, podobnie jak bakterie i grzyby stanowią barierę odpornościową w tym układzie, jako że związane są z licznymi komórkami biorącymi udział w odporności, począwszy od komórek nabłonkowych, makrofagów uwalniających peptydy antybakteryjne, jak również subpopulacji limfocytów T i komórek B, syntetyzujących cytokiny i przeciwciała. Wzajemne oddziaływania pomiędzy tymi komórkami układu odpornościowego a mikroorganizmami, w tym wirusami obecnymi w układzie oddechowym bez wątpienia w ogromny sposób wpływa na skład mikroflory dróg oddechowych [31].

### 3. Mikrobiom dróg oddechowych w warunkach patologicznych

Rola mikrobiomu dróg oddechowych ważna jest w szczególności w stanach patologicznych płuc, głównie chorobach o przebiegu przewlekłym. Przyjmuje się, że infekcje wirusowe są główną przyczyną zaostrzenia chorób płuc, zwłaszcza astmy oraz przewlekłej obturacyjnej choroby płuc, jako że w ich przypadku mają one wyraźny wpływ na liczbę i rodzaj drobnoustrojów zasiedlających drogi oddechowe [29]. Choroby takie jak zwłóknienie lub rozedma płuc, powodują ograniczenie powierzchni wewnętrznej płuc o ponad 90% [8]. Także zaburzenia czynności przełyku i refluks, często występujące u osób z zaawansowanymi chorobami płuc, wpływają na natężenie migracji bakterii, wprowadzając dodatkowe źródło drobnoustrojów [12, 39]. Również zwłóknienie torbielowate lub przewlekłe zapalenie oskrzeli charakteryzujące się zaburzeniami oczyszczania śluzowo-rzęskowego, poprzez ograniczenie eliminacji mikroorganizmów prowadzi do zwiększenia liczby komórek bakteryjnych mikroflory [11]. Dodatkowo wykazano, że wiele terapii przewlekłych chorób dróg oddechowych wpływa na warunki wzrostu mikroorganizmu m.in. poprzez dopływ tlenu, stosowanie wziewnych kortykosteroidów czy antybiotyków, co także warunkuje imigrację zarazków, ich eliminację, ale także ich namnażanie w płucach [11, 14, 48]. Istnieją również powiązania pomiędzy rozwojem przewlekłych chorób płuc a zmianami w mikroflorze w tym układzie, głównie w odniesieniu do chorób jelita (choroba Crohna) i skóry (atopowe zapalenie skóry), a także takich chorób jak mukowiscydoza, astma oraz

przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP) [17, 18, 23, 27, 42], gdzie zaobserwowano dysbiozę drobnoustrojów oraz obniżenie różnorodności bakterii. Dysbioza wskazuje na chorą tkankę, jednak wciąż jest brak dowodów na to czy występuje ona jako przyczyna lub skutek w danej chorobie [31]. Badania na zarodkach mysich wykazały, że brak kolonizacji drobnoustrojów prowadzi do nasilenia alergicznego zapalenia dróg oddechowych, a ponowna kolonizacja przed ekspozycją na alergen jest w stanie utrwalić fenotyp bakterii [21]. Wykazano, że bezpośrednie podawanie nieszkodliwych bakterii do dróg oddechowych jest bardzo korzystne w przypadku alergicznego zapalenia dróg oddechowych [35]. Obserwacje te wykazały, że wczesna kolonizacja mikrobiologiczna dróg oddechowych jest istotna w celu indukcji tolerancji na alergeny wziewne w późniejszym życiu [21, 35]. Wykazano, że mikrobiom płuc jest fundamentalny w przypadku osób chorych na mukowiscydozę, ponieważ patogeny bakteryjne powodują wysoką śmiertelność. Badania dotyczące tej choroby dowiodły znaczenie takich mikroorganizmów jak: *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* i *Burkholderia* spp., choć istnieją także prace, wskazujące na *Prevotella* spp., *Rothia* spp. i *Veilonella* spp., których wcześniej nie wiązano z zaostrzeniem tej choroby [9, 18, 41]. Cox i wsp. wykazali, że różnorodność bakteryjnego mikrobiomu układu oddechowego obniża się wraz z wiekiem, a także stopniem nasilenia np. mukowiscydozy [7]. Inni autorzy stwierdzili zmniejszone zróżnicowanie mikroorganizmów wraz z wiekiem, a dodatkowo wykazali negatywny wpływ stosowanych antybiotyków systemowych i wziewnych na różnorodność mikrobiomu [26]. Obecnie przyjmuje się, że u chorych z przewlekłą obturacyjną chorobą płuc (POChP) znajomość mikrobiomu jest bardzo pomocna, lecz nadal nie jest wyjaśnione czy występuje swoisty mikrobiom płuc we wczesnym stadium POChP. Stwierdzono jednak, że wzrost liczby bakterii i nawracające infekcje w bardziej zaawansowanym stadium tej choroby podnoszą ryzyko wystąpienia przyspieszonej utraty funkcji płuc. Millares i wsp. dowiedli, że zaostrzenie przewlekłej obturacyjnej choroby płuc związane jest ze zmianami w mikroflorze dróg oddechowych, jak i to, że zaostrzenia jej związane jest z selektywnym wzrostem względnej liczby bakterii takich jak *Haemophilus* spp. oraz *Pseudomonas* spp. [33]. Według Huang i wsp. tak na początku jak i w trakcie zaostrzenia choroby POChP, występują także wyraźne zmiany ilościowe w składzie bakterii gromady *Proteobacteria* [24]. Analizując mikrobiom człowieka stwierdzono zależność między obniżoną liczbą zakażeń w dzieciństwie i rosnącym rozwojem astmy i alergii, co stanowiło podstawę do opracowania „hipotezy higieny” mówiącej o tym, że podniesiony poziom czystości środowiska i higieny człowieka, prowadzi do rozwoju

wielu schorzeń, w tym także o podłożu alergicznym [32]. Potwierdzono to także w badaniach dotyczących częstszego stosowania antybiotyków we wczesnym dzieciństwie, a późniejszą zachorowalnością na astmę i alergię, co wskazuje, że zakłócenia w mikrobiomie mogą stać się przyczyną pojawienia się tych chorób [9]. Hilty i wsp. porównując mikrobiom jamy ustnej i jamy nosowej oraz BALT (bronchus associated lymphoid tissue) u osób zdrowych i chorych na astmę, wykazali wyższą częstotliwość występowania gromad *Proteobacteria*, a obniżoną *Bacteroidetes*, a także zarejestrowali wzrost takich gatunków jak *Haemophilus* spp., *Moraxella* spp., *Neisseria* spp. [18, 22].

#### 4. Podsumowanie

Badania dotyczące mikrobiomu układu oddechowego to ważne zagadnienie, ponieważ mogą one umożliwić wskazanie interakcji pomiędzy drobnoustrojami, w tym ich metabolitami, a komórkami układu odpornościowego makroorganizmu. Poznanie tych faktów może nie tylko przyczynić się do scharakteryzowania środowiska płuc w zdrowiu, ale także w chorobie, co może stanowić podstawę budowania fundamentów patogenyzy wielu chorób tego układu. Działanie w tym zakresie może stanowić podstawę dla nowych, innowacyjnych terapii, bardzo potrzebnych w leczeniu takich chorób jak np. mukowiscydoza, astma czy przewlekła obturacyjna choroba płuc.

#### Piśmiennictwo

1. Abreu N.A., Nagalingam N.A., Song Y., Roediger F.C., Pletcher S.D., Goldberg A.N., Lynch S.V.: Sinus microbiome diversity depletion and *Corynebacterium tuberculostercali* enrichment mediates rhinosinusitis. *Sci. Transl. Med.* **4**, 151 (2012)
2. Binek M.: Mikrobiom człowieka – zdrowie i choroba. *Post. Mikrobiol.* **51**, 27–36 (2012)
3. Charlson E.S., Bittinger K., Haas A.R., Fitzgerald A.S., Frank I., Yadav A., Bushman F.D., Collman R.G.: Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am. J. Resp. Crit. Care. Med.* **184**, 957–963 (2011)
4. Charlson E.S., Chen J., Custers-Allen R., Bittinger K., Li H., Sinha R., Hwang J., Bushman F.D., Collman R.G.: Disordered microbial communities in the upper respiratory tract of cigarette smokers. *PLoS One*, **5**, e15216 (2010)
5. Charlson E.S., Diamond J.M., Bittinger K., Fitzgerald A.S., Yadav A., Haas A.R., Bushman F.D., Collman R.G.: Lung-enriched organisms and aberrant bacterial and fungal respiratory microbiota after lung transplant. *Am. J. Crit. Care. Med.* **186**, 545–545 (2012)
6. Cho I., Blaser M.I.: The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 260–270 (2012)
7. Cox M.J., Lynch S.V. et al.: Airway microbiota and pathogen abundance in age-stratified cystic fibrosis patients. *PLoS One*, **5**, e11044 (2010)



8. Coxson H.O., Rogers R.M., Whittall K.P., D'yachkova Y., Paré P.D., Sciruba F.C., Hogg J.C.: A quantification of the lung surface area in emphysema using tomography and histology. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **159**, 851–856 (1999)
9. Dickson R.P., Erb-Downward J.R., Huffnagle G.B.: The Role of the Bacterial Microbiome in Lung Disease *Expert Rev. Respir. Med.* **7**, 245–257 (2013)
10. Dickson R.P., Huffnagle G.B.: The Lung Microbiome: New Principles for Respiratory Bacteriology in Health and Disease. *PLoS Pathog.* **11**, e1004923 (2015)
11. Dickson R.P., Martinez F.J., Huffnagle G.B.: The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung disease. *Lancet*, **384**, 691–702 (2014)
12. D'Ovidio F., Singer L.G., Hadjiladis D., Pierre A., Waddell T.K., de Perrot M., Hutcheon M., Miller L., Darling G., Keshavjee S.: Prevalence of gastroesophageal reflux in end-stage lung disease candidates for lung transplant. *Ann. Thorac. Surg.* **80**, 1254–1260 (2005)
13. Erb-Downward J.R., Huffnagle G.B.: Analysis of the Lung Microbiome in the "Healthy" Smoker and in COPD. *PLoS One*, **6**, e16384 (2011)
14. Evans S.A., Turner S.M., Bosch B.J., Hardy C.C., Woodhead M.A.: Lung function in bronchiectasis: the influence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur. Respir. J.* **9**, 1601–1604 (1996)
15. Fiedurek J.: Mikrobiom a zdrowie człowieka. Wyd. Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin 2014
16. Frank D.N., Feazel L.M., Bessesen M.T., Price C.S., Janoff E.N., Pace N.R.: The human nasal microbiota and *Staphylococcus aureus* carriage. *PLoS One*, **5**, e10598 (2010)
17. Gevers D., Xavier R.J. et al.: The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe*, **15**, 382–392 (2014)
18. Gollwitzer E.S., Marsland B.J.: Microbiota abnormalities in inflammatory airways disease-potential for therapy. *Pharmacol. Ther.* **141**, 32–39 (2014)
19. Górecka D., Nowiński A., Augustynowicz-Kopeć E.: Mikrobiom układu oddechowego. *Pneumol. Alergol. Pol.* **82**, 481–485 (2014)
20. Grzybowski J., Dzierżanowska D.: Człowiek i drobnoustroje – współistnienie i konfrontacja. Alfa-medica Press (2014)
21. Herbst T., Sichelstiel A., Schär C., Yadava K., Bürki K., Cahenzli J., McCoy K., Marsland B.J., Harris N.L.: Dysregulation of allergic airway inflammation in the absence of microbial colonization. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **184**, 198–125 (2011)
22. Hilty M., Cookson W.O. et al.: Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One*, **5**, e8578 (2010)
23. Huang Y.J., Lynch S.V.: The emerging relationship between the airways microbiota and chronic respiratory disease: clinical implications. *Expert Rev. Respir. Med.* **5**, 809–821 (2011)
24. Huang Y.J., Sethi S., Murphy T., Nariya S., Boushey H.A., Lynch S.V.: Airway microbiome dynamics in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 2813–2823 (2014)
25. Human Microbiome Project, [www.hmpdacc.org](http://www.hmpdacc.org) (20.10.2015)
26. Klepac-Ceraj V., Kolter R. et al.: Relationship between cystic fibrosis respiratory tract bacterial communities and age, genotype, antibiotics and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* **12**, 1293–1303 (2010)
27. Kong H.H., Segre J.A. et al: Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Res.* **304**, 15–22 (2012)
28. Lung HIV Microbiome Project, <https://lhmp.bsc.gwu.edu> (20.10.2015 r.)
29. Mallia P., Contoli M., Caramori G., Pandit A., Johnston S.L., Papi A.: Exacerbations of asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD): focus on virus induced exacerbations. *Curr. Pharm. Des.* **13**, 73–97 (2007)
30. Marsland J.: Influences of the Microbiome on the Early Origins of Allergic. *Asthma. Ann. Am. Thorac. Soc.* **10**, 165–169 (2013)
31. Marsland B.J., Gollwitzer E.S.: Host-microorganism interactions in lung disease. *Nature*, **14**, 827–835 (2014)
32. Mękal A., Tokarz-Deptuła B., Deptuła W.: Mikroorganizmy – nasi mali przyjaciele, czyli wybrane dane o hipotezie higieny. *Probl. Hig. Epidemiol.* **92**, 377–381 (2011)
33. Millares L., Ferrari R., Gallego M., Garcia-Nuñez M., Pérez-Brocal V., Espasa M., Pomares X., Monton C., Moya A., Monsó E.: Bronchial microbiome of severe COPD patients colonized by *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **33**, 1101–1111 (2014)
34. Morris A., Weinstock G.M. et al: Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **187**, 1067–1075 (2013)
35. Nembrini C., Sichelstiel A., Kisielow J., Kurrer M., Kopf M., Marsland B.J.: Bacterial – induced protections against allergic inflammation through a multicomponent immunoregulatory mechanism. *Thorax*, **66**, 755–763 (2011)
36. Ngyen L.D., Viscogliosi E., Delhaes L.: The lung mycobioime: an emerging field of the human respiratory microbiome. *Front Microbiol.* DOI: 10.3389/fmicb.2015.00089 (2015)
37. Ohnamacht C., Eberl G et al: The microbiota regulates type 2 immunity through ROR $\gamma$ T<sup>+</sup> T cells. *Science*, **349**, 989–993 (2015)
38. Pragman A.A., Bum Kim H., Reilly C.S., Isaacson R.E.: The lung microbiome in moderate and severe chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One*, **7**, e4730 (2012)
39. Raghu G., Freudenberger T.D., Yang S., Curtis J.R., Spada C., Hayes J., Sillery J.K., Pope C.E., Pellegrini C.A.: High prevalence of abnormal acid gastro-esophageal reflux in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* **27**, 136–142 (2006)
40. Rasmussen T.T., Kirkeby L.P., Poulsen K., Reinholdt J., Kilian M.: Resident aerobic microbiota of the adult human nasal cavity. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* **108**, 663–675 (2000)
41. Redinbo M.R.: The microbiota, chemical symbiosis and human disease. *J. Mol. Biol.* **426**, 3877–391 (2014)
42. Sze M.A., Hogg J.C., Sin D.D.: Bacterial microbiome of lungs in COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **9**, 229–238 (2014)
43. Turnbaugh P.J., Ley R.E., Hamady M., Fraser-Liggett C., Knight R., Gordon J.I.: The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in changing world. *Nature*, **449**, 804–810 (2007)
44. Underhill D.M., Illiev I.D.: The mycobioita: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nature Rev. Immunol.* **14**, 405–416 (2014)
45. van Woerden H.C., Gregory C., Brown R., Marchesi J.R., Hoogendoorn B., Matthews I.P.: Differences in fungi present in induced sputum samples from asthma and non-atopic controls: a community based case control study. *BMC Infect. Dis.* DOI: 10.1186/1471-2334-13-69 (2013)
46. Wu H., Kuzmenko A., Wan S., Schaffer L., Weiss A., Fisher J.H., Kim K.S., McCormack F.X.: Surfactant proteins A and D inhibit the growth of Gram-negative bacteria by increasing membrane permeability. *J Clin. Invest.* DOI: 10.1172/JCI200316889 (2003)
47. Wylie K.M., Weinstock G.M., Storch G.A.: Emerging View of the Human Virome. *Transl. Res.* **160**, 283–290 (2012)
48. Zalacain R., Sobradillo V., Amilibia J., Barrón J., Achótegui V., Pijoan J.I., Llorente J.L.: Predisposing factors to bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.* **13**, 343–348 (1999)

Paulina Niedźwiedzka-Rystwej<sup>1</sup>, Beata Tokarz-Deptuła<sup>1\*</sup>, Wiesław Deptuła<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Immunologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński

<sup>2</sup>Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński

Wpłynęło w październiku 2015 r.

Zaakceptowano w lutym 2016 r.

1. Wprowadzenie. 2. Granule stresu (SG – stress granules). 3. Ciałka degradujące (PB – processing bodies). 4. Granule egzosomalne (EG – exosome granules). 5. Granule powodowane promieniowaniem UV (UVG – UV granules). 6. Granule EGP (glucose depletion granules). 7. Podsumowanie

#### Granule RNA – nowe elementy odporności regulujące homeostazę organizmu

**Abstract:** One of the mechanisms of mRNA protection in dangerous conditions, such as stress or viral infections, is the formation of RNA granules. This mechanism depends on mRNA gathering within a granule, until the cell conditions are again stable enough to fulfill its functions. So far a number of RNA granule types have been described: stress granules (SG), processing bodies (PB), exosome granules, granules caused by UV, and glucose depletion P-bodies. Those elements are not only an extremely important factor influencing cell homeostasis, but also a new element of immunity.

1. Introduction. 2. Stress granules (SG). 3. Processing bodies (PB). 4. Exosome granules (EG). 5. UV granules (UVG). 6. Granule EGP (glucose depletion granules). 7. Summary

**Słowa kluczowe:** granule RNA, mRNA, odporność

**Key words:** RNA granules, mRNA, immunity

## 1. Wprowadzenie

Informacja genetyczna zawarta w RNA stanowi niezbędny element funkcjonowania każdej komórki, jednakże ze względu na fakt, że w większości przypadków występuje ono jako jednoniciowe, zwiększa się jego podatność na zniszczenie. Przyjmuje się, że w czasie ewolucji wykształciły się mechanizmy chroniące RNA przed degradacją informacji w nim zawartej, jako że materiał ten nadzoruje i kontroluje ekspresję genów, zapewniając komórce m.in. możliwość do dostosowania się do różnych sytuacji, w tym takich jak ekspozycja na stres wywołana różnymi czynnikami, w tym np. zakażeniami wirusowymi [2]. W obrębie RNA wyróżnia się RNA kodujące – informacyjne – mRNA (messenger RNA), które są transkryptami genów kodujących białka, stąd ulegają translacji do białek w drugim etapie ekspresji genomu oraz RNA niekodujące, w skład którego wchodzi RNA rybosomowy (rRNA) oraz RNA transportujący (tRNA) [7]. Wspomniane mechanizmy ochronne dotyczą głównie RNA informacyjnego – mRNA i jedną z jego strategii ochronnych, jest tworzenie się struktur komórkowych, określanych jako granule RNA, do których zaliczyć należy granule stresu (SG – stress granules), ciała degradujące (PB – processing bodies) [27], granule egzosomalne (exosome granules), a także niedawno opisane granule

powodowane promieniowaniem UV oraz granule EGP (glucose depletion P-bodies) [2, 10, 13, 30]. Ochronna rola tych elementów polega na przechowywaniu mRNA w komórce w postaci skupiska, tworzącego pęcherzyk (granulę), których rolę wykazano w wielu procesach, w tym patologicznych, np. w zakażeniach wirusowych, przez co uznaje się je także za nowy element odporności naturalnej [27].

## 2. Granule stresu (SG – stress granules)

Elementy te występują głównie w cytoplazmie, choć także jako mRNP (messenger ribonucleoprotein) w jądrze i są to struktury dynamiczne, pojawiające się w czasie występowania niesprzyjających warunków. Tworzenie ich u wielu gatunków jest procesem konserwatywnym i dotyczy zarówno komórek zwierzęcych, jak i roślinnych [7]. SG cechują się dużą koncentracją czynników inicjujących translację np. eIF4e (eukaryotic translation initiation factor 4E), podjednostek rybosomu 40S oraz szeregu białek, takich jak m.in.: Ago2 (argonaute protein), APOBEC3 (polipoprotein B mRNA-editing, enzyme-catalytic, polypeptide-like 3G), PCB2 (3,8-divinyl protochlorophyllide a 8-vinyl reductase), TTP (tristetraprolin), występujących również w ciałkach degradujących (PB) [3, 5, 29, 34]. Ponadto

\* Autor korespondencyjny: Katedra Immunologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński, ul. Felczaka 3c, Szczecin 71-412; tel. 91 44 41 605; fax 91 44 41 606; e-mail: kurp13@univ.szczecin.pl

w tych granulach znajdują się także białka wiążące RNA, takie jak TIA-1 (cytotoxic granule-associated RNA binding protein) i G3BP (Ras GTPase-activating protein-binding protein 1), które zawierają domeny istotne dla agregacji granul stresu i są to elementy wyciszające komórkowy mRNA [3, 5]. Ze względu na zawartość w SG kompleksów inicjujących podjednostki głównie rybosomu 43S i 48S (43S and 48S ribosomal preinitiation complexes), granule te stanowią tymczasowe „magazyny”, dzięki czemu w momencie stresu oksydacyjnego w komórce lub w czasie zakażenia wirusowego, kompleksy te mogą zostać w szybkim tempie uaktywnione [29]. W granulach SG występują także białka, które nie są w sposób jednoznaczny związane z metabolizmem RNA, takie jak TRAF 2 (TNF-receptor associated factor 2), fakofylina 1 i 3, będące elementami cytoszkieletu komórki, co ma szczególne znaczenie podczas zakażeń wirusowych [3]. Początkowo uważano, że SG są jedynie biernymi magazynami funkcjonalnego mRNA, który akumuluje w warunkach niekorzystnych dla komórki, jednakże okazało się, że w wyniku takiej akumulacji SG mogą chronić komórkowy mRNA i ponownie inicjować jego translację, gdy warunki staną się korzystne [3]. Najbardziej prawdopodobny scenariusz tworzenia się SG pod wpływem stresu wskutek np. zakażenia wirusowego, rozpoczyna się aktywacją jednej z kinaz eIF2 $\alpha$ , która fosforyluje podjednostkę alfa tej kinazy i blokuje translację, wymuszając w ten sposób akumulację aktywnych kompleksów 43S i 48S [29] i to jest charakterystyczna i swoista cecha tylko dla granul SG [3]. Nie zawsze aktywacja SG, jak i ich zawartość jest jednakowa, jako że zależy to od rodzaju czynnika niekorzystnego oddziałującego na komórki makroorganizmu [29]. Na skutek stresu wywołanego szokiem cieplnym, tworzą się HS-SG (heat shock SG), zawierające dużą koncentrację białek szoku cieplnego – hsp27 [29], zaś pod wpływem działania czynników chemicznych, np. arsenu, tworzą się Ars-SG (arsenite SG), natomiast w wyniku stresu powstającego w wyniku zakażenia wirusowego, tworzą się V-SG (viral SG). Stres prowadzi do wstępnego łączenia się SG, co związane jest z działaniem białek wiążących RNA, takich jak TIA-1 (cytotoxic granule-associated RNA binding protein), CPEB (cytoplasmic polyadenylation element binding protein), G3BP (Ras GTPase-activating protein-binding protein 1) oraz czynników BRF1 (TBP associated factor 1), FMRP (fragile X mental retardation 1), SMN (survival of motor neuron), a także receptorów TIAR (cytotoxic granule-associated RNA binding protein receptor) i genu FXR1 (gene coding fragile X mental retardation 1) – co łączy się z powstawaniem „jądra” SG [3]. W czasie, gdy „jądro” SG jest już w pewnym stopniu ukonstytuowane, następuje tworzenie się „pnia” SG, który utworzony jest przez czynniki translacyjne, to jest eIF3 i eIF4F oraz białko PABP-1 (poly(A)-binding pro-

tein 1) [3]. Następnie dochodzi do tzw. drugorzędowej agregacji, w wyniku której SG stają się strukturą większą – widzialną w mikroskopie i mającą zdolność do przekazywania sygnałów w obrębie całej komórki [3]. Należy także wspomnieć o roli białek będących składnikami cytozolu, których zadanie polega na „eskortowaniu” mRNA do i z SG i jest to TTP (tristetraprolin), BFR1 (TBP associated factor 1) i ZBP1 (zipcode-binding protein 1) [3]. W przypadku ustabilizowania się homeostazy w komórce, w przeciągu kilku minut dochodzi do rozpadu SG, co w obrazie mikroskopowym przypomina bardziej rozpuszczenie, niż defragmentację.

Jak dotychczas, rolę SG udokumentowano w zakażeniach wirusowych [1, 3–5, 8, 17–19, 26, 29, 32, 34], a także w procesie nowotworzenia [23] oraz w wyniku działania radioterapeutycznego i w chorobach genetycznych, np. zespole łamliwego chromosomu X [11], rdzeniowym zaniku mięśni [25] oraz w zespole poreperfuzyjnym [15]. Według wielu Autorów [16, 21, 33], że SG to coś więcej niż tylko struktury służące do przechowywania materiału genetycznego, jako że tworzenie się SG w komórce narażonej np. na stres, dochodzi do zmniejszenia produkcji reaktywnych form tlenu, co między innymi zapobiega apoptozie [33]. Ponadto niezwykłość struktur SG, ściśle powiązana jest z mechanizmami obronnymi organizmu [16], jako że granule te służą nie tylko do przechowywania mRNA, ale w czasie zagrożenia w komórce, stają się centrami sygnałowymi i informacyjnymi, bo przekazują sygnał zagrożenia do całej komórki, co wydaje się być bardzo ważnym elementem w teorii zagrożenia opisanej przez Polly Metzinger w 1994 roku, która jest odmienną od fundamentalnych założeń w immunologii – polegających na rozróżnianiu struktur własnych (self) od struktur obcych (non-self) i reagowaniu na te drugie odpowiedzą odpornościową. W teorii zagrożenia ważnymi i fundamentalnymi elementami są sygnały „niebezpieczeństwa” – DAMP (damage-associated molecular patterns – wzorce molekularne towarzyszące zniszczeniu), które są przyczyną rozpoczęcia reakcji obronnej – odpornościowej, mimo faktu, iż stanowią one fizjologiczny, a nie obcy element komórki, bo są to m.in. HSP, DNA mitochondrialne, czy też ATP i kwas moczowy, a także białka powstające w trakcie martwicy czy apoptozy komórek np. białko S100 i S200 [20]. Stąd teoria zagrożenia pozwala w odróżnieniu od zasady self-nonself na wyjaśnienie zjawisk związanych m.in. z reakcją immunologiczną na sygnały niebezpieczeństwa, np. uszkodzenie tkanek [20]. Wśród białek sygnałowych, które związane są z SG, a jednocześnie znane są także ze swej roli uaktywniania wielu mechanizmów odpornościowych, należy wymienić ścieżkę RACK1/p38/JNK, jak też ścieżkę sygnałową mTOR (mechanistic TOR), których rola jest udokumentowana przy aktywacji receptorów TLR, które dzięki swoistemu wiązaniu

PAMP (pathogen-associated molecular patterns) bakterii, wirusów, grzybów i pierwotniaków, są superaktywatorami układu odpornościowego [16]. Rolę SG udowodniono również przy przekazywaniu informacji [21], wykazując, że są one ściśle powiązane z jąderkiem komórkowym, którego rolą jest właśnie „wyczuwanie” nadchodzącego stresu w komórce i stanie na straży homeostazy komórkowej. Stąd można by przyjąć, że tworzenie się SG jest ważnym elementem i podstawą warunkującą homeostazę, bo stabilizują mRNA, wpływając na przeżycie komórki, blokując apoptozę oraz, co wspomniano, wpływają na uaktywnienie szeregu ścieżek sygnałnych, które aktywują procesy odporności naturalnej, m.in. poprzez TLR [21].

### 3. Ciałka degradujące (PB – processing bodies)

PB w komórkach wielu organizmów eukariotycznych, są stałymi strukturami głównie cytoplazmatycznymi, jednak nie tworzącymi się, tak jak SG, tylko w niesprzyjających warunkach [5, 6, 29]. Składają się one z wielu enzymów i białek fizjologicznie występujących w komórkach w stanie spoczynku, choć ciągle nieznaną jest do końca ich budowa i zawartość, a jedynie udokumentowano, że występują w nich takie enzymy, jak Dcp1/Dcp2 (decapping enzymes) i eksonukleazy Xrn1 [5], które stanowią ogniwo pośrednie produktów degradacji mRNA [2]. Początkowo uważano [2], że PB mogą służyć jako miejsca, w których labilne RNA „oczekuje” na degradację, co potwierdzone zostało odkryciem, że inaktywacja białek zaangażowanych w rozpad mRNA, takich jak Xrn1, wzmagą formowanie PB. Podstawą mechanizmu molekularnego tworzenia się PB jest agregacja białek łączących RNA na zasadzie białko-białko, jak też samego mRNA, czego konsekwencją jest fakt, że PB łatwo ulegają degradacji, chociażby na skutek działania RNaz [5, 29]. Przypuszcza się, że PB współdziałają z SG, poprzez dynamiczną wymianę swoich zawartości, co najprawdopodobniej dzieje się dzięki białkom Roquin [2, 29]. Adjibade i Mazroui wykazali [2], że oprócz informacyjnego mRNA, również regulatorowe miRNA, może być w niektórych przypadkach kierowane do PB, co jest bardzo ważnym faktem w kontekście roli miRNA w komórkach, w tym w procesach odpornościowych [14]. Ponadto istnieje przypuszczenie, że po odzyskaniu homeostazy w komórce, kiedy nie zachodzi już potrzeba formowania się SG, mRNA może być w komórce przechowywany, w celu późniejszej translacji, właśnie w PB [5]. W przypadku roli PB, w odróżnieniu od SG, mówi się jedynie o ich znaczeniu w zakażeniach wirusowych takimi wirusami jak polio, wirus Coxsackie, adenowirusy, wirus grypy typu A, wirus żółtej febry, Dengue i Zachodniego Nilu oraz wirus zapalenia wątroby typu C [5, 6, 9, 24, 29, 31, 35].

### 4. Granule egzosomalne (EG – exosome granules)

Oprócz zarejestrowania występowania granul SG, PB, opisano także granule EG, które powstają zarówno w warunkach stresowych, jak i też w warunkach braku stresu i są związane z egzosomami – pęcherzykami spontanicznie tworzącymi się w komórkach [2]. Egzosomy, zwane także pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi (extracellular vesicles) produkowane są przez niemal wszystkie komórki ustroju i mogą swobodnie przenikać do płynów ustrojowych [30]. Zawierają one białka, tłuszcze i kwasy nukleinowe swoiste dla komórki macierzystej, z której się wywodzą [30]. Są to niezwykle istotne struktury w komunikacji międzykomórkowej – tak lokalnej, jak i systemowej, jako że zdolne są transferować swoistą zawartość pomiędzy komórkami [30]. Są one również uważane za elementy mające zdolności zarezerwowane uprzednio jedynie dla SG i PB, tj. ochronę mRNA w warunkach stresowych dla komórki [2, 30]. Według Zurla i wsp. [36], granule EG tworzą się jedynie wtedy, gdy zagrożony transkrypt (odcinek RNA powstały w wyniku transkrypcji odcinka DNA) jest związany z siateczką śródplazmatyczną, co wykazano w stosunku do komórek epitelialnych, w których mRNA związane z centrum organizującym mikrotubule MTOC (microtubule organizing center), tworzyły EG, zaś te związane z cytoszkieletem formowały SG [36]. Wykazano, że EG, podobnie jak SG, odgrywają rolę w procesach zapalnych, chorobach autoimmunizacyjnych i nowotworowych, jak też stwierdzono ich udział w procesach immunologicznych [30]. Według Robbins i Morelli [30], pęcherzyki EG pochodzące z linii limfocytów B biorą udział w reakcjach odpornościowych, jako że posiadają na swej powierzchni antygeny MHC klasy II oraz szereg cząsteczek kostymulujących i adhezyjnych, co dowodzi, że mogą one stymulować limfocyty T z receptorem CD4+. Podobnie pęcherzyki EG uwalniane z komórek prezentujących antygen, wykazują na swej powierzchni antygeny MHC klasy I i II, przez co zdolne są do aktywacji limfocytów T CD8+, jak i T CD4+ [30]. Nadto wykazano, że aktywacja limfocytów T CD8+ i CD4+, choćby poprzez EG, może być wzmagana dodatkowo przez interakcję z komórkami dendrytycznymi, poprzez interakcje z cząsteczkami adhezyjnymi CD54 [30]. Rolę EG wykazano także w trakcie infekcji takimi wirusami jak wirus Epstein-Barr, cytomegalowirus i wirus grypy, podczas których aktywowały one wydzielanie IFN $\gamma$  [30]. Stwierdzono także, że EG, oprócz funkcji swoistego transportera mRNA, mogą także służyć jako „nosiciele” antygenów, co zaobserwowano w przypadku chorób bakteryjnych i wirusowych, a co może wskazywać na ich rolę jako nośników antygeny szczepionkowego [30]. Dodać należy, że oprócz ich roli w promowaniu odpowiedzi immunologicznej, wykazują one także efekt immu-

nosupresyjny, gdyż doustne podanie albuminy (OVA) powodowało pojawienie się w surowicy EG posiadających antygeny MHC klasy II, które wykazywały zdolność hamowania reakcji specyficznych dla OVA i określono je jako tolerosomy [28].

### 5. Granule powodowane promieniowaniem UV (UVG – UV granules)

Granule UV zostały niedawno po raz pierwszy zidentyfikowane w komórkach drożdży i różnią się one zarówno od SG, jak i PB [2]. Formowanie UVG koreluje z destabilizacją mRNA powodowaną przez promieniowanie UV, jako że UVG, niezależnie od działania promieni UV, posiadają stabilny reporter mRNA (stable mRNA reporter), który wraz z endogennym RNA posiadającym łańcuch poli (A), doprowadza do sytuacji, że mRNA związane z UVG, ulega zniszczeniu, choć według Adjibae i Mazroui [2] promieniowanie UV zapobiega deadenylacji niektórych rodzajów mRNA. Stąd uważa się obecnie, że UVG to granule występujące tylko u drożdży, w których znajduje się uszkodzony poli(A) RNA [2], zaś u innych organizmów rolę tę spełniają granule SG [2]. Według Gaillard i Aguilera [10] UVG są jednak zbliżone do PB, a to, co je różni od PB, to fakt, że tworzą się w wyniku działania UV, nie w trakcie innych sytuacji stresowych dla komórki. Niezależnie jednak od tych faktów, badania dotyczące UVG wykazują [2], że istnieje związek między odpowiedzią na zniszczenie DNA pojawiające się w jądrze, a formowaniem się granul RNA w cytoplazmie, co dowodziłoby roli UVG w ochronie organizmu.

### 6. Granule EGP (glucose depletion granules)

Powstawanie granul EGP udokumentowano jedynie, tak jak w przypadku granul UV, u drożdży, w sytuacji braku niezbędnej dla ich rozwoju glukozy w środowisku [10]. Zarejestrowano, że w momencie inaktywacji translacji w komórce, na skutek obniżonego poziomu glukozy, mRNA przechowywane jest w EGP [13]. Wykazano, że w obrębie tych struktur znajdują się również takie czynniki translacyjne jak eIF4E i eIF4G, które występują także w innych typach granul mRNA, np. SG [10]. Gaillard i Aguilera wykazali [10], że ciała EGP są odmienne od granul UVG, ale cechuje ich współwystępowanie z granulami PB [10]. Od granul UVG różnią się tym, że w czasie ich tworzenia dochodzi do rozpadu polisomu, czego nie obserwuje się w przypadku granul UVG [10]. Natomiast współlistnienie z PB [13] następuje w warunkach braku glukozy, choć w niektórych przypadkach mogą konkurować o wytworzenie swoich granuli w celu ochrony mRNA. Ponadto granule

EGP mogą tworzyć się dzięki procesowi dojrzewania PB, w trakcie którego dochodzi do wydalania takich komponentów jak Dcp1 i Dcp2, które są niezbędne dla dalszego funkcjonowania komórki, a które stają się integralną częścią EGP. Wyniki badań dotyczących EGP sugerują również możliwość ich tworzenia de novo, niezależnie od ścieżki dojrzewania PB [13].

### 7. Podsumowanie

Poznanie nowych struktur komórkowych – granul RNA, takich jak granule stresu (SG), ciała degradujące (PB), granule egzosomalne (EG) oraz granule UV (UVG) i granule EGP, stanowi istotne rozszerzenie wiedzy na temat mechanizmów, których zadaniem jest szeroko rozumiane utrzymanie homeostazy w ustroju. Mechanizm ich funkcjonowania, polegający na ochronie materiału genetycznego, jest także bardzo ważnym elementem odporności ustroju. Jednakże wciąż wiele kwestii związanych z granulami RNA jest nierozwiązanych i wymaga dalszych badań.

### Piśmiennictwo

1. Abrahamyan L.G., Chatel-Chaix L., Ajamian L., Milev M.P., Monette A., Clément J.-F., Song R., Lehmann M., DesGroseillers L., Laughrea M., Boccaccio G., Mouland A.J.: Novel Staufen 1 ribonucleoproteins prevent formatting of stress granules but favour encapsidation of HIV-1 genomic RNA. *J. Cell. Sci.* **123**, 369–383 (2010)
2. Adjibade P., Mazroui R.: Control of mRNA turnover: implication of cytoplasmic RNA granules. *Semin. Cell Dev. Biol.* **34**, 15–23 (2014)
3. Anderson P., Kedersha N.: Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem. Sci.* **33**, 141–150 (2007)
4. Ariumi Y., Kuroki M., Kushima Y., Osugi K., Hijikata M., Maki M., Kieda M., Kato N.: Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets. *J. Virol.* **85**, 6882–6892 (2011)
5. Balagopal V., Parker R.: Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 403–408 (2009)
6. Beckham C.J., Parker R.: P bodies, stress granules, and viral cycles. *Cell Host Microbe*, **3**, 206–212 (2008)
7. Brown T.A.: Genomy, PWN, Warszawa, 2001
8. Crestea I.M., Rozjabeck H., Molloy K.R., Karki S., White L.L., Rice C.M., Rout M.P., Chait B.T., MacDonald M.R.: Host factors associated with Sindbis virus RNA-dependent RNA polymerase: role for G3BP1 and G3BP2 in virus replication. *J. Virol.* **84**, 6720–6732 (2010)
9. Dougherty J.D., White J.P., Lloyd R.E.: Poliovirus-mediated disruption of cytoplasmic processing bodies. *J. Virol.* **85**, 64–75 (2011)
10. Gaillard H., Aguilera A.: A novel class of mRNA-containing cytoplasmic granules are produced in response to UV-irradiation. *Mol. Biol. Cell.* **19**, 4980–4992 (2008)
11. Garber K., Smith K.T., Reines D., Warren S.T.: Transcription, translation and fragile X syndrome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **16**, 270–275 (2006)

12. Greer A.E., Hearing P., Ketner G.: The adenovirus E4 11K protein binds and relocalizes the cytoplasmic P-body component Ddx6 to aggresomes. *Virology*, **417**, 161–168 (2011)
13. Hoyle N.P., Castelli L.M., Campbell S.G., Holmes L.E.A., Ashe M.P.: Stress-dependent relocalization of translationally primed mRNPs to cytoplasmic granules that are kinetically and spatially distinct from P-bodies. *J. Cell Biol.* **179**, 65–74 (2007)
14. Hukowska-Szematowicz B., Deptuła W.: Biologiczna rola mikroRNA (miRNA) – nowe dane. *Post. Biol. Kom.* **37**, 585–597 (2010)
15. Kayali F., Montie H.L., Rafols J.A., DeGracia D.J.: Prolonged translation arrest in reperused hippocampal cornu Ammonis 1 is mediated by stress granules. *Neuroscience*, **134**, 1223–1245 (2005)
16. Kedersha N., Ivanov P., Anderson P.: Stress granules and cell signaling: more than just a passing phase? *Trends Biochem. Sci.* **38**, 494–506 (2013)
17. Khapersky D.A., Hatchette T.F., McCormick C.: Influenza a virus inhibits cytoplasmic stress granule formation. *FASEB J.* **26**, 1629–1639 (2011)
18. Legros S., Boxus M., Gatot J.S., Van Lint C., Krays V., Kettmann R., Twizere J.C., Dequiedt F.: The HTLV-1 Tax protein inhibits formation of stress granules by interacting with histone deacetylase 6. *Oncogene*, **30**, 4050–4062 (2011)
19. Li W., Li Y., Kedersha N., Anderson P., Emará M., Swiderk K.M., Moreno G.T., Brinton M.A.: Cell proteins TIA-1 and TIAR interact with the 3' stemloop of the West Nile virus complementary minus-strand RNA and facilitate virus replication. *J. Virol.* **76**, 11989–12000 (2002)
20. Lin W.J., Duffy A., Chen C.Y.: Localization of AU-rich element containing mRNA in cytoplasmic granules containing exosome subunits. *J. Biol. Chem.* **282**, 19958–19968 (2007)
21. Mahboubi H., Stochaj U.: Nucleoli and stress granules: connecting distant relatives. *Traffic*, **15**, 1179–1193 (2014)
22. Matzinger P.: Friendly and dangerous signals: is the tissue in control? *Nat. Immunol.* **8**, 11–13 (2007)
23. Moeller B.J., Cao Y., Li C. Y., Dewhirst M. W.: Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell*, **5**, 429–441 (2004)
24. Mok B., Song W.-Y., Wang P., Tai H., Chen Y., Zheng M., Wen X., Lau S.-Y., Wu W.L., Matsumoto K., Yuen K.-Y., Chen H.: The NS1 protein of influenza virus interacts with cellular processing bodies (P-bodies) and stress granules through RNA-associated protein 55 (RAP55) during virus infection. *J. Virol.* **86**, 12695–12707 (2012)
25. Monani U.R.: Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron-specific disease. *Neuron*, **48**, 885–896 (2005)
26. Montero H., Rojas M., Arias C.F., López S.: Rotavirus infection induces the phosphorylation of eIF2 $\alpha$  but prevents the formation of stress granules. *J. Virol.* **82**, 1496–1504 (2008)
27. Niedźwiedzka-Rystwej P., Tokarz-Deptuła B., Deptuła W.: Granule stresu i ciała degradujące – ważne mechanizmy obronne w zakażeniach wirusowych. *Med. Weter.* **70**, 400–403 (2014)
28. Ostman S., Taube M., Telemo E.: Tolerosome-induced oral tolerance is MHC dependent. *Immunol.* **116**, 464–476 (2005)
29. Reineke L.C., Lloyd R.E.: Diversion of stress granules and P-bodies during viral infection. *Virology*, **436**, 255–267 (2013)
30. Robbins P.D., Morelli A.E.: Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 195–208 (2014)
31. Smith J.A., Schmechel S.C., Raghavan A., Abelson M., Reilly C., Katze M.G., Kaufman R.J., Bohjanen P.R., Schiff L.A.: Reovirus induces and benefits from an integrated cellular stress response. *J. Virol.* **80**, 2019–2033 (2006)
32. Takahara T., Maeda T.: Transient sequestration of TORC1 into stress granules during heat stress. *Mol. Cell.* **47**, 242–252 (2012)
33. Takahashi M., Higuchi M., Matsuki H., Yoshita M., Ohsawa T., Oie M., Fujii M.: Stress granules inhibit apoptosis by reducing reactive oxygen species production. *Mol. Cell Biol.* **33**, 815–829 (2013)
34. Valiente-Echeverría F., Melnychuk L., Moulant A.J.: Viral modulation of stress granules. *Vir. Res.* **169**, 430–437 (2012)
35. White J.P., Cardenas A.M., Marissen W.E., Lloyd R.E.: Inhibition of cytoplasmic mRNA stress granule formation by a viral proteinase. *Cell Host Microbe*, **2**, 295–305 (2007)
36. Zurla C., Lifland A.W., Santangelo P.J.: Characterizing mRNA interactions with RNA granules during translation initiation inhibition. *PLoS One*, **6**, e19727 (2011)

Grażyna Stasiak<sup>1</sup>, Andrzej Mazur<sup>2</sup>, Piotr Koper<sup>2</sup>, Kamil Żebracki<sup>2</sup>, Anna Skorupska<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Zakład Hematoonkologii Doświadczalnej, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym,  
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

<sup>2</sup>Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

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

1. Znaczenie biologicznego wiązania azotu (BNF). 2. Partnerzy symbiozy. 3. Etapy symbiozy. 3.1. Inicjacja symbiozy. 3.2. Rozwój brodawki. 3.3. Typy brodawek korzeniowych. 4. Wiązanie azotu. 5. Genomy rizoziobów. 6. Chromidy i megaplazmidy. 7. Plastyczność genomów rizoziobów. 8. Podsumowanie

### Symbiosis of rhizobia with legume plants (Fabaceae)

**Abstract:** Biological nitrogen fixation is one of the most important processes in which atmospheric nitrogen is reduced to ammonia by symbiotic bacteria called rhizobia, which belong to  $\alpha$ - and  $\beta$ -proteobacteria. Legume plants (Fabaceae) have the capacity to enter into mutualistic symbiosis with nitrogen-fixing bacteria, enabling them to grow in nitrogen-limited agricultural soils. In these specific associations, new organs called root or shoot nodules are developed. Infection of plants by rhizobia is a series of sequential stages in which rhizobial lipochitooligosaccharide, called the Nod factor, activates plant transmission signaling and initiates nodule development. In the nodules the bacteria multiply and differentiate into nitrogen-fixing bacteroids. In return for reduced nitrogen compounds provided to the plants, rhizobia are supplied with plant carbon photosynthetic products and are protected from environmental stresses.

Genomes of rhizobia and other soil bacteria are large and multipartite, composed of the chromosome and plasmids (megaplasmids), which may comprise up to 50% of the genome. A common feature of the rhizobial genomes is that genes responsible for nodulation and nitrogen fixation are clustered on symbiotic plasmids (pSym) or incorporated into the chromosome as symbiotic islands. Plasmids are heterogeneous in size and gene content even in closely related rhizobia. Recently described extrachromosomal replicons, named "chromids", have some chromosome and plasmid properties and are essential for bacterial growth under natural and laboratory conditions. The special architecture of rhizobial genomes may cause their dynamic state and plasticity, leading to significant diversity of rhizobia on the genetic and metabolic levels.

1. The importance of biological nitrogen fixation (BNF). 2. Symbiosis partners. 3. Symbiosis stages. 3.1. Initiation of symbiosis. 3.2. Nodule development. 3.3. Types of nodules. 4. Nitrogen fixation. 5. Rhizobial genomes. 6. Chromids and megaplasmids. 7. Plasticity of rhizobial genomes. 8. Summary

**Słowa kluczowe:** brodawki korzeniowe, genomy rizoziobów, symbiotyczne wiązanie azotu

**Key words:** root nodules, rhizobial genomes, symbiotic nitrogen fixation

## 1. Znaczenie biologicznego wiązania azotu

Azot (N), jako składnik wielu biocząsteczek, takich jak białka, kwasy nukleinowe i witaminy, jest niezbędnym elementem warunkującym istnienie wszelkich form życia. Pomimo dużej zawartości azotu cząsteczkowego ( $N_2$ ) w atmosferze, jego redukcja do form łatwo przyswajalnych przez organizmy jest trudna, ze względu na potrójne kowalencyjne wiązanie między atomami N. Zdolność redukcji azotu atmosferycznego do amoniaku mają wyłącznie organizmy prokariotyczne: bakterie i archeony [43, 44]. Proces mikrobiologicznej redukcji azotu do form dostępnych dla roślin jest nazywany biologicznym wiązaniem azotu (BNF, *biological nitrogen fixation*) i obok fotosyntezy stanowi podstawę życia na ziemi. Ograniczona dostępność zredukowanych związków azotowych ( $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $NH_4^+$ ) w glebie często jest głównym czynnikiem limitującym

wzrost i produktywność roślin [44, 91], w tym także tych uprawianych w celach żywieniowych. Niektóre rośliny mogą wykorzystywać  $N_2$  obecny w atmosferze poprzez tworzenie symbiozy z bakteriami, które mogą wiązać i redukować azot cząsteczkowy. Takie rośliny nie wymagają nawożenia azotowego i rozwijają się dobrze na glebach ubogich w azot, znacznie zwiększając poziom globalnego obiegu azotu w przyrodzie [70]. Najlepiej poznaną grupą roślin tworzącą układy symbiotyczne są rośliny bobowate (motylkowate), Fabaceae, które wchodzi w interakcję z Gram-ujemnymi bakteriami, ogólnie nazywanymi rizoziobami, należącymi do klas  $\alpha$ - i  $\beta$ -proteobakterii [12, 38, 57]. W odróżnieniu od wielu wolno żyjących diazotrofów, rizoziobia są zdolne do wysoko wydajnego wiązania azotu wyłącznie wtedy, gdy znajdują się w komórkach brodawki korzeniowej gospodarza roślinnego, w formie endosymbiotycznych bakteroidów [71].

\* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet M. Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin; tel. 81 537 59 72; e-mail: anna.skorupska@poczta.umcs.lublin.pl

Całkowite globalne wiązanie  $N_2$  w procesie BNF zostało oszacowane na 100–290 Tg N/rok ( $1 \text{ Tg} = 10^{12} \text{ g}$ ), w tym około 50–70 Tg N/rok stanowi azot wiązany w uprawach rolniczych [43]. BNF jest uzupełniane przez sztuczne nawożenie azotowe w ilości 85 Tg N/rok [70]. Na przemysłową produkcję nawozów azotowych stosowanych w rolnictwie zużywane jest około 50% paliw kopalnych, a azot wprowadzany do gleby w postaci sztucznych nawozów jest tylko w części (poniżej 50%) wykorzystywany przez rośliny [91]. Pozostała część jest tracona z gleby w wyniku wymywania lub mikrobiologicznej nityfikacji i denityfikacji, co może być przyczyną zanieczyszczenia środowiska. Eutrofizacja i hipoksja w ekosystemach wodnych powoduje zmniejszenie bioróżnorodności organizmów. Obecność azotanów ( $\text{NO}_3^-$ ) w zbiornikach wodnych ma również negatywny wpływ na stan powietrza atmosferycznego poprzez emisję tlenków azotu  $\text{NO}_x$  [91]. BNF jest procesem przyjaznym dla środowiska i stanowi podstawę zrównoważonego, ekologicznego rolnictwa. Uprawy bobowatych, dzięki symbiozie z rizobiami wymagają 35–60% mniej energii w porównaniu do upraw, w których stosuje się nawozy sztuczne [44]. Rośliny bobowate, poza dużym znaczeniem w produkcji wartościowej, wysokobiałkowej żywności (np. groch, fasola, soja) oraz pasz (np. koniczyna, lucerna, wyka), są również cenione, jako wysokobiałkowy zielony nawóz.

## 2. Partnerzy symbiozy

Do nawiązania efektywnej symbiozy potrzebne są dwa biologicznie zgodne organizmy, tj. bakterie zdolne do wiązania  $N_2$  oraz rośliny, zapewniające odpowiednie warunki dla tego procesu, tzn. beztlenowe środowisko i energię konieczną dla przebiegu reakcji redukcji azotu cząsteczkowego. Symbioza oznacza duże koszty energetyczne, ale także ogromne korzyści dla obu partnerów [16].

Rizobia są bakteriami heterotroficznymi, wykazującymi dużą plastyczność metaboliczną, która pozwala im przetrwać w różnych warunkach środowiskowych. Różnią się od innych mikroorganizmów glebowych tym, że bytują w dwóch formach: wolno żyjącej, saprofitycznej – w glebie, oraz symbiotycznej – w brodawkach roślin bobowatych. Rizobia to ponad 90 gatunków sklasyfikowanych w kilku rodzajach klasy  $\alpha$ -proteobakterii: *Rhizobium*, *Shinella*, *Ensifer* (wcześniej *Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Phyllobacterium*, *Azorhizobium*, *Devosia*, *Ochrobactrum*, *Methylobacterium*, *Microvirga* i *Bradyrhizobium* [93]. W ostatnich latach udokumentowano zdolność do tworzenia brodawek na korzeniach roślin bobowatych i do symbiotycznego wiązania azotu w przypadku kilku gatunków bakterii należących do klasy  $\beta$ -proteobakterii z rodzajów *Burkholderia*

i *Cupriavidus* [12, 38, 64]. Rośliny bobowate (Fabaceae), które są gospodarzami dla tej grupy rizobiów, są bardzo zróżnicowane taksonomicznie [93].

Znakiem szczególnym symbiozy jest wysoka specyficzność. Poszczególne gatunki rizobiów tworzą brodawki na określonej liczbie gatunków roślin-gospodarzy. Zgodność genetyczna pomiędzy roślinami bobowatymi i mikrosymbiontami zależy zarówno od swoistych bakterierynych sygnałów molekularnych, jak i specyficznej odpowiedzi rośliny-gospodarza [10, 66, 78]. O charakterystycznej dla rizobiów wysokiej specyficzności brodawkowania mówimy, gdy mikrosymbiont i gospodarz mają zestaw genów, który pozwala na nawiązanie efektywnej symbiozy [10]. Głównymi bakterierynymi sygnałami molekularnymi w symbiozie są czynniki Nod (NF, *Nodulation Factors*) produkowane przez rizobia w odpowiedzi na związki flawonoidowe wydzielane przez nasiona i korzenie gospodarza roślinnego [45, 71]. Wyjątkowo szeroki zakres gospodarza wykazuje gatunek *Ensifer* (*Sinorhizobium*) *fredii* NGR234 tworzący brodawki na ponad 120 rodzajach roślin motylkowatych, a także na niemotylkowatej *Parasponia andersonii* [75]. Skrajnie specyficznym gatunkiem jest *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, który zakaża tylko różne gatunki rodzaju *Trifolium* – koniczyna. Rośliny motylkowate także mogą wykazywać niską specyficzność w stosunku do mikrosymbionta, np. *Macroptilium* lub *Phaseolus* tworzą brodawki w układach symbiotycznych z kilkoma gatunkami rizobiów [71].

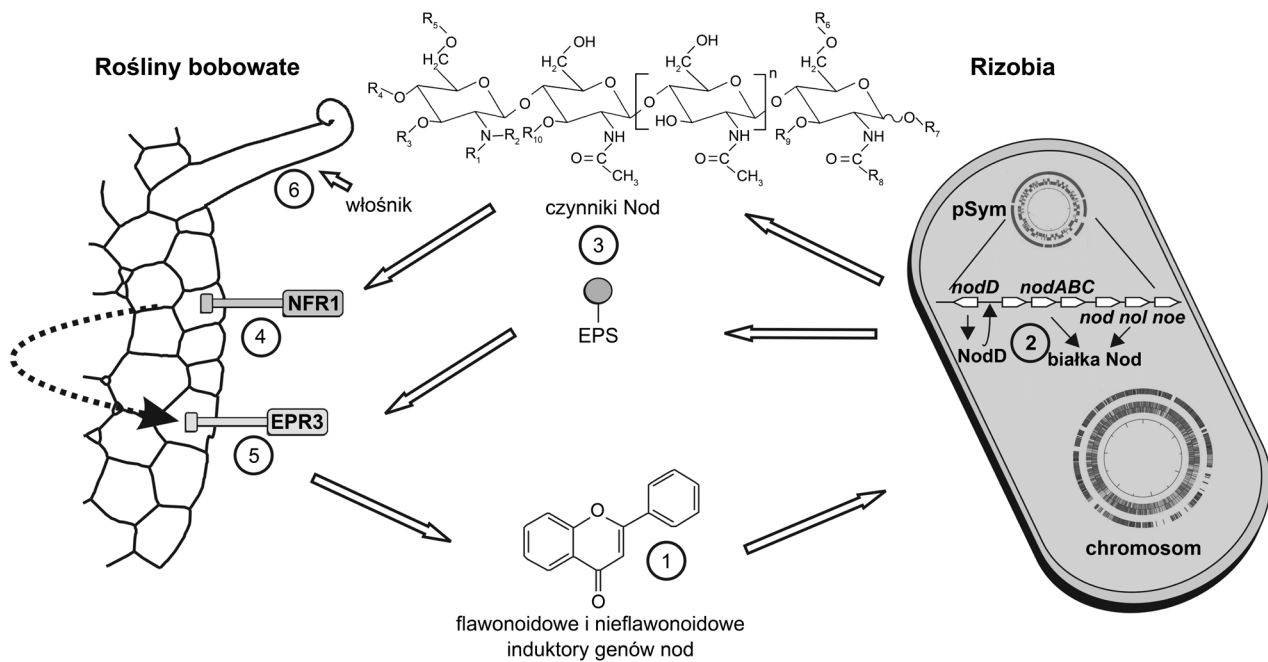
## 3. Etapy symbiozy

Nawiązanie efektywnej symbiozy pomiędzy rizobiami i rośliną jest złożonym i ściśle kontrolowanym procesem. Obejmuje skoordynowaną wymianę sygnałów pomiędzy rośliną i bakteriami, prowadzącą do stopniowego różnicowania morfologicznego rośliny i bakterii oraz dostosowania metabolizmu obu partnerów [9].

### 3.1. Inicjacja symbiozy

Pierwszym etapem infekcji jest adsorpcja rizobiów na włosnikach korzeniowych, w której biorą udział różne cząsteczki i struktury powierzchniowe obu symbiontów, takie jak: powierzchniowe białko wiążące  $\text{Ca}^{2+}$  – rikadhezyna, fimbrie bakterieryjne, lektyny roślinne oraz bakterieryjne polisacharydy, w tym fibryle celulozowe [80]. Głównymi cząsteczkami sygnałowymi zaangażowanymi w inicjację symbiozy są roślinne flawonoidy oraz czynniki Nod syntetyzowane przez rizobia [13, 52]. Flawonoidy są roślinnymi metabolitami wtórnymi, których synteza jest indukowana przez czynniki stresogenne, m.in. głód azotowy. Związki te działają jako chemoatraktanty dla rizobiów; w największej ilości





Rys. 1. Inicjacja symbiozy ryzobii z roślinami bobowatymi.

(1) wydzieliny korzeni roślin zawierające związki flawonoidowe aktywują białko NodD; (2) Białko NodD indukuje ekspresję genów *nod* odpowiedzialnych za syntezę czynnika Nod (NF); (3) czynnik Nod oraz EPS poprzez swoje receptory NFR i EPR (4 i 5) inicjuje kaskadę sygnałów prowadzących do powstania charakterystycznego zagięcia włosników korzeniowych (6) oraz powstania zawiązka brodawki korzeniowej.

są wydzielane w pobliżu wierzchołków korzeni, a ich optymalne stężenie występuje w strefie pojawiania się włosników korzeniowych w miejscu infekcji ryzobii [96]. Wydzieliny korzeni roślin motylkowatych zawierają specyficzny gatunkowo koktajl flawonoidów, a ilość i spektrum działania tych związków może różnić się w zależności od wieku i stanu fizjologicznego rośliny [96]. W dialogu molekularnym między rośliną i bakterią poza flawonoidami mogą brać udział inne metabolity roślinne, m.in. betainy (stachydryna i trygonelina), kwasy aldonowe (erytronowy i tetronowy), ksantony, proste związki fenolowe (wanilina i izowanilina) i kwas jasmonowy [13, 81]. Ze strony mikrosymbiontów na inicjację symbiozy mają wpływ, poza czynnikami Nod, także polisacharydy powierzchniowe [26, 80], białka sekrecyjne, *N*-acylowane laktony homoseryny (AHL), które pełnią funkcję cząsteczek sygnałnych w procesie *quorum sensing* oraz inne związki [11, 20, 26] (Rys. 1).

Flawonoidy produkowane przez roślinnego gospodarza aktywują geny brodawkowania (*nod*, *nodulation genes*) kompetentnych symbiontów poprzez wiązanie z białkiem regulatorowym NodD, należącym do rodziny białek regulatorowych LysR [45, 69]. Białko NodD przyłącza się do konserwowanych sekwencji DNA, tzw. kaset *nod* (*nod box*), które zidentyfikowano w regionach promotorowych indukowalnych genów *nod* [2, 10, 32]. Wiązanie NodD z DNA nie wymaga obecności flawonoidów, natomiast aktywacja promotorów genów *nod* jest możliwa wyłącznie w ich obecności [9]. Zaktywowany flawonoidem NodD indukuje syn-

tezę i wydzielanie lipochitoooligosacharydowych czynników Nod (LCO). NF są zbudowane z reszt *N*-acetylo-*D*-glukozaminy połączonych wiązaniami  $\beta$ -1,4 i modyfikowanych kwasem tłuszczowym na końcu nieredukującym. Różnice w strukturze chemicznej NF produkowanych przez różne gatunki ryzobii dotyczą długości rdzenia oligosacharydowego (dwie do sześciu reszt *N*-acetyloglukozaminy), typu kwasu tłuszczowego na końcu nieredukującym oraz liczby i typu podstawników (np. reszta acetylowa, arabinozowa, fukozyłowa, mannozyłowa, sulfonowa i in.) modyfikujących cząsteczkę w redukującym końcu NF [13, 15].

Synteza NF zachodzi na skutek działania produktów dwóch grup genów *nod*, kontrolowanych przez NodD aktywowane flawonoidem. Są to geny wspólne nodulacji (*common nodulation genes*), czyli geny operonu *nodABC* występujące niemal we wszystkich gatunkach ryzobii, odpowiedzialne za syntezę enzymów niezbędnych do tworzenia struktury rdzeniowej NF (szkielet *N*-acetyloglukozaminowy). Natomiast produkty innych genów: *nod*, *noe* i *nol* (w *E. meliloti*: *nodEF*, *nodG*, *nodH*, *nodPQ*, *nodL*) wprowadzają modyfikacje chemiczne w NF, które nadają ryzobiom specyficzność w stosunku do gospodarza [20, 71]. Wiele gatunków ryzobii produkuje więcej niż jeden typ NF (nawet do 60 różnych typów), ale dotychczas nie wykazano zależności między strukturą NF i zakresem potencjalnych roślinnych gospodarzy [45, 87]. NF są morfogenami biologicznie aktywnymi w bardzo niskich stężeniach:  $10^{-9}$ – $10^{-12}$  M, co sugeruje, że w ich percepcję

zaangażowane są receptory roślinne (NFR, *Nod Factor Receptors*) o dużym powinowactwie [31, 42, 66]. NF są rozpoznawane przez receptory typu kinaz LysM w epidermie korzenia i wyzwalają kaskadę sygnałów, która w roślinie wywołuje szereg reakcji prowadzących do utworzenia brodawki [31, 36, 76].

Specyficzność infekcji roślin bobowatych przez kompetentne mikrosymbionty jest realizowana nie tylko na wyżej opisanej drodze poprzez molekularne sygnały, jakimi są flawonoidy i bakteryjny NF, uwalniający kaskadę reakcji poprzez wysoko specyficzne roślinne receptory kinazowe typu LysM (NFR). Rozwój prawidłowo funkcjonującej brodawki, w której bakteroidy wiążą azot zależy także od struktur powierzchniowych bakterii, takich jak zewnątrzkomórkowe polisacharydy (EPS), kapsularne polisacharydy (CPS) oraz lipopolisacharydy (LPS) [26, 80]. Skład cukrów i struktura EPS jest szczepowo zróżnicowana u rizobiów, sugerując specyficzne funkcje w interakcji z roślinami bobowatymi. Mutanty bakterii pozbawione EPS lub zawierające zmienioną strukturę egzopolisacharydu indukują defektywne brodawki, w których bakterie nie są zdolne do wiązania azotu [20, 45, 80]. Ostatnio, specyficzny mechanizm działania EPS w symbiozie rizobiów z roślinami brodawkowymi przedstawili Kawaharada i wsp. [47]. Na modelu symbiozy *Lotus japonicus* – *Mesorhizobium loti* udowodniono, że roślina gospodarza może monitorować strukturę EPS wydzielanego przez bakterie na etapie inicjacji infekcji poprzez receptor NPR3. Receptor ten jest specyficzną dla EPS kinazą membranową typu LysM o dużym podobieństwie do NFR1 – receptora czynnika Nod. Co więcej, stwierdzono, że w roślinnych mutantach w NPR3 tworzących nieefektywną symbiozę domeny LysM są zmienione, wskazując na korelację zmiany w LysM ze zmianą funkcji receptora EPS. Ekspresja receptora NPR3 jest zależna od czynnika Nod. Sygnał inicjujący powstanie brodawki, jakim jest czynnik Nod, poza aktywacją całego szlaku transmisji sygnału, inicjowałby także transkrypcję receptora dla specyficznego sygnału, jakim jest bakteryjny EPS [47] [Rys. 1].

### 3.2. Rozwój brodawki

Pierwszą widoczną zmianą morfologiczną rośliny wywołaną adsorpcją bakterii na włosnikach i syntezą NF jest charakterystyczna deformacja włosników korzeniowych, tzw. „laska pasterza” (*shepherd's crook*), wynikająca z depolaryzacji błony cytoplazmatycznej, szybkich fluktuacji poziomu wewnątrzkomórkowego  $Ca^{2+}$  we włosnikach (*calcium spiking*), przebudowy cytoszkieletu włosnika i tworzenia nici preinfekcyjnej w zdeformowanym włosniku [40, 66]. Bakterie schwytane w kieszeń powstałą w wyniku skręcenia włosnika namnażają się produkując znaczną ilość NF. Powodują miejscową hydrolizę ścian i wpuklenie błony komór-

kowej, co inicjuje powstanie nici infekcyjnej (IT, *infection thread*) – rurkowatej struktury pochodzenia roślinnego wypełnioną dzielącymi się bakteriami [28]. Nić infekcyjna początkowo rozwija się w zainfekowanym włosniku korzeniowym, a następnie przemieszcza się poprzez kilka warstw komórek kory korzenia. Bakterie są uwalniane z nici infekcyjnej i przenoszone w procesie endocytozy do komórek powstałego zawiązka brodawki korzeniowej (primordium) [28, 63]. W czasie powstawania brodawki następuje zahamowanie aktywności systemu immunologicznego rośliny tworzącego reaktywne formy tlenu, następują zaburzenia przepływu auksyn w korzeniach oraz indukcja genów roślinnych kodujących noduliny, czyli białka istotne we wszystkich etapach symbiozy [28, 66]. Czynniki Nod wpływają również na wykształcenie dojrzałego biofilmu rizobiowego na korzeniach roślin bobowatych [27].

Opisano dwa główne typy infekcji roślin motylkowatych wymagające udziału NF [20, 57]: zakażenie poprzez włosniki korzeniowe, które zachodzi zwykle u roślin klimatu umiarkowanego oraz penetracja korzenia rośliny w wyniku międzykomórkowej infekcji w miejscu uszkodzenia epidermy (*crack entry*), np. w miejscu powstawania korzenia bocznego u tropikalnych roślin motylkowatych (*Sesbania rostrata*, *Neptunia* sp.). Ten mechanizm infekcji jest uważany za starszy ewolucyjnie [82]. Wyjątek stanowi wodna roślina motylkowata *Aeschynomene afraspera* zakażana przez szczep *Bradyrhizobium* sp. ORS278, w której zaobserwowano infekcję niezależną od NF i bez tworzenia nici infekcyjnej, co uznano za najstarszy ewolucyjnie typ infekcji [33] [Rys. 1].

### 3.3. Typy brodawek korzeniowych

Czynniki Nod aktywują komórki kory korzenia do podziałów i tworzenia zawiązka brodawki (*nodule primordium*), który lokalizuje się poniżej miejsca infekcji bakteryjnej i daje początek funkcjonalnej brodawce [62]. Pod względem morfologicznym i anatomicznym wyróżniamy dwa główne typy brodawek: zdeterminowane i niezdeterminowane, różniące się trwałością merystemów, oraz brodawki kołnierzykowate, dzielące własności obydwu typów brodawek [39, 87, 92]. W zależności od gatunku rośliny gospodarza, brodawki powstają w wewnętrznej (brodawki niezdeterminowane) lub zewnętrznej korze korzenia (brodawki zdeterminowane) [73]. Nici infekcyjne rosną w kierunku zawiązka brodawki i po dotarciu do niego uwalniają rizobia w tzw. kropelkach infekcyjnych, w których bakterie przekształcają się w wiążące azot bakteroidy [73]. Struktury powstałe w podobnym do endocytozy procesie, zawierające jeden lub kilka bakteroidów otoczonych błoną peribakteroidalną pochodzenia roślinnego, są nazywane symbiosomami i funkcjonują jako

organelle wiążące azot, zależne od energii i związków węgla dostarczanych przez rośliny [89] [Tabela I].

Brodawki niezdeteminowane charakteryzują się trwałym dystalnym merystemem, którego ciągła aktywność sprawia, że mają one kształt cylindryczny, gradientowe strefy rozwojowe i zawierają heterogenną populację endosymbiontów [2, 28]. Za niezakażoną strefą merystematyczną (strefa I) znajdują się kolejno: II – strefa zakażenia, w której rizobia są uwalniane z nici infekcyjnych do komórek roślinnych; II–III – strefa przejściowa, gdzie komórki roślinne zawierające bakteroidy osiągają ostateczny stopień zróżnicowania; III – strefa, w której dojrzałe symbiosomy aktywnie wiążą azot; strefa IV – w której terminalnie wyróżnicowane i niewiążące azotu bakteroidy oraz komórki roślinne są degradowane. Wyróżnia się także strefę V – saprofityczną, gdzie obumarłe komórki roślinne są kolonizowane przez pałeczkowate rizobia pochodzące głównie z nici infekcyjnych. Te bakterie wracają do saprofitycznego bytowania w glebie [88, 90, 98].

Brodawki zdeterminowane nie wykształcają trwałego merystemu, mają kształt kulisty i nie wykazują gradientu rozwojowego. Różnicowanie się zainfekowanych komórek gospodarza jest synchroniczne i dojrzałe brodawki zawierają komórki symbiotyczne z homogeną populacją bakteroidów wiążących azot. Bakteroidy nie tracą swojej żywotności i są zdolne do rozmnażania po degradacji brodawki [62]. W obu typach brodawek wzrost i różnicowanie zainfekowanych komórek roślinnych skutkuje wzrostem brodawki. W brodawkach niezdeteminowanych powstają ekstremalnie powiększone komórki symbiotyczne, poliploidalne na skutek powtarzających się cykli endoreduplikacji genomu [85].

Wewnątrz brodawek rizobia ulegają fizjologicznemu i morfologicznemu różnicowaniu w wiążące azot bakteroidy. Wielkość i kształt bakteroidów zależą głównie od rośliny oraz, w pewnym stopniu, od genotypu

rizobiów [62, 65]. W przypadku niektórych gatunków roślin motylkowatych, takich jak koniczyna (*Trifolium* spp.), wyka (*Vicia* spp.) czy lucerna (*Medicago sativa*), zróżnicowanie bakteroidów jest terminalne, co jest spowodowane ekstremalnym zwielokrotnieniem genomu i zahamowaniem podziału bakterii [67]. Możliwość rozwoju następnych wiążących azot bakteroidów oraz populacji glebowej zakażającej kolejne pokolenia roślin zależy od rizobiów zasiedlających brodawkę, zlokalizowanych w niciach infekcyjnych, które nie zostały zróżnicowane do bakteroidów [67, 88]. W gatunkach takich jak groch (*Pisum sativum*), soja (*Glycine max*) czy komonica (*Lotus* sp.), tworzących brodawki zdeterminowane, wielkość, kształt i żywotność bakteroidów jest zbliżona do wolno żyjących rizobiów. Genomy tych komórek symbiotycznych nie są zwielokrotnione i bakterie mogą ulegać normalnym podziałom komórkowym, gdy znajdują się poza brodawką [67, 88] (Tab. I).

Ostatnie badania sugerują, że nieodwracalne różnicowanie bakteroidów jest charakterystyczne tylko dla bobowatych z grupy IRLC (*inverted-repeat-lacking clade*) i nie zależy od typu brodawek [48]. W modelu *Medicago truncatula* wykazano, że ostateczne różnicowanie bakteroidów jest wymuszane przez białka roślinne specyficzne dla brodawek, bogate w cysteinę (NCR, *nodule-specific cysteine-rich peptides*) [39, 90]. W genomie *Medicago truncatula* zidentyfikowano ponad 600 genów dla NCR, które wykazują niewielkie wzajemne podobieństwo sekwencji nukleotydowej, lecz zawsze mają sześć cystein w 160 aminokwasowym peptydzie, N-końcową sekwencję sygnałną potrzebną dla transportu peptydu do symbiosomu oraz wiązanie dwusiarczkowe między cysteinami. Geny dla NCR ulegają ekspresji tylko w czasie symbiozy, a peptydy zostały zidentyfikowane w bakteroidach [39, 61]. NCR mają właściwości podobne do przeciwbakteryjnych defensyn, blokujących podziały komórek bakteryjnych, co

Tabela I  
Charakterystyka brodawek korzeniowych tworzonych w symbiozie rizobiów z roślinami bobowatymi

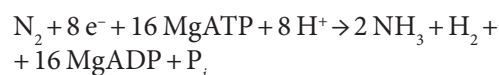
	Brodawki o nietrwałym merystemie (zdeterminowane)	Brodawki o trwałym merystemie (niezdeterminowane)
Rośliny bobowate (Fabaceae)	soja ( <i>Glycine max</i> ), fasola ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ), komonica ( <i>Lotus japonicus</i> )	lucerna ( <i>Medicago sativa</i> ), groch ( <i>Pisum sativum</i> ), koniczyna ( <i>Trifolium</i> sp.), wyka ( <i>Vicia</i> sp.)
Mikrosymbionty	<i>Bradyrhizobium</i> sp., <i>R. phaseoli</i> , <i>R. etli</i> , <i>M. loti</i>	<i>E. meliloti</i> , <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> , bv. <i>trifolii</i>
Kształt brodawki	kulisty	cylindryczny/rozgałęziony
Miejsce początkowych podziałów komórkowych	kora zewnętrzna lub środkowa korzenia	kora wewnętrzna
Transport związków N	ureidy	amidy
Bakteroidy	pałeczka wielkości (1–2 μm),	powiększone (5–10 μm), rozgałęzione
Zawartość DNA w komórkach rośliny	1C/2C	poliploid, średnio 24C
Terminalne różnicowanie	nie	tak
Zdolność do rozmnażania	wysoka	niska

jest przyczyną endoreduplikacji genomu i zmiany kształtu bakteroidów. Eksperymenty *in vitro* z izolowanymi NCR potwierdziły ich kluczową rolę w różnicowaniu bakteroidów oraz ich aktywność antybakteryjną [39, 90]. Geny kodujące białka NCR występują również w innych motylkowatych z grupy IRLC, tworzących terminalnie zróżnicowane bakteroidy, natomiast nie wykryto ich w roślinnych gospodarzach, w których nie dochodzi do ostatecznego zróżnicowania bakteroidów [1, 48]. W rizobiach, za transport peptydów NCR kontrolujących różnicowanie i przetrwanie bakteroidów wewnątrz komórek roślinnych, odpowiadają transportery ABC, takie jak białko BacA, które występuje tylko w rizobiach infekujących motylkowate typu IRLC [32, 63]. BacA prawdopodobnie pełni także funkcję ochronną w stosunku do rizobiów redukując antybakteryjne działanie peptydów NCR [39]. Wprawdzie trudno zrozumieć, dlaczego niektóre rośliny bobowate wykształciły mechanizm terminalnego różnicowania wiążących azot bakteroidów, ale stwierdzono, że ten typ bakteroidów bardziej wydajnie wiąże azot niż bakteroidy terminalnie niezróżnicowane [67].

#### 4. Wiązanie azotu

Redukcja azotu cząsteczkowego  $N_2$  do amoniaku jest główną funkcją rizobiów w symbiozie. Bakterie, które ukończyły program różnicowania i zostały zamknięte wewnątrz błony funkcjonalnego symbiosomu, znajdują się w środowisku mikroaerofilnym, w którym zachodzi indukowana ekspresja genów kodujących enzymy kompleksu nitrogenazy, który jest odpowiedzialny za proces wiązania azotu [45]. Środowisko mikroaerofilne jest tworzone w wyniku działania kilku mechanizmów. W komórkach brodawki przepuszczalność błon komórkowych jest kontrolowana przez barierę dyfuzyjną dla tlenu, regulowaną przez wrażliwy na tlen dwuskładnikowy system białek FixJ-FixL, które kontrolują ekspresję NifA, głównego regulatora procesu wiązania azotu [19, 32]. Z kolei dzięki wysokiej ekspresji roślinnych genów dla leghemoglobiny, stanowiącej nawet 25% białek rozpuszczalnych w komórkach brodawki, stężenie  $O_2$  w strefie wiązania azotu utrzymuje się na poziomie od 3 do 22 nM [32, 68]. W ochronie nitrogenazy przed tlenem ważna jest również struktura brodawki, a zwłaszcza warstwa ciasno upakowanych komórek kory stanowiących powierzchnię brodawki, która tworzy barierę dla dyfuzji tlenu i chroni bakteroidy zlokalizowane w strefie centralnej [19].

W procesie wiązania azotu, cząsteczkowy  $N_2$  jest redukowany w wielokrotnych reakcjach transferu elektronów w kompleksie nitrogenazy, w wyniku których powstaje amoniak i jest uwalniany wodór [95]. Bakteryjny kompleks nitrogenazy katalizuje reakcję:



Rizobia zawierają najbardziej powszechną formę nitrogenazy – nitrogenazę molibdenową. Mo-nitrogenaza ma dwie niekorzystne właściwości: duże wymagania energetyczne z minimalną stechiometrią 16 moli ATP na każdą zredukowaną cząsteczkę  $N_2$  oraz bardzo dużą wrażliwość na tlen, która stoi w sprzeczności ze ścisłym tlenowym metabolizmem rizobiów [57]. Kompleks nitrogenazy jest złożony z dwóch głównych funkcjonalnych podjednostek: reduktazy dinitrogenazy NifH (białko Fe, azoferredoksyna) o masie cząsteczkowej ok. 60 kDa oraz dinitrogenazy NifD/NifK, heterotetramerycznego białka (białko Mo-Fe, molibdoferredoksyna) o masie cząsteczkowej ok. 240 kDa [79]. Do ekspresji i aktywności nitrogenazy wymagana jest ponadto obecność kilkunastu białek, kodowanych przez geny *nif* tworzące kilka operonów [19, 57, 99]. Dla porównania, u wolno żyjących diazotrofów *Klebsiella pneumoniae* aktywność nitrogenazy zależy od grupy 20 genów, w *S. meliloti* i *R. leguminosarum* bv. *viciae*, poza strukturalnymi genami kodującymi reduktazę dinitrogenazy (*nifH*) i dinitrogenazę (*nifDK*), do istotnych genów *nif* należą: *nifEN*, *nifB*, kodujące odpowiednio prekursor Fe-S i kofaktor Fe-Mo, oraz regulatorowy gen *nifA* [19, 57]. Dodatkowo, w symbiotyczne wiązanie azotu w rizobiach są zaangażowane geny *fix* (*fixation*), m.in. *fixL*, *fixJ* oraz *fixK*, kodujące dwuskładnikowy system regulatorowy FixL/FixJ oraz regulatorowe białko FixK [4].

Symbiotyczne wiązanie azotu jest mutualistycznym związkiem między bakterią i rośliną [97], w którym wysoka aktywność nitrogenazy utrzymuje się poprzez zapewnienie bakteroidom odpowiedniego stężenia tlenu i stałego źródła energii w formie kwasów dikarboksylowych pochodzących z fotosyntezy [32, 74]. Produktem metabolicznym reakcji katalizowanej przez nitrogenazę jest amoniak, który jest dostarczany roślinie zarówno bezpośrednio przez kanały amonowe w błonie komórek roślinnych, jak i pośrednio, w formie aminokwasów: alaniny, glutaminy i glutaminianu syntetyzowanych przez enzymy bakteryjne. W brodawkach zdeterminowanych duże, zainfekowane bakteriami komórki roślinne sąsiadują z małymi, niezakażonymi komórkami wyspecjalizowanymi w dalszej asymilacji azotu, poprzez konwersję aminokwasów do ureidów, które są eksportowane z brodawki do rośliny [32, 97].

#### 5. Genomy rizobiów

Ryzosfera roślin jest dynamicznym środowiskiem, w którym dystrybucja zasobów zmienia się w czasie i przestrzeni, a korzenie roślin, poprzez wydzielanie różnorodnych związków (aminokwasów, białek, kwasów organicznych, cukrów, witamin, związków aromatycz-

nych i innych metabolitów wtórnych), wywierają silną presję selekcyjną i mają duży wpływ na rozwój i funkcjonowanie mikroorganizmów glebowych [7]. Rizobia, jako bakterie glebowe, muszą być dobrze przystosowane do zmiennego środowiska, gdzie zarówno związki odżywcze, zawartość tlenu, jak i różnorodne czynniki stresowe bezpośrednio wpływają na ich wzrost. Potencjał adaptacyjny rizobiów jest znacznie zwiększony dzięki dużym, wieloczęściowym genomom, typowym również dla innych glebowych  $\alpha$ -proteobakterii [22, 46]. Wieloreplikonowa struktura genomu, w którym informacja genetyczna jest podzielona pomiędzy różne replikony, wydaje się być korzystna dla bakterii. Jedną z korzyści wynikających z takiej organizacji genomów może być krótszy czas replikacji całego genomu, co pozwala na utrzymanie większego genomu przy zachowaniu wysokiego tempa podziałów komórkowych [21, 37].

Genomy rizobiów zwykle składają się z jednego dużego chromosomu i różnej liczby plazmidów, których wielkość waha się od kilku kbp do ponad 2 Mbp [3, 30, 34, 35, 77, 100]. Wyjątkiem są wolno rosnące bradyrizobia: np. nie wykryto replikonów pozachromosomalnych w *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, który ma największy spośród zsekwencjonowanych genomów rizobiowych (ok. 9,1 Mbp). Podczas gdy wolno rosnące bradyrizobia nie mają plazmidów, w genomach szybko rosnących rizobiów są one powszechne i mogą stanowić od 30% do niemal 50% wielkości genomu [54, 58]. Genomy blisko spokrewnionych gatunków *R. etli* oraz *R. leguminosarum* bv. *trifolii* i bv. *viciae* mają podobną organizację i składają się z chromosomu oraz kilku dużych plazmidów [35, 77, 100]. *R. etli* CFN42 ma sześć plazmidów o wielkości od 184 kbp do 643 kbp. *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 ma również sześć plazmidów o wielkości 151 kbp – 870 kbp [100]. Podobną strukturę genomową mają zsekwencjonowane szczepy *R. leguminosarum* bv. *trifolii* WSM1325 oraz WSM2304 [77].

Kompletne sekwencje genomowe rizobiów wykazały, że genomy rizobiów są złożone z elementów rdzeniowych (*core*) i dodatkowych (*accessory*) [14, 41, 51, 100]. Chromosomy stanowią stabilny rdzeń genomu, zawierający głównie geny podstawowego metabolizmu (*housekeeping genes*) niezbędne do funkcjonowania komórki bakteryjnej. Replikony te są konserwowane pod względem zawartości genów (syntenia), a w blisko spokrewnionych gatunkach zachowywany jest również układ genów (kolinearność) [49, 50]. Plazmidy, przeciwnie do chromosomu, są zróżnicowane, zarówno pod względem liczby i wielkości replikonów, jak i zawartości genów w poszczególnych replikonach. Niosą one głównie geny dodatkowe, często nieistotne dla przeżycia komórek, kodujące m.in. systemy transportu oraz liczne szlaki kataboliczne, przyczyniające się do adaptacji bakterii do różnorodnego i zmiennego środowiska glebowego. Plazmidy symbiotyczne są wyposażone

w geny odpowiedzialne za brodawkowanie i wiązanie azotu, lecz nie są istotne dla podstawowego metabolizmu komórek [30, 35, 100].

## 6. Chromidy i megaplazmidy

Większość genów rdzeniowych istotnych dla przeżycia komórek lokalizuje się w chromosomie, tylko niektóre z nich zidentyfikowano w plazmidach rizobiów. Takie replikony plazmidowe, niezbędne dla wzrostu bakterii i zawierające cechy zarówno plazmidów jak i chromosomów, nazwano chromidami lub „chromosomami dodatkowymi” [41, 51]. Chromidy są często większe od plazmidów współwystępujących w komórce, ale znacznie mniejsze od chromosomu. Uważa się je za elementy genetyczne specyficzne dla rodzaju (mogące wpływać na różnice międzygatunkowe w obrębie rodzaju) i starsze ewolucyjnie niż megaplazmidy. Skład nukleotydowy chromidów, jak również częstość wykorzystywania kodonów (*codon usage*) w zlokalizowanych na nich sekwencjach kodujących są zbliżone do chromosomu, podczas gdy systemy replikacji i partycji są typu plazmidowego [41]. Chromidy wykazują także wysoką zmienność genetyczną, która wynika głównie z małej liczby genów metabolizmu podstawowego zlokalizowanych w tych replikonach [29].

Petersen i wsp. [72] zdefiniowali chromidy, które mogą być wyeliminowane z komórki w warunkach laboratoryjnych, lecz są niezbędne do przeżycia w środowisku naturalnym, jako istotne *sensu lato*. Chromidy, których nie można wyeliminować ze względu na obecność przynajmniej jednego genu z uniwersalnego minimalnego zestawu genów są istotne *sensu stricto*. Podobnie, Dziewit i wsp. [21] sklasyfikowali chromidy bakteryjne do dwóch typów: chromidy główne (podstawowe, *primary*), niezbędne do utrzymania przy życiu gospodarza bakteryjnego, oraz chromidy wtórne (drugorzędne, *secondary*), które są niezbędne wyłącznie w pewnych warunkach środowiskowych i które są prawdopodobnie ewolucyjnie młodsze.

Przykładami chromidów w genomach rizobiów są dwa największe plazmidy *R. leguminosarum* bv. *viciae* – pRL12 i pRL11, o wysokiej zawartości G+C, zbliżonej do chromosomu, zawierające niektóre geny rdzeniowe genomu. Blisko spokrewnione z nimi replikony z niemal identycznymi systemami replikacyjnymi wykryto także w innych zsekwencjonowanych genomach *R. leguminosarum* WSM1325 i WSM2304, *R. etli* CFN42, CIAT 625 i Mim1 [41, 58]. Cechy chromidów mają również mniejsze replikony, takie jak pRL9 oraz p42b [41].

Plazmidy i chromidy  $\alpha$ -proteobakterii zwykle zawierają systemy replikacji i partycji typu *repABC* [5, 54, 55, 56, 58]. Systemy replikacyjne typu *repABC* znajdują się także w niektórych chromosomach drugorzędowych

rizobiów i innych bakterii glebowych [29, 72, 100]. Szczególną cechą replikonów *repABC* jest połączenie funkcji replikacji i segregacji w obrębie jednej kasety [14, 58, 59]. W tego typu replikonach wszystkie elementy zaangażowane zarówno w replikację, partycję oraz niezgodność plazmidów występują w obrębie pojedynczej jednostki transkrypcyjnej – operonu *repABC*. Operon *repABC* składa się z trzech genów, ulokowanych zawsze w tej samej kolejności, kodujących białka (RepA, RepB i RepC) oraz genu kodującego mały antysensowny RNA (ctRNA), który jest zlokalizowany w regionie międzygenowym *repB-repC* i transkrybowany w kierunku przeciwnym do kierunku transkrypcji genów *repABC* [94]. Białko RepC jest istotne dla inicjacji replikacji plazmidów [5, 34, 55, 56, 58].

Na megaplazmidach rizobiów zlokalizowane są zwykle geny odpowiedzialne za interakcje symbiotyczne z roślinami motylkowatymi (tzw. plazmidy symbiotyczne – pSym); tylko w niektórych gatunkach geny te tworzą tzw. wyspy symbiotyczne (GI, *genomic island*), lub też są rozproszone w genomie [23, 24, 25, 30]. W *Rhizobium* spp. większość genów symbiotycznych znajduje się w plazmidach, podczas gdy w *Mesorhizobium loti* geny odpowiedzialne za symbiozę tworzą wyspę genomową o wielkości ok. 500 kpb [84]. W *S. fredii* NGR234 operony *nif* i *nod* są zlokalizowane w plazmidzie, zaś geny *fix* w chromosomie [25]. Regiony symbiotyczne genomów bakterii rzędu *Rhizobiales* są strukturami mozaikowatymi, które ulegały częstym rekombinacjom, horyzontalnemu transferowi i transpozycji [8, 14, 25, 59]. Poza pSym, inne części genomów rizobiowych, szczególnie plazmidy niesymbiotyczne, mogą wpływać na wydajność symbiotyczną bakterii, kodując dodatkowe czynniki, takie jak białka i polisacharydy powierzchniowe komórki, które wpływają na konkurencyjność i poziom wiązania azotu [49, 53, 83].

W replikonach pozachromosomalnych rizobiów zidentyfikowano geny zaangażowane w chemotaksję, transport metabolitów, asymilację różnych źródeł węgla, biosyntezę witamin, takich jak biotyna, tiamina czy pantotenu, syntezę bakteriocyn, melaniny, syntezę autoinduktorów *quorum sensing*, systemów modyfikacji-restrykcji oraz białek opiekuńczych [18, 20, 39, 58].

Replikony pozachromosomalne mogą istotnie przyczynić się do kształtowania fenotypu całego gatunku, którego genomy tworzą tzw. pangénom [6, 53]. Koncepcja pangénomu powstała dla zaznaczenia istotności różnic między genomami poszczególnych szczepów, które wspólnie kształtują gatunek [29, 86]. W pangenie można wyróżnić „genom rdzeniowy” obejmujący te geny, które występowały we wszystkich zsekwencjonowanych szczepach danego gatunku oraz „genom dodatkowy” reprezentujący wszystkie pozostałe geny obecne w pewnych, ale nie wszystkich badanych szczepach, a także geny specyficzne dla danego szczepu [6, 72, 86].

Wielkość pangénomu prawdopodobnie odzwierciedla różnice w niszach ekologicznych i stylu życia poszczególnych gatunków [6].

## 7. Plastyczność genomów rizobiów

Rizobia mogą włączać do swoich genomów dodatkowe elementy genetyczne m.in. w wyniku horyzontalnego transferu genów (HGT, *horizontal gene transfer*), co wpływa zarówno na stabilność ewolucyjną genomu wymaganą do utrzymania podstawowych funkcji komórki, jak i na jego plastyczność potrzebną do szybkiej adaptacji do nowych nisz [23, 25]. Obcy DNA jest pobierany za pośrednictwem plazmidów, fagów lub ruchomych elementów genetycznych, takich jak transpozony, czy wyspy genomowe. Wyspy genomowe są rozpoznawane w genomie ze względu na odmienny skład zasad (zawartość G+C) w porównaniu do genomu gospodarza, jak również odmienną częstość wykorzystywania kodonów [34, 35]. Obecność w genomach DNA pochodzącego z innych bakterii, nazywana mozaikowością genomu, uwidacznia złożoność ich historii ewolucyjnej [35].

Plastyczność i niestabilność genomów rizobiowych wynika ponadto z obecności powtórzonych sekwencji DNA oraz złożonej organizacji genomów. Profile plazmidowe rizobiów są stosunkowo stałe, jednakże mogą zachodzić trudne do obserwacji, częściowe delecje plazmidów, przypadki rekombinacji i rearanzacji plazmidów, co może z kolei pociągać za sobą zmiany w metabolizmie bakterii [60]. Dowodem znacznej zmienności i rearanzacji plazmidów jest obecność całych kontigów podobnych genów w replikonach plazmidowych w spokrewnionych gatunkach bakterii [49, 50, 53]. Mimo znacznej plastyczności genomów rizobiów, zaobserwowano równocześnie względnie wysoką stabilność regionów symbiotycznych [58].

Zaproponowano kilka hipotez, które próbują uzasadnić zalety występowania wieloreplikonowych genomów: 1) podział genomu może wpływać na skrócenie czasu replikacji i tym samym potencjalnie umożliwiać szybszy wzrost komórek; 2) wieloczęściowe genomy mogą ułatwiać kontrolę tzw. dawki genu i poziomu jego ekspresji; 3) mogą umożliwiać dalszą ekspansję genomu, gdy chromosom osiąga swoją maksymalną wielkość, lokując część materiału genetycznego w plazmidach [17]. Wieloczęściowe genomy umożliwiają podział funkcjonalny genów pomiędzy poszczególne replikony, co jest szczególnie widoczne w bakteriach, które wchodzi w interakcje z organizmem gospodarza [17]. Geny kodujące cechy adaptacyjne znajdują się w genomach bakteryjnych głównie w tzw. strefach plastyczności, które zawierają elementy mobilne i są wysoce zmienne w poszczególnych szczepach. Dzięki fizycznemu oddzieleniu genów

podstawowego metabolizmu (chromosom) od genów zaangażowanych w interakcje z otaczającym środowiskiem (plazmidy), poziom zmian ewolucyjnych genów adaptacyjnych może być zwiększony w istotny sposób, co prawdopodobnie wyjaśnia sukces ewolucyjny wielu gatunków  $\alpha$ -proteobakterii [22].

## 8. Podsumowanie

Symbioza roślin bobowatych z rizobiami, w której bakterie redukują azot atmosferyczny, ma duże znaczenie ekologiczne i rolnicze; pozwala na znaczne zredukowanie ilości nawozów azotowych w uprawach roślin ważnych dla gospodarki i jest przyjazna dla środowiska. W przedstawionym przeglądzie literatury, obok opisu kolejnych etapów rozwoju symbiozy, chcieliśmy zwrócić szczególną uwagę na nowe odkrycia, jakimi są:

- 1) identyfikacja mikrosymbiontów należących do klasy  $\beta$ -proteobakterii wiążących wydajnie azot;
- 2) opisanie rizobiów, które nie wymagają do inicjacji symbiozy czynnika Nod;
- 3) odkrycie dużej klasy roślinnych, bogatych w cysteinę peptydów antybakteryjnych NCR, decydujących o terminalnym zróżnicowaniu bakteroidów tworzonych przez rośliny z grupy IRLC;
- 4) poznanie mechanizmu działania bakteryjnego EPS na inicjację symbiozy poprzez specyficzny receptor typu kinazy LysM. To ostatnie odkrycie stanowi ważną perspektywę dla zrozumienia roli polisacharydów w transmisji sygnałów komórkowych w wielu procesach, nie tylko w bakteriach.

Druga część artykułu dotyczy genetycznych uwarunkowań symbiozy. Genomy rizobiów są duże i zwykle podzielone na kilka replikonów: chromosom i duże plazmidy, w tym plazmidy o cechach chromosomów, nazwane chromidami. Megaplazmidy, dzięki dużemu ładunkowi genetycznemu wpływają znacząco nie tylko na kształtowanie symbiozy, lecz także na cały metabolizm komórki. Ta zróżnicowana architektura genomów rizobiów, zwłaszcza plastyczność plazmidów, przyczyniła się do zwiększenia zdolności adaptacyjnych rizobiów w zmiennym środowisku glebowym, co z kolei pozwoliło na skuteczne konkurowanie z innymi mikroorganizmami. Zwiększone możliwości adaptacyjne rizobiów mogły przypuszczalnie doprowadzić do rozszerzenia swoistości interakcji symbiotycznych z partnerami roślinnymi, co jest korzystne zarówno dla środowiska, jak i dla rolnictwa.

## Piśmiennictwo

1. Alunni B., Kevei Z., Redondo-Nieto M., Kondorosi A., Mergaert P., Kondorosi E.: Genomic organization and evolutionary insights on *GRP* and *NCR* genes, two large nodule-specific gene

- families in *Medicago truncatula*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **20**, 1138–1148 (2007)
2. Barnett M.J., Fisher R.F.: Global gene expression in the rhizobial-legume symbiosis. *Symbiosis*, **42**, 1–24 (2006)
3. Barnett M.J., Long S.R. i wsp.: Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9883–9888 (2001)
4. Barnett M.J., Kahn M.L.: pSymA of *Sinorhizobium meliloti*: nitrogen fixation and more (w) Genomes and Genomics of Nitrogen-fixing Organisms, red. R. Palacios, W.E. Newton, Springer, Dordrecht, 2005, s. 113–132
5. Bartosik D., Baj J., Włodarczyk M.: Molecular and functional analysis of pTAV320, a *repABC*-type replicon of the *Paracoccus versutus* composite plasmid pTAV1. *Microbiology*, **144**, 3149–3157 (1998)
6. Bentley S.: Sequencing the species pan-genome. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 258–259 (2009)
7. Bertin C., Yang X., Weston L.A.: The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil*. **256**, 67–83 (2003)
8. Black M., Moolhuijzen P., Chapman B., Barrero R., Howieson J., Hungria M., Bellgard M.: The genetics of symbiotic nitrogen fixation: comparative genomics of 14 rhizobia strains by resolution of protein clusters. *Genes*, **3**, 138–166 (2012)
9. Brencic A., Winans S.C.: Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**, 155–194 (2005)
10. Broughton W.J., Jabbouri S., Perret X.: Keys to symbiotic harmony. *J. Bacteriol.* **182**, 5641–5652 (2000)
11. Brown C.M., Dilworth M.J.: Ammonia assimilation by rhizobium cultures and bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* **86**, 39–48 (1975)
12. Chen W.M., Moulin L., Bontemps C., Vandamme P., Béna G., Boivin-Masson C.: Legume symbiotic nitrogen fixation by  $\beta$ -proteobacteria is widespread in nature. *J. Bacteriol.* **185**, 7266–7272 (2003)
13. Cooper J.E.: Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *J. Appl. Microbiol.* **103**, 1355–1365 (2007)
14. Crossman L.C., González V. i wsp.: A common genomic framework for a diverse assembly of plasmids in the symbiotic nitrogen fixing bacteria. *PLoS One*, **3**, e2567 (2008)
15. D'Haese W., Holsters M.: Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology*, **12**, 79R–105R (2002)
16. Denison R.F., Kiers E.T.: Life histories of symbiotic rhizobia and mycorrhizal fungi. *Curr. Biol.* **21**, R775–785 (2011)
17. diCenzo G.C., MacLean A.M., Milunovic B., Golding G.B., Finan T.M.: Examination of prokaryotic multipartite genome evolution through experimental genome reduction. *PLoS Genet.* **10**, e1004742 (2014)
18. Ding H., Yip C.B., Geddes B.A., Oresnik I.J., Hynes M.F.: Glycerol utilization by *Rhizobium leguminosarum* requires an ABC transporter and affects competition for nodulation. *Microbiology*, **158**, 1369–1378 (2012)
19. Dixon R., Kahn D.: Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 621–631 (2004)
20. Downie J.A.: The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 150–170 (2010)
21. Dziewit L., Czarnecki J., Wibberg D., Radlinska M., Mrozek P., Szymczak M., Schlüter A., Pühler 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)

22. 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)
23. Finan T.M.: Evolving insights: symbiosis islands and horizontal gene transfer. *J. Bacteriol.* **184**, 2855–2856 (2002)
24. Finan T.M., Pühler A. i wsp.: The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N<sub>2</sub>-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9889–9894 (2001)
25. Flores M., Palacios R. i wsp.: Diversification of DNA sequences in the symbiotic genome of *Rhizobium etli*. *J. Bacteriol.* **187**, 7185–7192 (2005)
26. Frayse N., Couderc F., Poinso V.: Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* **270**, 1365–1380 (2003)
27. Fujishige N.A., Lum M.R., De Hoff P.L., Whitelegge J.P., Faull K.F., Hirsch A.M.: Rhizobium common *nod* genes are required for biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **67**, 504–515 (2008)
28. Gage D.J.: Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 280–300 (2004)
29. Galardini M., Biondi E.G. i wsp.: Exploring the symbiotic pangenome of the nitrogen-fixing bacterium *Sinorhizobium meliloti*. *BMC Genomics*, **12**, 235 (2011)
30. Galibert F., Batut J. i wsp.: The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science*, **293**, 668–672 (2001)
31. Geurts R., Bisseling T.: *Rhizobium* Nod factor perception and signalling. *Plant Cell*, **14 Suppl**, S239–S249 (2002)
32. Gibson K.E., Kobayashi H., Walker G.C.: Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annu. Rev. Genet.* **42**, 413–441 (2008)
33. Giraud E., Sadowsky M. i wsp.: Legumes symbioses: absence of *nod* genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science*, **316**, 1307–1312 (2007)
34. González V., Dávila G. i wsp.: Conserved symbiotic plasmid DNA sequences in the multireplicon pangenomic structure of *Rhizobium etli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 1604–1614 (2010)
35. González V., Dávila G. i wsp.: The partitioned *Rhizobium etli* genome: genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 3834–3839 (2006)
36. Gough C., Jacquet C.: Nod factor perception protein carries weight in biotic interactions. *Trends Plant Sci.* **18**, 566–574 (2013)
37. Guo X., Flores M., Mavingui P., Fuentes S.L., Hernández G., Dávila G., Palacios R.: Natural genomic design in *Sinorhizobium meliloti*: novel genomic architectures. *Genome Res.* **13**, 1810–1817 (2003)
38. Gyaneshwar P., James E.K. i wsp.: Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. *Mol. Plant Microbe Interact.* **24**, 1276–1288 (2011)
39. Haag A.F., Arnold M.F., Myka K.K., Kerscher B., Dall'Angelo S., Zanda M., Mergaert P., Ferguson G.P.: Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*-legume symbiosis. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**, 364–383 (2013)
40. Harris J.M., Wais R., Long S.R.: *Rhizobium*-induced calcium spiking in *Lotus japonicus*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16**, 335–341 (2003)
41. 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)
42. Heidstra R., Bisseling T.O.N.: Nod factor-induced host responses and mechanisms of Nod factor perception. *New Phytol.* **133**, 25–43 (1996)
43. Herridge D.F., Peoples M.B., Boddey R.M.: Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil.* **311**, 1–18 (2008)
44. Jensen E.S., Peoples M.B., Boddey R.M., Gresshoff P.M., Hauggaard-Nielsen H., Alves B.J.R., Morrison M.J.: Legumes for mitigation of climate change and the provision of feedstock for biofuels and biorefineries. A review. *Agron. Sustain. Dev.* **32**, 329–364 (2012)
45. Jones K.M., Kobayashi H., Davies B.W., Taga M.E., Walker G.C.: How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 619–633 (2007)
46. Jumas-Bilak E., Michaux-Charachon S., Bourg G., Ramuz M., Allardet-Servent A.: Unconventional genomic organization in the alpha subgroup of the Proteobacteria. *J. Bacteriol.* **180**, 2749–2755 (1998)
47. Kawaharada Y., Stougaard J. i wsp.: Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature*, **523**, 308–312 (2015)
48. Kereszt A., Mergaert P., Kondorosi E.: Bacteroid development in legume nodules: evolution of mutual benefit or of sacrificial victims? *Mol. Plant Microbe Interact.* **24**, 1300–1309 (2011)
49. Król J.E., Mazur A., Marczak M., Skorupska A.: Syntenic arrangements of the surface polysaccharide biosynthesis genes in *Rhizobium leguminosarum*. *Genomics*, **89**, 237–247 (2007)
50. Król J.E., Mazur A., Marczak M., Skorupska A.: Application of physical and genetic map of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 to comparison of three closely related rhizobial genomes. *Mol. Genet. Genomics*. **279**, 107–121 (2008)
51. Landeta C., Dávalos A., Cevallos M.Á., Geiger O., Brom S., Romero D.: Plasmids with a chromosome-like role in rhizobia. *J. Bacteriol.* **193**, 1317–1326 (2011)
52. Lee A., Hirsch A.M.: Signals and responses: choreographing the complex interaction between legumes and  $\alpha$ - and  $\beta$ -rhizobia. *Plant Signal. Behav.* **1**, 161–168 (2006)
53. López-Guerrero M.G., Ormeño-Orrillo E., Acosta J.L., Mendoza-Vargas A., Rogel M.A., Ramirez M.A., Rosenblueth M., Martínez-Romero J., Martínez-Romero E.: Rhizobial extrachromosomal replicon variability, stability and expression in natural niches. *Plasmid*, **68**, 149–158 (2012)
54. Łobocka M., Bugajska O., Dobruk A.: Partycja niskokopijowych plazmidów. *Kosmos*, **51**, 305–318 (2002)
55. MacLellan S.R., Smallbone L.A., Sibley C.D., Finan T.M.: The expression of a novel antisense gene mediates incompatibility within the large *repABC* family of  $\alpha$ -proteobacterial plasmids. *Mol. Microbiol.* **55**, 611–623 (2005)
56. MacLellan S.R., Zaheer R., Sartor A.L., MacLean A.M., Finan T.M.: Identification of a megaplasmid centromere reveals genetic structural diversity within the *repABC* family of basic replicons. *Mol. Microbiol.* **59**, 1559–1575 (2006)
57. Masson-Boivin C., Giraud E., Perret X., Batut J.: Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol.* **17**, 458–466 (2009)
58. Mazur A., Koper P.: Rhizobial plasmids – replication, structure and biological role. *Cent. Eur. J. Biol.* **7**, 571–586 (2012)
59. Mazur A., Majewska B., Stasiak G., Wielbo J., Skorupska A.: *repABC*-based replication systems of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 plasmids: incompatibility and evolutionary analyses. *Plasmid*, **66**, 53–66 (2011)
60. Mazur A., Stasiak G., Wielbo J., Kubik-Komar A., Marek-Kozaczuk M., Skorupska A.: Intragenomic diversity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* clover nodule isolates. *BMC Microbiol.* **11**, 123 (2011)
61. Mergaert P., Nikovics K., Kelemen Z., Maunoury N., Vaubert D., Kondorosi A., Kondorosi E.: A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiol.* **132**, 161–173 (2003)



62. Mergaert P., Kondorosi E. i wsp.: Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 5230–5235 (2006)
63. Monahan-Giovanelli H., Pinedo C.A., Gage D.J.: Architecture of infection thread networks in developing root nodules induced by the symbiotic bacterium *Sinorhizobium meliloti* on *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* **140**, 661–670 (2006)
64. Moulin L., Munive A., Dreyfus B., Boivin-Masson C.: Nodulation of legumes by members of the  $\beta$ -subclass of Proteobacteria. *Nature*, **411**, 948–950 (2001)
65. Oke V., Long S.R.: Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 641–646 (1999)
66. Oldroyd G.E., Murray J.D., Poole P.S., Downie J.A.: The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu. Rev. Genet.* **45**, 119–144 (2011)
67. Oono R., Anderson C.G., Denison R.F.: Failure to fix nitrogen by non-reproductive symbiotic rhizobia triggers host sanctions that reduce fitness of their reproductive clonemates. *Proc. Biol. Sci.* **278**, 2698–2703 (2011)
68. Ott T., van Dongen J.T., Günther C., Krusell L., Desbrosses G., Vigeolas H., Bock V., Czechowski T., Geigenberger P., Udvardi M.K.: Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr. Biol.* **15**, 531–535 (2005)
69. Peck M.C., Fisher R.F., Long S.R.: Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to *nod* gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **188**, 5417–5427 (2006)
70. Peoples M.B., Jensen E.S. i wsp.: The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. *Symbiosis*, **48**, 1–17 (2009)
71. Perret X., Staehelin C., Broughton W.J.: Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 180–201 (2000)
72. Petersen J., Frank O., Göker M., Pradella S.: Extrachromosomal, extraordinary and essential – the plasmids of the *Roseobacter* clade. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 2805–2815 (2013)
73. Popp C., Ott T.: Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**, 458–467 (2011)
74. Prell J., Poole P.: Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends Microbiol.* **14**, 161–168 (2006)
75. Pueppke S.G., Broughton W.J.: *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol. Plant Microbe Interact.* **12**, 293–318 (1999)
76. Radutoiu S., Stougaard J. i wsp.: Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature*, **425**, 585–592 (2003)
77. Reeve W., Howieson J. i wsp.: Complete genome sequence of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain WSM1325, an effective microsymbiont of annual Mediterranean clovers. *Stand. Genomic Sci.* **2**, 347–356 (2010)
78. Relić B., Perret X., Estrada-García M.T., Kopcinska J., Golinowski W., Krishnan H.B., Pueppke S.G., Broughton W.J.: Nod factors of *Rhizobium* are a key to the legume door. *Mol. Microbiol.* **13**, 171–178 (1994)
79. Rubio L.M., Ludden P.W.: Maturation of nitrogenase: a biochemical puzzle. *J. Bacteriol.* **187**, 405–414 (2005)
80. Skorupska A., Janczarek M., Marczak M., Mazur A., Król J.: Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microb. Cell Fact.* **5**, 7 (2006)
81. Skorupska A., Wielbo J., Kidaj D., Marek-Kozaczuk M.: Enhancing *Rhizobium*-legume symbiosis using signaling factors (w) Microbes for Legume Improvement, red. M.S. Khan, J. Musarrat, A. Zaidi, Springer-Verlag, Vienna, 2010, s. 27–54
82. Sprent J.I.: Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytol.* **174**, 11–25 (2007)
83. 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)
84. Sullivan J.T., Ronson C.W.: Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 5145–5149 (1998)
85. Terpolilli J.J., Hood G.A., Poole P.S.: What determines the efficiency of N<sub>2</sub>-fixing *Rhizobium*-legume symbioses? *Adv. Microb. Physiol.* **60**, 325–389 (2012)
86. Tettelin H., Riley D., Cattuto C., Medini D.: Comparative genomics: the bacterial pan-genome. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 472–477 (2008)
87. Timmers A.C.: The role of the plant cytoskeleton in the interaction between legumes and rhizobia. *J. Microsc.* **231**, 247–256 (2008)
88. Timmers A.C., Soupène E., Auriac M.C., de Billy F., Vasse J., Boistard P., Truchet G.: Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**, 1204–1213 (2000)
89. Udvardi M.K., Day D.A.: Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 493–523 (1997)
90. Van de Velde W., Mergaert P. i wsp.: Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science*, **327**, 1122–1126 (2010)
91. Vance C.P.: Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant Physiol.* **127**, 390–397 (2001)
92. Vasse J., de Billy F., Camut S., Truchet G.: Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J. Bacteriol.* **172**, 4295–4306 (1990)
93. Velázquez E., García-Fraile P., Ramírez-Bahena M.-H., Rivas R., Martínez-Molina E. Bacteria involved in nitrogen-fixing legume symbiosis: current taxonomic perspective (w) Microbes for Legume Improvement, red. M.S. Khan, J. Musarrat, A. Zaidi, Springer-Verlag, Vienna, 2010, s. 1–25
94. Venkova-Canova T., Soberón N.E., Ramírez-Romero M.A., Cevallos M.A.: Two discrete elements are required for the replication of a *repABC* plasmid: an antisense RNA and a stem-loop structure. *Mol. Microbiol.* **54**, 1431–1444 (2004)
95. Weare W.W., Dai X., Byrnes M.J., Chin J.M., Schrock R.R., Müller P.: Catalytic reduction of dinitrogen to ammonia at a single molybdenum center. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 17099–17106 (2006)
96. Weston L.A., Mathesius U.: Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. *J. Chem. Ecol.* **39**, 283–297 (2013)
97. White J., Prell J., James E.K., Poole P.: Nutrient sharing between symbionts. *Plant Physiol.* **144**, 604–614 (2007)
98. Wielbo J., Golus J., Marek-Kozaczuk M., Skorupska A.: Symbiosis-stage associated alterations in quorum sensing autoinducer molecules biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Soil.* **329**, 399–410 (2010)
99. Wielbo J., Skorupska A.: Ewolucja układu symbiotycznego *Rhizobium* – rośliny motylkowe. *Post. Mikrobiol.* **42**, 263–283 (2003)
100. Young J.P., Parkhill J. i wsp.: The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. *Genome Biol.* **7**, R34 (2006)

# ZWIĄZKI INTERFERUJĄCE Z BAKTERYJNYMI SYSTEMAMI WYCZUWANIA LICZEBNOŚCI I ICH POTENCJALNA FUNKCJA TERAPEUTYCZNA

Krystyna I. Wolska<sup>1\*</sup>, Anna M. Grudniak<sup>1</sup>, Katarzyna Markowska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Wpłynęło w styczniu 2016 r.  
Zaakceptowano w kwietniu 2016 r.

1. Wprowadzenie. 2. Wyczuwanie liczebności jako sposób komunikowania się bakterii. 3. Organiczne inhibitory QS. 3.1. Inhibitory roślinne. 3.2. Inhibitory pochodzenia zwierzęcego. 3.3. Inhibitory produkowane przez bakterie. 4. Hamowanie QS przez nanocząstki. 5. Uwagi końcowe

## Inhibitors of bacterial quorum sensing systems and their role as potential therapeutics

**Abstract:** Quorum sensing (QS) is a commonly used way of cell-to-cell communication which plays a role in the regulation of gene expression and, therefore, controls bacterial social behavior and pathogenicity. The inhibition of QS, called quorum quenching (QQ), is considered as a promising strategy to combat bacterial infections without severe influence on bacterial survival. To date, several anti-QS approaches have been documented. In this article, two groups of potent QS inhibitors are described: 1) natural, organic compounds isolated from plants, animals and bacteria and 2) various types of nanoparticles. The ability of the sublethal concentration of these compounds to inhibit QS autoinducers synthesis as well as various steps of QS-regulated cellular response, and thus virulent traits of bacterial pathogens such as biofilm development, are discussed. QS inhibitors can constitute the promising future alternative to antibiotics, especially since until now, the development of bacterial resistance to neither group of these compounds has been reported.

1. Introduction. 2. Quorum sensing as a system of bacterial communication. 3. Organic inhibitors of QS. 3.1. Plant compounds. 3.2. Inhibitors of animal origin. 3.3. Inhibitors synthesized by bacteria. 4. QS inhibition by nanoparticles. 5. Concluding remarks

**Słowa kluczowe:** inhibitory organiczne, nanocząstki, wyczuwanie liczebności, znaczenie terapeutyczne

**Key words:** organic inhibitors, nanoparticles, quorum sensing, therapeutic potential

## 1. Wprowadzenie

Rozprzestrzeniająca się oporność bakterii na antybiotyki i brak pojawiania się na rynku nowych związków tego typu zmuszają do poszukiwania innych substancji i opracowywania strategii antybakteryjnych [48, 53]. Duży i dobrze udowodniony potencjał antybakteryjny posiadają związki organiczne, głównie pochodzenia roślinnego [17] oraz nanocząstki, zwłaszcza metali ciężkich i ich tlenków [63, 85]. Oba wymienione czynniki wywierają efekt plejotropowy na komórki bakteryjne, a różnorodne cele i mechanizmy ich działania w wielu wypadkach nie zostały do końca poznane. Do antybakteryjnej aktywności przyczynia się, między innymi, zdolność tych związków do zahamowania systemu przekazywania sygnału opartego na wyczuwaniu liczebności, QS (*quorum sensing*), często określane angielskim terminem *quorum quenching*, QQ. Zjawisko QQ zachodzi w różnych środowiskach, włączając wewnątrz makroorganizmów. Z globalnych czynników mających wpływ na ten proces należy wymienić stopień uwodnienia środowiska, pH i temperaturę [7]. Ze względu na olbrzymie znaczenie QS w fizjologii komórek bakteryjnych, a co za tym idzie adaptacji do

różnych środowisk, zachowań zbiorowych (np. zdolności do tworzenia biofilmu), jak również wirulencji bakterii patogennych, możliwości zahamowania tej drogi przekazywania sygnału mają duże znaczenie biologiczne, a w ostatnim czasie również aplikacyjne. Należy nadmienić, że związki hamujące QS wpływają na wirulencję bakterii, a nie ich podstawowe funkcje, szczególnie jeśli są stosowane w w subletalnych stężeniach [49]. W następnych rozdziałach pracy przedstawiona zostanie krótka charakterystyka QS. Następnie wymienione zostaną organiczne inhibitory QS i różne rodzaje nanocząstek, w miarę możliwości zostanie podany mechanizm ich działania.

## 2. Wyczuwanie liczebności jako sposób komunikowania się bakterii

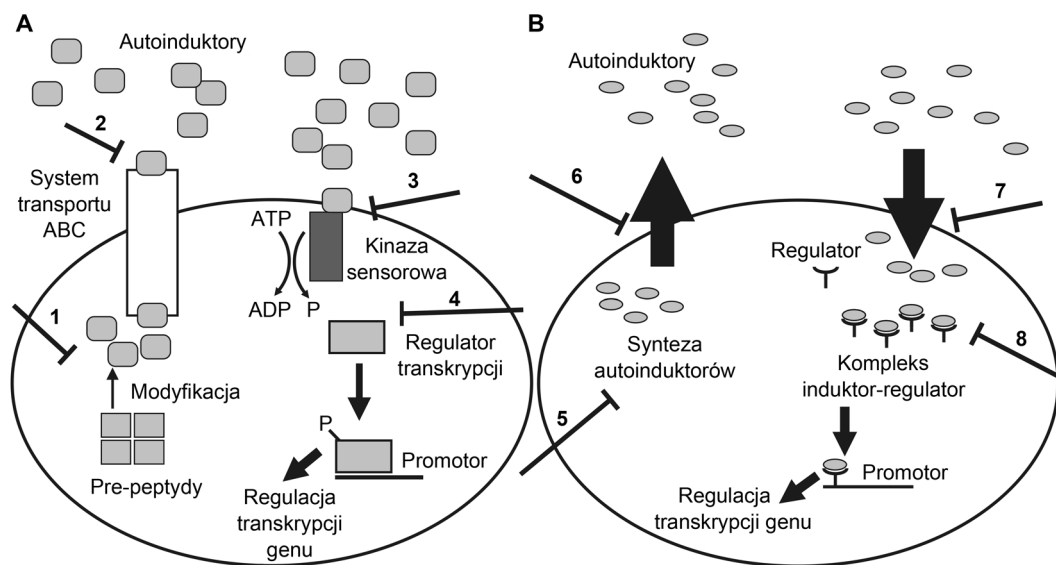
Bakterie wielu gatunków komunikują się ze sobą, wykorzystując system wyczuwania liczebności [72]. Mechanizm QS został po raz pierwszy opisany prawie 50 lat temu u morskiej bakterii, *Vibrio fisheri* [71]. Od tego czasu ten sposób porozumiewania się komórek jest intensywnie badany, a uzyskane wyniki

\* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel. 22 554 13 02; e-mail: izabelaw@biol.uw.edu.pl

były przedmiotem ogromnej liczby publikacji, w tym również przeglądowych [18, 27, 68, 89, 103]. Przekroczenie przez liczbę bakterii wartości progowej, różnej dla różnych gatunków a nawet szczepów, i zależnej od środowiska, przekłada się na osiągnięcie wartości progowej stężenia drobnocząsteczkowych substancji sygnałowych – autoinduktorów. Sygnał ten odbierany jest przez bakterie obecne w danym środowisku, co skutkuje zmianą ekspresji genów, w czym kluczową rolę odgrywają regulatory transkrypcji. Liczba genów kontrolowanych przez QS jest duża, może przekraczać 10% genomu [102]. Zgodnie z podziałem przedstawionym w pracy Grandclément i wsp. [25], geny kontrolowane przez QS mogą być podzielone na 4 kategorie funkcjonalne. Do pierwszej należą niektóre geny kodujące funkcje konieczne do życia i wzrostu komórek, do drugiej geny rządzące zachowaniem się komórek w danym środowisku, do trzeciej geny warunkujące horyzontalny transfer DNA, w końcu do czwartej geny, których ekspresja umożliwia interakcje z innymi organizmami (np. przez syntezę czynników wirulencji). Postulowana jest także dodatkowa rola QS, a mianowicie jako sygnału pozwalającego poszczególnym komórkom na monitorowanie swojego umiejscowienia w grupie [82]. Sposób komunikowania się oparty na QS jest powszechny wśród organizmów żywych. Sygnały QS produkowane przez bakterie mogą być odbierane nie tylko przez prokarioty. Na przykład opisano ich

percepcję przez drożdże *Candida albicans* [32], rośliny z rodzaju *Arabidopsis* [66] oraz zwierzęta [35]. Molekularne mechanizmy działania systemów u poszczególnych bakterii różnią się zarówno chemiczną naturą autoinduktorów, jak i sposobem wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnałów; różnice są szczególnie wyraźne między bakteriami Gram-ujemnymi a Gram-dodatnimi. Schematy sygnalizacji QS u tych dwóch grup bakterii zostały przedstawione na Rys. 1. Do najlepiej poznanych należą systemy opisane u *Pseudomonas aeruginosa*: [73, 78], u *Staphylococcus aureus* [11, 59], *Staphylococcus epidermidis* [101] i u bakterii z rodzaju *Vibrio* [72].

Rolę cząsteczek sygnałowych u  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -proteobakterii pełnią laktony N-acetylo-homoserynowe (*N-acetylhomoserine lactones*, AHL) syntetyzowane przez dodanie łańcucha acylowego do cząsteczki S-adenozylometioniny – SAM [77]. Te cząsteczki lub ich pochodne, pełnią również rolę autoinduktorów u archeonów [109]. Prototypami sygnalizacji przy udziale AHL są 2 podobne systemy u *P. aeruginosa*: las, w którym rolę autoinduktora pełni 3-oxo-C12-AHL a regulatorem transkrypcji jest LasR oraz rhl, gdzie autoinduktorem jest C4-AHL a regulatorem RhlR [38]. Trzecią cząsteczką sygnałową funkcjonującą w systemach las, a szczególnie rhl, jest PQS – 2-heptyl-3-hydroxy-4(1H)-chinolon; cząsteczka ta jest syntetyzowana w późnej wykładniczej i wczesnej-stacjonarnej fazie



Rys. 1. Przekazywanie sygnału QS u bakterii Gram-dodatnich (A) i Gram-ujemnych (B)

A. Induktorami QS są krótkie peptydy, które syntetyzowane w formie pre-peptydów podlegają modyfikacji (często cyklizacji) i eksporcie na zewnątrz komórki za pośrednictwem systemu transportu ABC (ang. *ATP binding cassette*). Cząsteczki autoinduktorów, po osiągnięciu progowego stężenia w środowisku, zostają związane przez białka sensorowe o aktywności kinazowej. Po fosforylacyjnej aktywacji kinazy, grupa fosforanowa zostaje przekazana na regulator transkrypcji, co skutkuje regulacją (najczęściej aktywacją) transkrypcji genów kontrolowanych przez QS. B. Induktorami QS są AHL i inne związki swobodnie dyfundujące zarówno na zewnątrz, jak i do wnętrza komórki. Po przekroczeniu progowego stężenia w środowisku cząsteczki sygnałowe wiążą się z regulatorami transkrypcji o funkcji receptorowej. Powstały kompleks induktor – regulator łączy się z obszarem promotorowym genu, co skutkuje regulacją transkrypcji. Na rysunku graficznie (tępo zakończonymi liniami) zaznaczono kolejne etapy hamowane przez inhibitory QS: bakterie Gram-dodatnie (A) 1 – modyfikacja pre-peptydów, 2 – transport cząsteczek sygnałowych, 3 – wiązanie autoinduktorów przez kinazy, 4 – fosforylacja regulatora transkrypcji; bakterie Gram-ujemne (B), 5 – synteza autoinduktorów, 6 i 7 – transport cząsteczek sygnałowych, 8 – tworzenie kompleksu induktor-regulator transkrypcji.

wzrostu hodowli [80]. Liczne bakterie Gram-ujemne i niektóre Gram-dodatnie produkują inny rodzaj cząsteczek sygnałowych, znanych pod ogólną nazwą AI-2, a będących borowanymi tetrafuranami, nie u wszystkich gatunków udowodniono jednak ich bezpośrednią rolę w komunikacji QS [79]. Z pozostałych cząsteczek sygnałowych należy wymienić cyklopeptydy syntetyzowane przez bakterie Gram-dodatnie [68] i pochodne kwasów tłuszczowych lub aminokwasów produkowane przez niektóre proteobakterie [28, 31].

### 3. Organiczne inhibitory QS

Liczba naturalnych i syntetycznych związków hamujących QS działających w sposób mniej lub bardziej specyficzny, jest bardzo duża [40]. Według klasyfikacji podanej przez Bhardwaja i wsp. [4] kryteria, które musi spełniać idealny inhibitor są następujące: 1) mała masa cząsteczkowa, 2) aktywność skierowana tylko przeciwko sygnalizacji QS, 3) brak toksyczności dla komórek eukariotycznych, 4) brak interferencji z podstawowymi procesami metabolicznymi komórki, co zmniejsza selekcyjną presję wywieraną na bakterie, a w konsekwencji obniża powstanie oporności na te związki.

Inhibitory QS mogą interferować z różnymi etapami komunikacji QS [89]. Duża ich grupa hamuje syntezę autoinduktorów lub ich prekursorów. Szczególnie wiele z nich hamuje syntezę AHL, np. analogi SAM, takie jak sinefungina [77] lub kwas indolo-3-octowy hamujący syntetazę AHL [15]. Znane są również inhibitory innych typów autoinduktorów. Enzym MTAN (*5'-methylthioadenosine/S-adenosinehomocysteine nucleosidase*) mający aktywność nukleazy hamuje syntezę AI-2 [26], z kolei synteza PQS (*Pseudomonas quinolone signal*), chinolonowego autoinduktora *P. aeruginosa* jest zmniejszona przez antranilany [10]. Induktory peptydowe u bakterii Gram-dodatnich hamowane są między innymi przez drugorzędowe metabolity produkowane przez grzyby [69]. Jeszcze inne inhibitory, głównie enzymy lub przeciwciała, unieczynnają a nawet degradują cząsteczki induktorów [41]. Na przykład AHL-laktonazy hydrolizują laktony homoserynowe, a oksydoreduktazy redukują grupy karbonylowe lub hydroksylowe [91], z kolei induktory zawierające długie łańcuchy acylowe degradowane są przez AHL-acylazy [34]. Udowodniono także, że monoklonalne przeciwciała skutecznie inaktywują induktory QS *S. aureus* [75] i *P. aeruginosa* [74]. Osobna grupa inhibitorów hamuje zarówno odbiór sygnałów jak i inicjowaną przez nie odpowiedź transkrypcyjną komórek. Odbywa się to zazwyczaj przez blokowanie receptorów odbierających sygnał od różnych autoinduktorów. I tak, sygnalizacja za pośrednictwem acylowanych laktonów homoseryny

hamowana jest przez analogi tiolaktonów [65], alkaloid solanopsynę lub ekstrakty z kilku owoców, ziół i przypraw, np. goździków, którego głównym składnikiem jest eugenol należący do grupy terpenów [36, 100]. Mechanizm działania tych inhibitorów polega na zablokowaniu wiązania induktora z receptorem, choć znane są przypadki indukcji proteolitycznej degradacji kompleksu induktor – receptor [59]. Przekazywanie sygnału QS przez inne rodzaje induktorów, takie jak AI-2 lub PQS może być również zahamowane, odpowiednio przez aldehyd cynamonowy [9] lub farnesol syntetyzowany przez *C. albicans* [33]. Szczególnie podatne na inhibicję jest przekazywanie sygnału u bakterii Gram-dodatnich, które zazwyczaj zachodzi przy udziale cyklicznych peptydów i dwuskładnikowego systemu przekazywania sygnału, kinaza – regulator transkrypcji. Wykazano, że u *S. aureus* kinaza ArgC hamowana jest przez modyfikowane (skrótowe) peptydy, pochodne induktorów peptydowych, AIP (*arg-signalling peptide*) [59], natomiast regulator transkrypcji ArgA przez niskocząsteczkowy inhibitor, sawarynę (*S. aureus* virulence inhibitor) [97].

Tradycyjna izolacja inhibitorów QS opiera się na selekcji organizmów (komórek, tkanek) lub przeszukiwaniu bibliotek związków chemicznych, czemu służą liczne metody zazwyczaj posługujące się biosensorymi. Spis literatury dotyczącej tego zagadnienia zawarty jest w pracy przeglądowej [25]. Jako biosensory stosuje się często takie organizmy jak: (i) *Chromobacterium violaceum* z wykorzystaniem jego zdolności do QS-zależnej syntezy fioletowego barwnika – wiołaceiny [14], (ii) *Yersinia enterocolitica*, gdzie monitoruje się ruch [3] lub (iii) *P. aeruginosa*, u którego mierzy się syntezę barwników np. piowerdyny [1]. Do monitorowania aktywności QQ wykorzystuje się także zdolność badanych związków do hamowania tworzenia biofilmów przez różne gatunki mikroorganizmów [98]. Wszystkie tradycyjne metody mają ograniczony zasięg (niską przepustowość) i dlatego obecnie do poszukiwania inhibitorów QS preferuje się metod wysoko-przepustowe. Przykładem jest metoda identyfikacji inhibitorów QS u bakterii Gram-dodatnich oparta na pomiarze ekspresji genów kodujących lucyferazę i genów kodujących białko zielonej fluorescencji będących pod kontrolą QS-zależnego promotora *arg* [19]. Wysoko-przepustowe metody pozwalają na analizę całych bibliotek złożonych z ogromnej liczby związków. Za ich pomocą zbadano 1,7 miliona związków, wśród których zidentyfikowano 12 zdolnych do inhibicji induktorów AI-2 u *Vibrio harveyi* [34]. Należy również nadmienić, że poznanie struktury naturalnie występujących inhibitorów QS stwarza możliwość chemicznej syntezy ich analogów o jeszcze większym potencjale anty-QS. Na przykład zsyntetyzowano, a następnie udowodniono silną inhibicję QS przez peptydy tiolaktonowe będące analogami autoinduktorów *S. aureus* [58].

Tabela I  
Przykłady organicznych inhibitorów QS

Pochodzenie	Związek	Producent	Hanowanie QS u:	Piśmiennictwo
Rośliny	Furanony	Glon <i>D. pulchra</i>	<i>Ervinia carotovora</i>	[60]
	Fluorokumaryny	Grejfrut (owoce)	Liczne gatunki	[29]
	Triterpenoidy	Kasztan jadalny	<i>S. aureus</i>	[84]
Zwierzęta	Metabolity wtórne	Koralowce, gąbki	<i>P. aeruginosa</i>	[95]
	Alkaloidy	Mrówka ogniowa	<i>P. aeruginosa</i>	[76]
	Kwasy tłuszczowe	Ryby morskie, drób	<i>Vibrio harveyi</i>	[104]
	Paraksonazy	Człowiek	<i>P. aeruginosa</i>	[21]
Bakterie	Indol	Liczne gatunki	Bakterie Gram-ujemne	[30, 45, 51]
	Polisacharydy	Np. <i>E. coli</i> , LAB	Liczne gatunki	[88]
	Laktonazy	Np. <i>Agrobacterium</i>	Bakterie Gram-ujemne	[108]
	Amidazy	<i>Ralstonia</i> XJ12B	Bakterie Gram-ujemne	[55]
	Dioxygenazy	<i>Arthrobacter nitrogualacolicus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	[83]

LAB – bakterie kwasu mlekowego (*lactic acid bacteria*). Szerszy opis w tekście

Poniżej opisano niektóre z naturalnych, organicznych inhibitorów. Lista przykładowych związków została również przedstawiona w Tabeli I, gdzie podano nazwy ich producentów i gatunki bakterii, u których udowodniono hamowanie QS.

### 3.1. Inhibitory roślinne

Największa grupa naturalnych inhibitorów QS syntetyzowana jest przez rośliny, zwłaszcza rośliny wyższe. Wśród nich znajdują się gatunki lecznicze i jadalne, co sprawia, że roślinne związki antagonistyczne uważane są za nietoksyczne lub o znikomej toksyczności [100]. Inhibitory izolowane są ze wszystkich części roślin: korzeni, łodyg, liści, owoców i nasion [23, 39, 46]. Największą ich grupę stanowią związki cykliczne, np. fenole i ich pochodne, choć znane są także związki niecykliczne np. organiczne związki siarki [8]. Związki antagonistyczne izolowane z roślin zdolne są hamować sygnalizację QS na wszystkich etapach opisanych w poprzednim rozdziale. Najlepiej poznane są furanony, oryginalnie izolowane z morskiego glona *Delisea pulchra*. Wykazano, że halogenowane furanony zdolne są do usuwania AHL z komórek *E. coli* nadprodukujących LuxR, przez co hamują funkcje QS-zależne, poza tym zwiększają degradację LuxR [60, 61]. Furanony oraz zawarte w soku grejpfruta fluorokumaryny interferują także z działaniem induktorów AI-1 i AI-2 [24, 29]. Ostatnio wykazano, że ekstrakt z liści kasztana jadalnego zawierający pochodne kwasów oleanolowego i ursolowego interferuje z systemem Agr (*accessory gene regulator*) *S. aureus*, który pełni zasadniczą rolę w funkcjonowaniu sygnalizacji QS u tej bakterii [84]. Stwierdzono, że hamowanie QS może być pomocne w terapii ostrych infekcji wywoływanych przez ten gatunek, ale nie infekcji przewlekłych związanych z tworzeniem się

biofilmów [50]. Inhibitory QS izolowane były również z grzybów żyjących w symbiozie z korzeniami roślin, ich hamujące działanie polega na degradacji laktonów homoserynowych [99]. Należy zaznaczyć, że niekiedy hamujący efekt inhibitorów QS widoczny jest dopiero w obecności dwóch i więcej związków, jak na przykład w przypadku łącznego działania betonicyny, floridozydu i kwasu izotionowego izolowanych z glona *Ahmfel-tipsis flabelliformis* [56].

### 3.2. Inhibitory QS pochodzenia zwierzęcego

Stosunkowo niewiele inhibitorów QS izolowano ze zwierząt, te znane pochodzą zwłaszcza od organizmów morskich, w tym głównie koralowców, gąbek, myszowiołów i meduz. Wykazano między innymi, że pochodne alkaloidów izolowane z myszowiołów blokują ekspresję genów indukowanych przez AHL u różnych bakterii [81]. Również wtórne metabolity syntetyzowane przez gąbkę *Luffariella variabilis* mają zdolność do inhibicji QS [95]. Z innych zwierząt, należy wymienić mrówkę ogniową, produkowany przez nią alkaloid jest bardzo silnym inhibitorem QS u *P. aeruginosa* [76]. Jeszcze innymi inhibitorami QS są paraksonazy produkowane przez człowieka i inne kręgowce, a to dzięki swej zdolności do hydrolizy AHL [21]. Z kolei długocząsteczkowe kwasy tłuszczowe izolowane z mrożonych ryb i drobiu zdolne są do hamowania induktorów AI-2 u *Vibrio harveyi* [104].

### 3.3. Inhibitory produkowane przez bakterie

Inhibitory QS produkowane są przez liczne gatunki bakteryjne np. należące do rodzajów *Bacillus*, *Pseudomonas* i *Rhizobium* [31]. Do najlepiej poznanych należą fenolo-etylamidy i cyklo-L-prolina-L-tyrozyna [79].

Wykazano również, że indol, cząsteczka biorąca udział w przekazywaniu sygnału między licznymi gatunkami bakterii, może silnie zahamować QS u szczepów nie mających zdolności do jej produkcji, szczególnie jeśli autoinduktorami QS są AHL. Inhibicję QS przez indol wykazano u *P. aeruginosa* [51], *Chromobacterium violaceum* [30] oraz *Acinetobacter oleivorans* [45]. Udowodniono, że u tej ostatniej bakterii indol hamuje prawidłowe sfałdowanie, a więc przybranie właściwej konformacji przez białko AqsR, które jest regulatorem transkrypcji [45]. Hamująca aktywność indolu przyczynia się do zmniejszenia zjadliwości bakteryjnych patogenów, co wyraża się inhibicją tworzenia biofilmu i syntezy kilku czynników wirulencji [51]. Liczną grupą czynników QQ syntetyzowanych przez bakterie są enzymy degradujące induktory, w tym głównie laktony homoserynowe. Enzymy te należą do czterech klas: laktonazy, hydrolizujące pierścień laktonowy [109], amidazy, zwane inaczej acylazami odcinające resztę kwasów tłuszczowych od pierścienia laktonowego [55], reduktazy, degradujące tylko laktony zawierające grupę 3-oxo, co zachodzi na drodze jej konwersji do grupy hydroksylowej [5] oraz oksydazy cytochromowe [10]. Inne rodzaje induktorów np. PQS u *P. aeruginosa* mogą być rozkładane przez enzymy należące do grupy dioksygenaz [83]. Enzymy QQ produkowane przez bakterie pełnią ważną biologiczną rolę, zarówno w środowisku, gdzie działają hamująco na wzrost konkurentów jak i podczas infekcji makroorganizmów [20].

#### 4. Nanocząstki

##### 3.1. Ogólna charakterystyka i antybakteryjne działanie

Nanocząstki, NPs (*nanoparticles*) definiowane są jako skupiska atomów o średnicy od 1 do 100 nm charakteryzujące się dużym stosunkiem powierzchni do objętości [85]. Różnorodność NPs jest bardzo duża, jednak szczególne zainteresowanie skupione jest na nanocząstkach metali, a zwłaszcza srebra [105]. Potencjał antybakteryjny NPs jest znaczny, generalizując, działają silniej na bakterie Gram-ujemne niż Gram-dodatnie [44, 63]. Przykładami nanocząstek nieorganicznych o dużym potencjale antybakteryjnym są: nanocząstki srebra, złota oraz tlenków tytanu, cynku, żelaza, miedzi magnezu, aluminium i azotu. Z nanocząstek organicznych należy wymienić poli-ε-lizynę, czwartorzędowe sole amonowe, triklosan, 5-chloro-8-hydroksychinolię, polimery organometaliczne, chitosan i nanocząstki polikationowe. Z terapeutycznym zastosowaniem nanocząstek wiąże się duże nadzieje, głównie ze względu na fakt, że są również aktywne wobec szczepów opornych na antybiotyki. Jednak, jak

dotąd, używane są głównie w higienie osobistej i leczeniu infekcji powierzchniowych. Być może przyczyną tego zjawiska leży w nie do końca poznanym mechanizmie ich działania na komórki bakteryjne, jak również w braku specyficzności działania – opisano ich wpływ także na komórki eukariotyczne. W dodatku antybakteryjne działanie NPs zależy od bardzo wielu czynników związanych zarówno z ich fizykochemicznym charakterem, np. wielkością, kształtem, rodzajem odczynnika stosowanego do sporządzania zawiesin, jak i ze środowiskiem, np. obecnością tlenu, pH i temperaturą [27].

Uogólniając, antybakteryjne działanie NPs opiera się na dwóch, niewykluczających się sposobach: zniszczeniu struktury i zahamowaniu funkcji osłon bakteryjnych oraz indukowaniu tworzenia się reaktywnych form tlenu, ROS (*reactive oxygen species*) [6]. NPs wiążą się elektrostatycznie z powierzchnią komórek bakteryjnych, co prowadzi do zmian potencjału błonowego, depolaryzacji osłon, a nawet przerwania ich integralności, a w konsekwencji do zaburzeń transportu, funkcjonowania łańcucha oddechowego i ewentualnej lizy komórek. Z kolei produkcja ROS powoduje stres oksydacyjny prowadzący do uszkodzenia wszystkich makromolekuł i zahamowania wielu funkcji komórkowych [70]. U *E. coli* obserwowano uszkodzenia DNA prowadzące do śmierci komórki lub powstania mutacji, co wiąże się z inhibicją działania systemów naprawy DNA [86], peroksydację lipidów osłonowych skutkującą zaburzeniami w funkcjonowaniu łańcucha oddechowego [62] oraz destrukcją białek, głównie przez oddziaływanie z białkami zawierającymi siarkę [85]. U tej bakterii stwierdzono także zahamowanie syntezy i funkcji takich białek jak poriny błony zewnętrznej, OmpA i OmpC, oraz białka szoku cieplnego IbpA i IbpB [48, 57]. Na specjalne podkreślenie zasługuje zdolność nanocząstek do hamowania tworzenia się biofilmów bakteryjnych, u podstaw czego leży obniżenie adhezji komórek do kolonizowanej powierzchni [42]. Obserwowano również zmniejszenie żywotności komórek w biofilmie [86]. Nanocząstki nie tylko charakteryzują się działaniem antybakteryjnym, lecz również zdolnością do synergistycznego oddziaływania z antybiotykami, co prowadzi do spotęgowania ich aktywności i sprawia, że antybiotyk może być skuteczny wobec szczepu uznanego za oporny [64, 107].

Istnieje spora liczba doniesień literaturowych wskazujących, że różne rodzaje nanocząstek zdolne są do hamowania QS, co skutkuje ich negatywnym wpływem na funkcje kontrolowane przez ten system, takie jak synteza czynników wirulencji i tworzenie biofilmu bakteryjnego [106]. Publikowane dane dotyczą głównie dwóch patogenów – *P. aeruginosa* i *S. aureus*, których genetyka i wpływ QS na fizjologię komórek są najlepiej poznane. Na przykład udowodniono, że u *P. aeruginosa* QS kontroluje głównie syntezę ramnolipidów

(składników macierzy biofilmu) i autolizę komórek w biofilmie [52]. Wykazano, że nanocząstki srebra syntetyzowane przez grzyb *Rhizopus arrhizus* w wyniku tzw. „zielonej syntezy” obniżają poziom ekspresji genów związanych z QS u *P. aeruginosa* – *lasIR* i *rhlIR*, a co za tym idzie hamują produkcję nie tylko autoregulatorów, lecz także wielu QS-zależnych czynników wirulencji takich jak: proteaza LasA, elastyna LasB, piocyjanina, piowerdyna, piochelina, ramnolipidy i alginian. Udowodniono również znaczną, bo sięgającą nawet 96%, inhibicję tworzenia się biofilmu, po dodaniu subletalnych stężeń nanocząstek [99]. U innej Gram-ujemnej bakterii, *E. coli*, obserwowano znaczne zahamowanie tworzenia się biofilmu w obecności nanocząstek srebra, a przy większym ich stężeniu nawet eradykację już utworzonego biofilmu [86]. Natomiast u *S. aureus* po dodaniu AgNPs stwierdzono uwalnianie się komórek z dojrzałej struktury biofilmu, co doprowadza do możliwości kolonizacji innych powierzchni. Powyżej przytoczono wyniki badań *in vitro*, znacznie mniej eksperymentów było prowadzonych w układzie *in vivo*. Do ciekawszych osiągnięć należy wykazanie na modelu królików, że nanocząstki tlenku srebra skompleksowane z hydroksyapatytem zapobiegają wywołanym przez *S. aureus* infekcjom zdarzającym się po operacjach ortopedycznych [2], jednak w tym wypadku związek między antybakteryjnym działaniem nanocząstek, a ich aktywnością QQ nie został eksperymentalnie udowodniony [16].

Obecnie dostępne metody biotechnologiczne pozwalają na zaprojektowanie nanocząstek skutecznie i specyficznie hamujących QQ, a zarazem stosunkowo mało interferujących z podstawowymi funkcjami komórki. Na przykład otrzymano nanocząstki dwutlenku silikonu pokryte  $\beta$ -cyklodekstryną, która wiąże laktony homoserynowe i hamuje QS u bakterii Gram-ujemnych [43]. Wykazano, że zależna od QS luminescencja u *Vibrio fischeri* jest hamowana wydajniej przez te koniugaty niż przez samą cyklodekstrynę [67].

## 5. Uwagi końcowe

Antybakteryjny potencjał omówionych w artykule związków organicznych i nanocząstek oparty jest zarówno na ich destrukcyjnym działaniu na struktury komórek bakteryjnych, jak i hamowaniu przez nie funkcji fizjologicznych, w tym zależnych od QS, co jest obserwowane nawet, gdy inhibitory obecne są w subletalnych, niskich stężeniach. Badania dotyczące aktywności QQ, a co za tym idzie modulacji wirulencji bakterii przez związki opisane w pracy eksperymenty do tej pory nie zostały zastosowane w praktyce. Jednak już teraz wiadomo, że zwalczanie infekcji bakteryjnych przez interferencję z QS ma dwie duże zalety [92]. Jest

metodą mało cytotoksyczną i zarazem ograniczającą rozwój oporności na użyte związki [87, 90]. Stosowanie związków organicznych i nanocząstek stanowi alternatywę do podejmowanych prób hamowania QS przy pomocy monoklonalnych przeciwciał, które mogą być użyte do zablokowania działania autoinduktorów QS u *S. aureus* i *P. aeruginosa* [74, 75]. Na zakończenie należy wspomnieć, że także niektóre antybiotyki: erytromycyna, cefalosporyna, fluorochinolony i azytromycyna mają zdolność do hamowania QS przez interferencję z syntezą autoinduktorów [94, 96]. Ta ostatnia, jako jedyna, pozytywnie przeszła testy kliniczne w terapii infekcji wywołanych przez *P. aeruginosa* [37]. Hamowanie QS przez antybiotyki jest uważane za alternatywny i drugorzędny sposób przeciwbakteryjnej aktywności tych związków. Co więcej, na przykładzie azytromycyny wykazano, że zakończenie terapii antybiotykowej prowadzi do niepożądanego zaostrzenia infekcji powodowanych przez *P. aeruginosa*, ta wielce niebezpieczna obserwacja dostarcza argumentu przeciwko stosowaniu antybiotyków jako inhibitorów QS [12, 47].

## Piśmiennictwo

1. Adonizio A., Kong K.-F., Mathee K.: Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by south Florida plant extracts. *Antimicrob. Agents Chem.* **52**, 198–203 (2008)
2. Akiyama T., Miyamoto H., Yonekura Y., Tsukamoto M., Ando Y., Noda I., Sonohata M., Mawatari M.: Silver oxide-containing hydroxyapatite coating has *in vivo* antibacterial activity in the rat tibia. *J. Orthop. Res.* **31**, 1195–1200 (2013)
3. Atkinson S., Chang C., Sockett R., Cámara M., Williams P.: Quorum sensing in *Yersinia enterocolitica* controls swimming and swarming motility. *J. Bacteriol.* **188**, 1451–1461 (2006)
4. Bhardwaj A.K., Vinothkumar K., Rajpara N.: Bacterial quorum sensing inhibitors: attractive alternatives for control of infectious pathogens showing multiple drug resistance. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* **8**, 68–83 (2013)
5. Bijtenhoorn P., Streit W.R. i wsp.: A novel metagenomic short-chain dehydrogenase/reductase attenuates *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence on *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*, **6**, e26278 (2011)
6. Blecher K., Nasir A., Friedman A.: The growing role of nanotechnology in combating infectious disease. *Virulence*, **2**, 395–401 (2011)
7. Boller T., Felix G.: A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**, 379–406 (2009)
8. Borchardt S.A., Allain E.J., Michels J.J., Stearns G.W., Kelly R.F., McCoy W.F.: Reaction of acylated homoserine lactone bacterial signaling molecules with oxidized halogen antimicrobials. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3174–3179 (2001)
9. Brackman G., Defoirdt T., Miyamoto C., Bossier P., van Calenberg S., Nelis H., Coenye T.: Cinnamaldehyde and cinnamaldehyde derivatives reduce virulence in *Vibrio* spp. by decreasing the DNA-binding activity of the quorum sensing response regulator LuxR. *BMC Microbiol.* **8**, 149 (2008)

10. Calfee M.W., Coleman J.P., Pesci E.C.: Interference with *Pseudomonas* quinolone signal synthesis inhibits virulence factor expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 11633–11637 (2001)
11. Cegelski L., Marshall G.R., Eldridghe G.R., Hultgren S.J.: The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 17–27 (2008)
12. Chatterjee M., Anju C.P., Biswas L., Anil Kumar V., Gopi Mohan C., Biswas R.: Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. *Int. J. Med. Microbiol.* **306**, 48–58 (2015)
13. Chowdhary P.K., Keshavan N., Nguyen H.Q., Peterson J.A., Gozález J.E., Hainez D.C.: *Bacillus megaterium* CYP102A1 oxidation of acyl homoserine lactones and acyl homoserines. *Biochemistry*, **46**, 14429–14437 (2007)
14. Chu W., Vattem D.A., Maitin V., Barnes M.B., McLean R.J.: Bioassays of quorum sensing compounds using *Agrobacterium tumefaciens* and *Chromobacterium violaceum*. *Methods Mol. Biol.* **692**, 3–19 (2011)
15. Christensen Q.H., Grove T.L., Booker S.J., Greenberg E.P.: A high-throughput screen for quorum-sensing inhibitors that target acyl-homoserine lactone synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 13815–13820 (2013)
16. Chung P.Y., Toh Y.S.: Anti-biofilm agents: recent breakthrough against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. *Pathog. Dis.* **70**, 231–239 (2014)
17. Cowan M.M.: Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 564–582 (1999)
18. de Kievit T.R., Iglewski B.H.: Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect. Immun.* **68**, 4839–4849 (2000)
19. Desouky S.E., Nishiguchi K., Zendo T., Igarashi Y., Williams P., Sonomoto K., Nakayama J.: High-throughput screening of inhibitors targeting Agr/Fsr quorum sensing in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 923–927
20. Dong Y.H., Gusti A.R., Zhang Q., Xu J.L., Zhang L.H.: Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1754–1759 (2002)
21. Draganov D.I., Teiber J.F., Speelman A., Osawa Y., Sunahara R., La Du B.N.: Human paroxonases (PON1, PON2 and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J. Lipid. Res.* **46**, 1239–1247 (2005)
22. Fuqua W.C., Winans S.C., Greenberg E.P.: Quorum sensing in bacteria – LuxR-LuxI family of cell density response transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* **176**, 269–275 (1994)
23. Giménez-Bastida J.A., Truchado P., Larrosa M., Espín J.C., Tomás-Barberán F.A., Allende A., García-Conesa M.T.: Urolithins, ellagitannin metabolites produced by colon microbiota, inhibit quorum sensing in *Yersinia enterocolitica*: phenotypic response and associated molecular changes. *Food Chem.* **132**, 1465–1474 (2012)
24. Givskov M., de Nys R., Manefield M., Gram L., Maximilien R., Eberl L., Molin S., Steinberg P.D., Kjelleberg S.: Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signaling. *J. Bacteriol.* **178**, 6618–6622 (1996)
25. Grandclément C., Tannières M., Moréra S., Dessaux Y., Faure D.: Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiol. Rev.* **40**, 86–116 (2015)
26. Gutierrez J.A., Crowder T., Rinaldo-Matthis A., Ho M.C., Almo S.C., Schramm V.L.: Transition state analogs of 5'-methylthioadenosine nucleosidase disrupt quorum sensing. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 251–257 (2009)
27. Hajipour M.J., Fromm K.M., Ashkarran A.A., Jimenez de Aberasturi D., de Larramendi I.R., Rojo T., Serpooshan V., Parak W.J., Mahmoudi M.: Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Microbiol.* **30**, 499–511 (2012)
28. He Y.W., Zhang L.H.: Quorum-sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 842–857 (2008)
29. Heggers J.P., Cottingham J., Gusman J., Reagor L., McCoy L., Carino E., Cox R., Zhao J.G.: The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent: II. Mechanism of action and *in vitro* toxicity. *J. Altern. Complement. Med.* **8**, 333–340 (2002)
30. Hidalgo-Romano B., Gollihar J., Brown S.A., Whiteley M., Valenzuela E. Jr., Kaplan H.B., Wood T.K., McLean R.J.: Indole inhibition of N-acylated homoserine lactone mediated quorum signalling is widespread in Gram-negative bacteria. *Microbiology*, **160**, 2464–2473 (2014)
31. Holden M.T., Williams P. i wsp.: Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **33**, 1254–1266 (1999)
32. Hogan D.A., Vik A., Kolter R.: A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Mol. Microbiol.* **54**, 1212–1223 (2004)
33. Hornby J.M., Jensen E.C., Lisec A.D., Tasto J.J., Jahnke B., Shoemaker R., Dussault P., Nickerson K.W.: Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2982–2992 (2001)
34. Huang J.J., Han J.L., Zhang L.H., Leadbetter J.R.: Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5941–5949 (2003)
35. Hughes D.T., Sperandio V.: Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 111–120 (2008)
36. Husain F.M., Ahmad I., Asif M., Tahseen Q.: Influence of clove oil on certain quorum-sensing-regulated functions and biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* and *Aeromonas hydrophila*. *J. Biosci.* **38**, 835–844 (2013)
37. Imperi F., Leoni L., Visca P.: Antivirulence activity of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* **5**, 178 (2014)
38. Jimenez P.N., Koch G., Thompson J.A., Xavier K.B., Cool R.H., Quax W.J.: The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**, 46–65 (2010)
39. Jakobsen T.H., Givskov M. i wsp.: Ajoene, a sulfur-rich molecule from garlic, inhibits genes controlled by quorum sensing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 2314–2325 (2012)
40. Kalia V.C.: Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnol. Adv.* **31**, 224–245 (2013)
41. Kalia V.C., Purohit H.J.: Quenching the quorum sensing system: potential antibacterial drug targets. *Crit. Rev. Microbiol.* **37**, 121–140 (2011)
42. Kalishwaralal K., BarathManiKanth S., Pandian S.R., Deepak V., Gurunathan S.: Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Coll. Sur. B. Biointerfaces* **79**, 340–344 (2010)
43. Kato N., Morohoshi T., Nozawa T., Matsumoto H., Ikeda T.: Control of gram-negative bacterial quorum-sensing with cyclodextrin immobilized cellulose ether gel. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **56**, 55–59 (2006)
44. Kim J.S., Cho M. H. i wsp.: Antibacterial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*, **3**, 95–101 (2007)
45. Kim J., Park W.: Indole inhibits bacterial quorum sensing transmission by interfering with quorum sensing regulator folding. *Microbiology*, **159**, 2616–2625 (2013)



46. Koh K.H., Tham F.Y.: Screening of traditional Chinese medicinal plants for quorum-sensing inhibitors activity. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **44**, 144–148 (2011)
47. Köhler T., Perron G.G., Buckling A., van Delden C.: 2010. Quorum sensing inhibition selects for virulence and cooperation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.* **6**, e1000883 (2010)
48. Kurek A., Grudniak A.M., Kraczkiewicz-Dowjat A., Wolska K.I.: New antibacterial therapeutics and strategies. *Pol. J. Microbiol.* **60**, 3–12 (2011)
49. LaSarre B., Federle M.J.: Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **77**, 73–111 (2013)
50. Le K.Y., Otto M.: Quorum-sensing regulation in staphylococci – an overview. *Front. Microbiol.* **6**, 1174 (2015)
51. Lee J.H., Wood T.K., Lee J.: Roles of indole as an interspecies and interkingdom signalling molecule. *Trends Microbiol.* **23**, 707–718 (2015)
52. Lequette Y., Greenberg E.P.: Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J. Bacteriol.* **187**, 37–44 (2005)
53. Levy S.B.: The challenge of antibiotic resistance. *Sci. Am.* **278**, 46–53 (1998)
54. Li M.Y., Ni N.T., Chou H.T., Lu C.D., Tai P.C., Wang B.: Structure-based discovery and experimental verification of novel AI-2 quorum sensing inhibitors against *Vibrio harveyi*. *Chem-medchem.* **3**, 1242–1249 (2008)
55. Lin Y.H., Xu J.L., Hu J., Wang L.H., Ong S.L., Leadbetter J.R., Zhang L.H.: Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol. Microbiol.* **47**, 849–860 (2003)
56. Liu H.B., Koh K.P., Kim J.S., Seo Y., Park S.: The effects of betonicine, floridoside and isethionic acid from the red alga *Ahnfeltiopsis flabelliformis* on quorum-sensing activity. *Biotechnol. Bioproc. E*, **13**, 458–463 (2008)
57. Lok C.N., Ho C.M., Chen R., He Q.Y., Yu W.Y., Sun H., Tam P.K. Chiu J.F., Che C.M.: Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J. Prot. Res.* **5**, 916–924 (2006)
58. Lyon G.J., Maryville P., Muir T.W., Novick R.P.: Rational design of a global inhibitor of the virulence response in *Staphylococcus aureus* based in part on localization of the site of inhibition to the receptor-histidine kinase, ArgC, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **97**, 13330–13335 (2000)
59. Lyon G.J., Wright J.S., Christopoulos A., Novick R.P., Muir T.W.: Reversible and specific extracellular antagonism of receptor-histidine kinase signaling. *J. Biol. Chem.* **277**, 6247–6253 (2002)
60. Manefield M., de Nys R., Kumar N., Read R., Givskov M., Steinberg P., Kjelleberg S.: Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology*, **145**, 283–291 (1999)
61. Manefield M., Rasmussen T.B., Henzter M., Andersen J.B., Steinberg P., Kjellenberg S., Givskov M.: Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology*, **148**, 1119–1127 (2002)
62. Maness P.C., Smolinski S., Blake D.M., Huang Z., Wolfrum E.J., Jacoby W.A.: Bactericidal activity of photocatalytic TiO<sub>2</sub> reaction: Toward an understanding of its killing mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4094–4098 (1999)
63. Markowska K., Grudniak A.M., Wolska K.I.: Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. *Acta Biochim. Pol.* **60**, 523–530 (2013)
64. Markowska K., Grudniak A.M., Krawczyk K., Wróbel I., Wolska K.I.: Modulation of antibiotic resistance and induction of a stress response in *Pseudomonas aeruginosa* by silver nanoparticles. *J. Med. Microbiol.* **63**, 849–854 (2014)
65. McInnis C.E., Blackwell H.E.: Thiolactone modulators of quorum sensing revealed through library design and screening. *Bioorg. Med. Chem.* **19**, 4820–4828 (2011)
66. Miao C., Liu F., Zhao Q., Jia Z., Song S.: A proteomic analysis of *Arabidopsis thaliana* seedling responses to 3-oxo-octanoyl-homoserine lactone, a bacterial quorum-sensing signal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **427**, 293–298 (2012)
67. Miller K.P., Wang L., Chen Y.P., Pellechia P.J., Benicewicz B.C., Decho A.W.: Engineering nanoparticles to silence bacterial communication. *Front. Microbiol.* **6**, 189 (2015)
68. Monnet V., Juillard V., Gardan R.: Peptide conversations in Gram-positive bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **8**, 1–13 (2014)
69. Nakayama J., Uemura Y., Nishiguchi K., Yoshimura N., Igarashi Y., Sonomoto K.: Ambuic acid inhibits the biosynthesis of cyclic peptide quorumones in gram-positive bacteria. *Antimicrob. Agents Chem.* **53**, 580–586 (2009)
70. Nathan C., Cunningham-Bussel A.: Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 349–361 (2013)
71. Nealon K.H., Platt T., Hastings J.W.: Cellular control of synthesis and activity of bacterial luminescent system. *J. Bacteriol.* **104**, 313–322 (1970)
72. Ng W.L., Bassler B.L.: Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 197–222 (2009)
73. Oschner U.A., Koch A.K., Flechter A., Reiser J.: Isolation and characterisation of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **176**, 2004–2054 (1994)
74. Palliyil S., Downham C., Broadbent I., Charlton K., Porter A.J.: High-sensitivity monoclonal antibodies specific for homoserine lactones protect mice from lethal *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 462–469 (2014)
75. Park J., Jagasia R., Kaufmann G.F., Mathison J.C., Ruiz D.I., Moss J.A., Meijler M.M., Ulevitch R.J., Jada K.D.: Infection control by antibody disruption of bacterial quorum sensing signaling. *Chem. Biol.* **14**, 1119–1127 (2007)
76. Park J., Kaufmann G.F., Bowen J.P., Arbiser J.L., Janda K.D.: Solenopsin A, a venom alkaloid from the fire ant *Solenopsis invicta*, inhibits quorum-sensing signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Dis.* **198**, 1198–1201 (2008)
77. Parsek M.R., Val D.L., Hanzelka B.L., Cronan J.E., Greenberg E.P.: Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 4360–4365 (1999)
78. Passador L., Cook J.M., Gambello M.J., Rust L., Iglewski B.H.: Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science*, **260**, 1127–1130 (1993)
79. Pereira C.S., Thompson J.A., Xavier K.B.: AI-2-mediated signaling in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**, 156–181 (2013)
80. Pesci E.C., Milbank J.B., Pearson J.P.: Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 11229–11234 (1999)
81. Peters L., Konig G.M., Wrigh A.D.: Secondary metabolites of *Flustra foliacea* and their influence on bacteria. *Appl. Environ. Microb.* **69**, 3469–3475 (2003)
82. Platt T.G., Fuqua C.: What's in the name? The semantics of quorum sensing. *Trends Microbiol.* **18**, 383–387 (2010)
83. Pustelny C., Albers A., Büldt-Karentzopoulos K., Parschat K., Chhabra S.R., Cámara M., Williams P., Fetzner S.: Dioxxygenase-mediated quenching of quinolone-dependent quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem. Biol.* **16**, 1259–1267 (2009)
84. Quave C.L., Plano L.R., Pantuso T., Bennett B.C.: Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.* **118**, 418–428 (2008)

85. Rai M., Yadav A., Gade A.: Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol. Adv.* **27**, 76–83 (2009)
86. Radzig M.A., Nadtochenko V.A., Koksharova O.A., Kiwi J., Lipasova V.A., Khmel I.A.: Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, **102**, 300–306 (2013)
87. Rasko D.A., Sperandio V.: Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 117–128 (2010)
88. Rendueles O., Kaplan J.B., Ghigo J.M.: Antibiofilm polysaccharides. *Environ. Microbiol.* **15**, 334–346 (2013)
89. Reuter K., Steinbach A., Helms V.: Interfering with bacterial quorum sensing. *Perspect. Medicin. Chem.* **8**, 1–15 (2016)
90. Schuster M., Sexton D.J., Diggle S.P., Greenberg E.P.: Acyl-homoserine lactone quorum sensing: from evolution to application. *Annu. Rev. Microbiol.* **67**, 43–63 (2013)
91. Scutera S., Zucca M., Savoia D.: Novel approaches for the design and discovery of quorum-sensing inhibitors. *Expert. Opin. Drug Discov.* **9**, 353–366 (2014)
92. Singh P.K., Schaefer A.L., Parsek M.R., Moninger T.O., Welsh M.J., Greenberg E.P.: Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature*, **407**, 762–764 (2000)
93. Singh B.R., Singh B.N., Singh A., Khan W., Naqvi A.H., Singh H.B.: Mycofabricated biosilver nanoparticles interrupt *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing systems. *Sci. Rep.* **5**, 13719 (2015)
94. Skindersoe M.E., Alhede M., Phipps R., Yang L., Jensen P.O., Rasmussen T.B., Bjarnsholt T., Tolker-Nielsen T., Høiby N., Giskov M.: Effects of antibiotics on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 3648–3663 (2008)
95. Skindersoe M.E., Ettinger-Epstein P., Rasmussen T.B., Bjarnsholt T., de Nys R., Givskov M.: Quorum sensing antagonism from marine organisms. *Mar. Biotechnol.* **10**, 56–63 (2008)
96. Sofer D., Gilboa-Garber N., Belz A., Garber N.C.: „Subinhibitory” erythromycin represses production of *Pseudomonas aeruginosa* lectins, autoinducer and virulence factors. *Chemotherapy*, **45**, 335–341 (1999)
97. Sully E.K., Gresham H.D. i wsp.: Selective chemical inhibition of *agr* quorum sensing in *Staphylococcus aureus* promotes host defense with minimal impact on resistance. *PloS Pathog.* **10**, e1004174 (2014)
98. Themmozhi R., Nithyanad P., Rathna J., Pandin S.: Antibiofilm activity of coral-associated bacteria against different clinical M serotypes of *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **57**, 284–294 (2009)
99. Uroz S., Heinonsalo J.: Degradation of N-acyl homoserine lactone quorum sensing signal molecules by forest root-associated fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* **65**, 271–278 (2008)
100. Vatter D.A., Mihalik K., Crixell S.H., McLean R.J.: Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors. *Fitoterapia*, **78**, 302–310 (2007)
101. Vuong C., Gerke C., Somerville G.A., Fischer E.R., Otto M.: Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Infect. Dis.* **188**, 706–718 (2003)
102. Wagner V.E., Bushnell D., Passador L., Brooks A.I., Iglewski B.H.: Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J. Bacteriol.* **185**, 2080–2095 (2003)
103. Whitehead N.A., Barnard A.M., Slater H., Simpson N.J., Salmund G.P.: Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 365–404 (2001)
104. Widmer K.W., Soni K.A., Hume M.E., Beier R.C., Jesudhasan P., Pillai S.D.: Identification of poultry meat-derived fatty acids functioning as quorum-sensing signal inhibitors to auto-inducer-2 (AI-2). *J. Food Sci.* **72**, M363–368 (2007)
105. Wolska K.I., Grudniak A.M., Kamiński K., Markowska K.: The potential of metal nanoparticles for inhibition of bacterial biofilms (w) Nanotechnology in Diagnosis, Treatment and Prophylaxis of Infectious Diseases, red. M. Rai, K. Kon, Elsevier, Amsterdam, 2015, s. 119–132
106. Wolska K.I., Grudniak A.M., Rudnicka Z., Markowska K.: Genetic control of bacterial biofilms. *J. Appl. Genetics*, DOI: 10.1007/s13353-015-0309-2 (2015)
107. Wolska K.I., Grześ K., Kurek A.: Synergy between novel antimicrobials and conventional antibiotics and bacteriocins. *Pol. J. Microbiol.* **61**, 95–104 (2012)
108. Zhang H.B., Wang L.H., Zhang L.H.: Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 4638–4643 (2002)
109. Zhang G., Zhang F., Ding G., Li J., Guo X., Zhu J., Zhou L., Cai S., Liu X., Luo Y., Zhang G., Shi W., Dong X.: Acyl homoserine lactone-based quorum sensing in a methanogenic archaeon. *ISME J.* **6**, 1336–1344 (2012)

Małgorzata Łyszcz<sup>1</sup>, Anna Gałązka<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa, Państwowy Instytut BadawczyWpłynęło w listopadzie 2015 r.  
Zaakceptowano w lutym 2016 r.

1. Wstęp. 2. Metody klasyczne stosowane do identyfikacji bakterii. 3. Metody molekularne stosowane do identyfikacji mikroorganizmów glebowych. 4. Analiza zawartości zasad G+C w DNA. 5. Hybrydyzacja kwasów nukleinowych. 6. Analiza sekwencji kwasów nukleinowych. 7. Podsumowanie

#### Selected molecular methods used in assessing the biodiversity of soil organisms

**Abstract:** Biodiversity and the identification of new important features of microorganisms is crucial for the development of biotechnology. The current knowledge about microbes in natural environments is limited, thus the analysis of the microbial diversity in nature is not an easy task. So far, only a small percentage of prokaryotic microorganisms has been identified. It is believed that the soil environment is one of the richest reservoirs of microorganisms, as approximately 2 000 to 18 000 prokaryotic genomes can be isolated from one gram of soil. In this publication the selected methods used to identify microorganisms are presented. The first molecular marker used in the genetic identification of soil microorganisms was the analysis of the G+C base content, since microorganisms exhibit differences in the (G+C)/(A+T) relative factor. Another method used to identify bacteria is the nucleic acid hybridization. This technique involves a determination of the degree of similarity of DNA-DNA between two organisms. One of the most frequently used hybridization technique is FISH – fluorescent in situ hybridization. The most precise method for analyzing the nucleic acids is sequencing, i.e. determining the order of nucleotides which form the genetic information of the microorganism studied. Very often in molecular studies the 16S rDNA molecule is subjected to sequencing.

1. Introduction. 2. Classical methods used to identify bacteria. 3. Molecular methods used in the identification of soil microorganisms. 4. Analysis of the G+C DNA content. 5. Nucleic acid hybridization. 6. Analysis of nucleic acid sequences. 7. Summary

**Słowa kluczowe:** bioróżnorodność, hybrydyzacja, sekwencjonowanie, techniki molekularne

**Key words:** biodiversity, hybridization, sequencing, molecular techniques

## 1. Wstęp

Dysponujemy wieloma definicjami biologicznej różnorodności, jednak najprościej można określić ją jako całe bogactwo form życia występujących na Ziemi [86]. W 1992 roku na szczycie ONZ w Rio de Janeiro uchwalono Konwencję o Różnorodności Biologicznej (Convention on Biological Diversity, CBD). Pojęcie to definiowane jest jako „różnicowanie wszystkich żywych organizmów pochodzących z ekosystemów lądowych, morskich i innych wodnych oraz zespołów ekologicznych. Dotyczy to różnorodności w obrębie gatunku, pomiędzy gatunkami oraz ekosystemami” [4, 21, 30, 49, 86]. Istnieją trzy aspekty bioróżnorodności, a mianowicie środowisko (ekosystem), gatunki i geny. Różnorodność genetyczna określa różnorodność biologiczną na poziomie molekularnym. Carl Woese [99] schematycznie podzielił wszystkie organizmy żywe są

na trzy domeny: *Archaea*, *Bacteria* i *Eucaryota* dzięki badaniom, które opierały się na analizie sekwencji genu kodującego rybosomalne RNA. Królestwo *Monera* obejmujące dwie domeny: bakterie i archeony sklasyfikowane zgodnie z teorią Woese. Teoria pięciu królestwo koncentruje się na różnorodności gatunkowej, podczas gdy teoria trzech domen koncentruje się na różnorodności genetycznej. Z powodu mikroskopijnych rozmiarów bakterii, trudno jest ocenić ich stopień różnorodności genetycznej, który jest odzwierciedleniem różnorodności cząsteczek budujących komórkę [86]. W dniu 15 maja 2015 roku liczba opisanych i umieszczonych na oficjalnej liście gatunków, obejmujących bakterie i archeony wynosiła 15 974 [58]. Isaac Newton powiedział „Co my wiemy to tylko kropelka. Czego nie wiemy, to cały ocean” [15]. Zgodnie z tym, obecnie poznane gatunki mikroorganizmów stanowią zaledwie niewielki procent różnorodności form żywych.

\* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa, Państwowy Instytut Badawczy, ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy; tel. 81 478 69 50; e-mail: [agalazka@iung.pulawy.pl](mailto:agalazka@iung.pulawy.pl)

Uważa się, że do chwili obecnej udało się scharakteryzować i wyhodować w warunkach laboratoryjnych zaledwie jedną setną lub też dużo mniejszą ilość organizmów prokariotycznych. Jak podaje literatura poznano około 12% bakterii i 5% grzybów [17, 19, 20, 29]. Niska liczba dotychczas sklasyfikowanych mikroorganizmów wynika po pierwsze z trudności w ich izolacji w postaci czystych kultur, a po drugie z ograniczonej wiedzy na temat metod oznaczania genomowych i fenotypowych cech osobniczych [36, 65].

Najbogatszym rezerwuarem mikroorganizmów jest środowisko naturalne ze szczególnym uwzględnieniem gleby. Jeden gram gleby leśnej zawiera szacunkowo  $4 \times 10^7$  prokariotycznych komórek podczas gdy jeden gram uprawianej gleby i łąki zawiera około  $2 \times 10^9$  prokariotycznych komórek. Genomowe DNA wyizolowane bezpośrednio z gleby, wskazuje na to, iż w 1 gramie gleby znajduje się około 2 000 do 18 000 genomów prokariotycznych [16, 91, 92].

Gleba jest układem wysoce złożonym i bogatym pod względem liczebności i różnorodności mikroorganizmów. Mikroorganizmy odgrywają kluczową rolę w prawidłowym przebiegu większości procesów zachodzących w glebie m.in. w obiegu podstawowych pierwiastków, rozkładzie ksenobiotyków, przebiegu podstawowych cykli biogeochemicznych. Mikroorganizmy stanowią wysoce zróżnicowaną grupę organizmów żywych, stanowiącą blisko 60% całej ziemskiej biomasy z czego  $5 \times 10^{30}$  komórek występuje w środowisku glebowym. Stanowi to ogromny i nie do końca poznany, bardzo zróżnicowany genetycznie świat drobnoustrojów [35, 68].

Wszystkie wyżej wymienione aspekty oraz genetyczna różnorodność drobnoustrojów glebowych stwarzają duże pole do działania dla mikrobiologów poszukujących nowych szczepów o różnych właściwościach metabolicznych [17, 29].

## 2. Metody klasyczne stosowane do identyfikacji bakterii

Rozwój technik badawczych umożliwił precyzyjne klasyfikowanie i właściwe identyfikowanie badanych drobnoustrojów. Obecnie taksonomia bakterii oparta jest na badaniach wielokierunkowych, które dotyczą danych uzyskanych z analizy cech fenotypowych, genomowych, a także z analizy filogenetycznej [13, 14, 29, 82, 94].

Dane fenotypowe identyfikacji mikroorganizmów glebowych służą do:

- cech morfologicznych np. kształt czy wynik barwienia metodą Grama;
- cech fizjologicznych i biochemicznych np. zdolność do wzrostu w różnych zakresach pH, obecność lub brak aktywności enzymów;

- danych z analiz serologicznych np. różnice w budowie antygenów rzęskowych, somatycznych i powierzchniowych;
- danych z analiz chemotaksonomicznych np. skład chemiczny ściany komórkowej, skład kwasów tłuszczowych [36, 41, 71, 82, 94].

Z kolei źródłem informacji genomowych są kwasy nukleinowe DNA i RNA, a najczęściej wykorzystywanymi markerami filogenetycznymi są konserwatywne sekwencje DNA: 16S rDNA i 23S rDNA oraz sekwencje genów podstawowych szlaków metabolicznych tj.: *dnaK*, *amoA*, *gyrA*, *rpoD*, *recA* [6, 16, 31, 34, 55, 82, 96, 98].

W badaniach taksonomicznych wykorzystywane są zarówno klasyczne techniki hodowlane jak i techniki molekularne. Obowiązuje określony schemat trójpoziomowej piramidy przedstawiającej trzy etapy obecnie przeprowadzanych badań w identyfikacji drobnoustrojów (rys. 1) [34, 64, 97]. W niniejszej piramidzie wyróżniamy trzy poziomy badań, a każdy kolejny jej poziom dostarcza bardziej szczegółowych informacji i zawęża liczbę izolatów poddawanych analizie [34, 63, 64, 94, 97].



Rys. 1. Trzy etapy badań wykorzystywane w celu ustalenia pozycji taksonomicznej badanych szczepów [34] (zmodyfikowano).

DDH – hybrydyzacja DNA-DNA

Podstawą piramidy są metody przesiewowe tzw. screening. Mają one na celu szybkie zróżnicowanie dużej liczby izolatów mikroorganizmów glebowych i pogrupowanie ich w zależności od stopnia podobieństwa. W tym celu do badań użyte są testy biochemiczne, fizjologiczne oraz metody typowania oparte o analizę DNA [34, 64, 94]. Kolejnym szczeblem piramidy jest ustalenie pozycji filogenetycznej poszczególnych grup (scharakteryzowanych na podstawie poprzedniego poziomu) w oparciu o analizę porównawczą sekwencji genu 16S rRNA. Ostatni etap badań to oznaczenie metodą hybrydyzacji stopnia podobieństwa DNA-DNA i oznaczenie przynależności gatunkowej badanego szczepu [34, 65, 94, 97].

### 3. Metody molekularne stosowane do identyfikacji mikroorganizmów glebowych

Przez wiele lat identyfikacja mikroorganizmów dotyczyła metod opartych na podłożach hodowlanych [52]. W latach osiemdziesiątych XX wieku wraz z rozwojem technik molekularnych nastąpił intensywny postęp w badaniach z zakresu mikrobiologii. Okazało się, że w przypadku bakterii glebowych jedynie około 0,1% do 1% może wyrosnąć na tradycyjnych podłożach mikrobiologicznych [46, 87, 91].

Znaczna większość aktywnych metabolicznie mikroorganizmów glebowych jest niezdolna do wzrostu w postaci kolonii na selektywnych podłożach agarowych. Szacuje się że zaledwie ok. 1% z  $10^9$  komórek bakteryjnych występujących w 1 g gleby jest zdolnych do wzrostu na sztucznych podłożach mikrobiologicznych. W latach 90. XX wieku po raz pierwszy w literaturze pojawiło się określenie mikroorganizmów „żywych, lecz niedających się hodować” (VBNC – viable but nonculturable) [31, 64, 65]. Istnieje zatem potrzeba opracowania szybkich, czułych i rzetelnych metod dających możliwość zarówno bezpośredniej oceny pełnego obrazu mikrobiologicznego z pominięciem etapu hodowli, jak i identyfikacji wcześniej wyhodowanego drobnoustroju. Stosowanie bowiem klasycznych metod mikrobiologicznych opartych na analizie cech fenotypowych drobnoustrojów pozwala jedynie na określenie zaledwie 1–10% składu populacji mikroorganizmów glebowych [31].

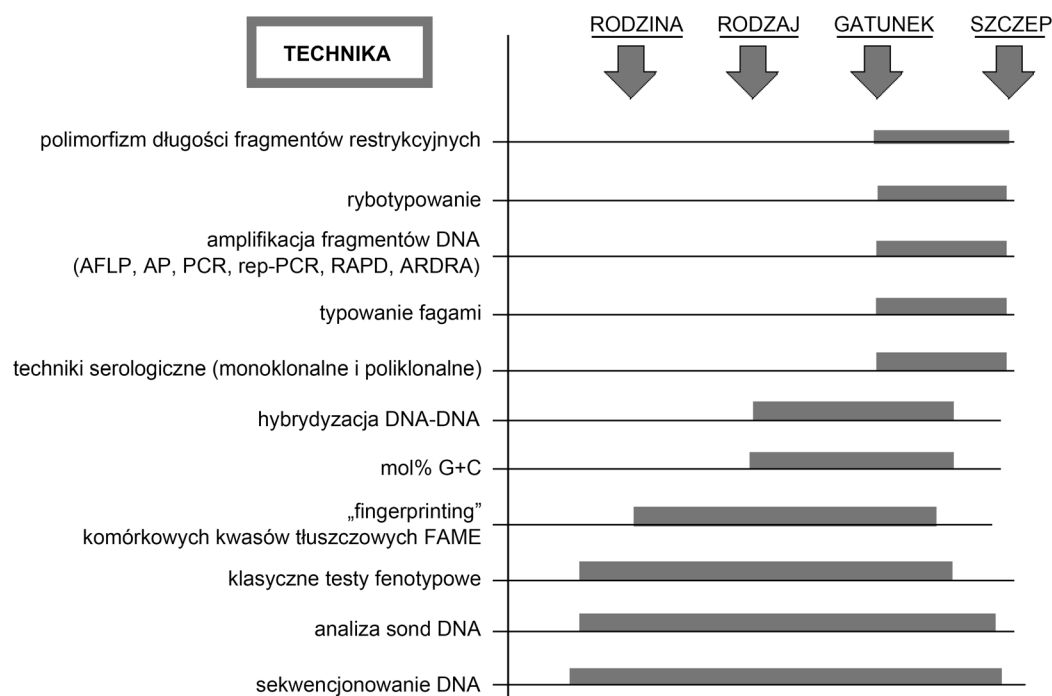
Badanie genomu drobnoustrojów stało się dopełnieniem metod fenotypowych, a nawet nadrzędnym narzędziem w identyfikacji bakterii. Metody geno-

mowe oparte na technologii badań molekularnych, nie zależą od warunków hodowli i są bardziej powtarzalne w porównaniu do metod klasycznej analizy fenotypowej. Dodatkowym aspektem przemawiającym za przewagą metod genomowych jest fakt, iż kwasy nukleinowe występują u wszystkich żywych organizmów [36, 82, 94].

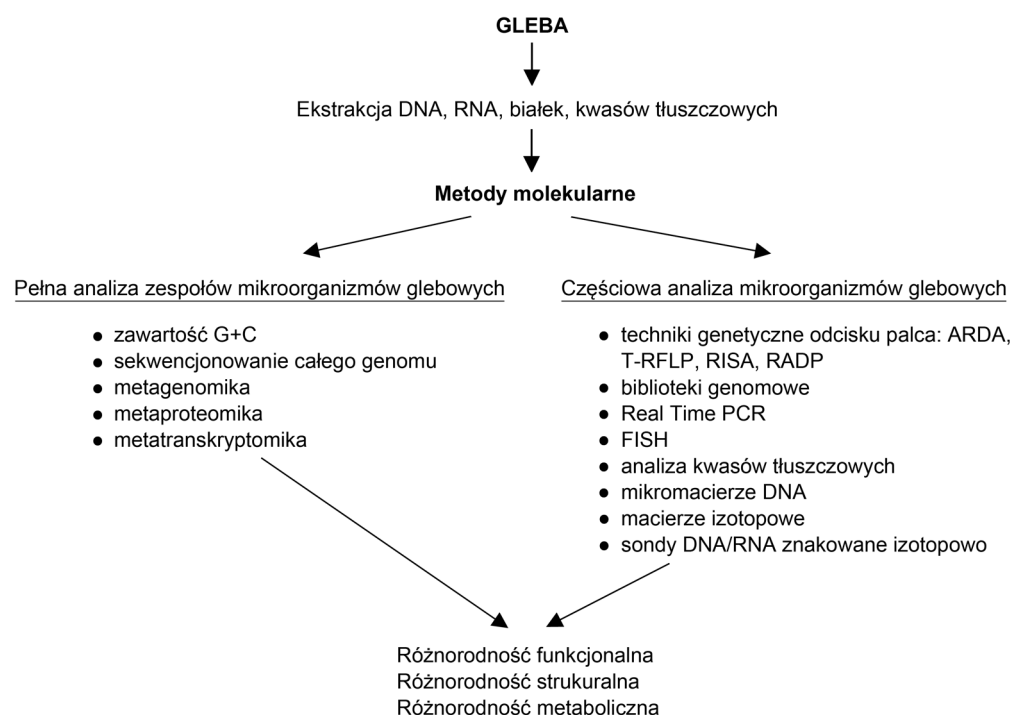
U podstaw metod molekularnych leży detekcja makrocząsteczek (kwasów nukleinowych, białek, kwasów tłuszczowych) występujących w organizmach żywych [31]. Dodatkową zaletą tych metod jest możliwość bezpośredniej ekstrakcji tych cząstek z gleby, bez konieczności hodowli mikroorganizmów. Ilościowe lub jakościowe zmiany w obrębie tych cząsteczek świadczą o bezpośrednich zmianach w zespołach mikroorganizmów w reakcji na biotyczne i abiotyczne czynniki środowiska [31, 65].

Wykorzystywane w identyfikacji drobnoustrojów glebowych metody molekularne charakteryzują się zróżnicowaną rozdzielczością, czyli umożliwiają klasyfikowanie szczepów na różnych poziomach taksonomicznych tzn. od szczepu, przez gatunek do rodzaju i rodziny. Przykładowo sekwencjonowanie rDNA pozwala przyporządkować szczep do rodzaju, hybrydacja DNA-DNA klasyfikuje do rangi gatunku, a w obrębie gatunku szczepy różnicuje się w oparciu np. o polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów restrykcyjnych (AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism), (rys. 2) [13, 94].

Na przełomie ostatnich dziesięcioleci obserwuje się ogromny postęp w ocenie zróżnicowania drobnoustrojów. Jest to związane z intensywnym rozwojem szeregu



Rys. 2. Rozdzielczość metod stosowanych w identyfikacji bakterii [94], zmodyfikowano



Rys. 3. Metody molekularne stosowane w analizie zróżnicowania genetycznego mikroorganizmów glebowych [31]

zaawansowanych metod diagnostycznych opartych na analizie kwasów nukleinowych. Metody te umożliwiają charakterystykę mikroorganizmów na poziomie funkcjonalnym i filogenetycznym. Metody molekularne stosowane w analizie mikroorganizmów glebowych umożliwiają pełną analizę zespołu mikroorganizmów lub też częściową analizę charakterystycznej puli drobnoustrojów w oparciu o wybrane geny metabolizmu podstawowego (rys. 3) [31].

#### 4. Analiza zawartości zasad G+C w DNA

W DNA występują cztery zasady azotowe: dwie puryny: adenina (A) i guanina (G) oraz dwie pirymidyny: cytozyna (C) i tymina (T), których kolejność wyznacza informację genetyczną zawartą w genomie danego mikroorganizmu [82]. Określenie zawartości zasad guaniny i cytozyny (G+C) w DNA było jedną z pierwszych metod molekularnej charakterystyki mikroorganizmów [6, 26, 56, 90]. W połowie XX wieku opisano reguły dotyczące składu nukleotydowego DNA tzw. reguły Chargraffa [10]. Z przeprowadzonych badań wynikało, że: suma puryn (adenina – A i guanina – G) równa się sumie pirymidyn (cytozyna – C i tymina – T), stosunek molarny adeniny do tyminy równa się 1, a guaniny do cytozyny także wynosi 1, czyli zasady azotowe występujące w DNA znajdują się w równoważnych ilościach: stosunek A:T = 1 oraz G:C = 1 [10, 12, 28, 82].

Jednakże, względny współczynnik (G+C)/(A+T) wykazuje różnice w stosunku do badanych mikroorga-

nizmów, a dla danego gatunku jest on stały. Zawartość zasad G+C wyrażana jest w mol% a oblicza następującego wzoru [6, 82]:

$$\text{mol\% G+C} = \frac{\text{mol (G+C)}}{\text{mol (A+T+C+G)}} \times 100\%$$

Różnice zawartości zasad guaniny i cytozyny (G+C) jest wykorzystywana do badania różnorodności mikroorganizmów środowisk glebowych [48, 70]. W DNA prokaryota zawartość G+C waha się w granicach od 25 mol% do 75 mol% [26, 90]. Z gleby uprawnej zawierającej 2,3% substancji organicznej i 12% łu wyizolowano DNA różniący się zawartością zasad G+C, po czym porównano te wartości do znanych rodzajów drobnoustrojów glebowych i określono, iż zawartość zasad G+C równa 65% oznacza, że w glebie znajdowały się bakterie nie należące do rodzajów *Arthrobacter*, *Agrobacterium* i *Pseudomonas*, 69% wskazuje na *Streptomyces*, z kolei 45% wyróżnia *Bacillus* i *Streptococcus* [73]. Natomiast Nusslein i Tiedje [70] analizowali bioróżnorodność pastwisk i gleb leśnych używając metody określenia zawartości zasad G+C w połączeniu z techniką ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) i sekwencjonowaniem rDNA. Każda z zastosowanych metod pokazała, iż rośliny mają duży wpływ na kształtowanie się drobnoustrojów w środowisku glebowym. Autorzy stwierdzili, że wszystkie trzy metody badań społeczności mikroorganizmów charakteryzowały się innym poziomem rozdzielczości oraz, że metody te tworzą komplementarną grupę testów do dokładnego badania mikrobiologicznej różnorodności [29, 48].

Przyjęto, że organizmy ściśle ze sobą spokrewnione różnią się zawartością zasad G+C od 3 do 5 mol%, co wskazuje, że należą do tego samego gatunku [48, 56, 64, 65, 70, 82]. Natomiast w obrębie rodzaju różnica ta nie może przekraczać 10 mol% [64, 65, 82]. Teoretycznie im większa różnica w zawartości zasad G+C w DNA między dwoma organizmami, tym mniej są one ze sobą powiązane. Jednakże, należy zauważyć, że jakiegokolwiek różnice w mol% G+C są ważne w taksonomicznym określaniu grup, to podobieństwo zawartości zasad G+C niekoniecznie wskazuje na bliskie pokrewieństwo organizmów, ponieważ w oznaczeniach nie brane są po uwagę liniowe sekwencje w cząsteczkach. Z kolei niektóre rodzaje jak np. *Clostridium* (21–54 mol%) i *Bacillus* (32–69 mol%) wykazują dużą rozpiętość zawartości zasad G+C [6, 64, 65, 82]. Aspektem przemawiającym za metodą oznaczania zawartości zasad G+C jest fakt, że jest to analiza niezależna od techniki PCR, obejmuje cały wyizolowany DNA oraz jest to metoda ilościowa, która pozwala wykryć unikalne gatunki drobnoustrojów, jednak wymagane są duże ilości wyizolowanego genomowego DNA (do 50 µg) [26, 29, 56, 90].

## 5. Hybrydyzacja kwasów nukleinowych

Hybrydyzacja DNA jest miarą stopnia złożoności genetycznej drobnoustrojów i jest stosowana w celu oszacowania bioróżnorodności mikroorganizmów [91]. Hybrydyzacja kwasów nukleinowych to proces łączenia dwóch nici DNA lub RNA-DNA na podstawie komplementarności zasad. W metodzie oznaczania stopnia podobieństwa DNA-DNA pomiędzy dwoma organizmami wykorzystuje się właściwości fizykochemiczne dwuniciowych kwasów nukleinowych. Wiązania wodorowe w dwuniciowej cząsteczce kwasu nukleinowego mogą ulec rozerwaniu. Dwie nici mogą być rozdzielone do form jednoniciowych drogą denaturacji (wysoką temperaturą) lub w warunkach alkalicznego pH. Reakcja ta jest odwracalna, tzn. pojedyncze nici mogą ponownie zostać połączone (reasocjacja) na zasadzie komplementarności nukleotydów po powrocie do optymalnej temperatury (rys. 4) [63, 82]. Warunkiem reasocjacji jednoniciowych cząsteczek jest fakt, że różnica w sekwencji nukleotydowej nie może być większa niż 20% – a więc musi być spełniony warunek identyczności sekwencji sięgającej przynajmniej 80% [13, 63, 82].

W doświadczeniach, w których przeprowadzana jest hybrydyzacja dwóch cząsteczek, jedna z nich jest wyznakowana i tworzy tzw. sondę molekularną, która służy do identyfikacji sekwencji komplementarnych w materiale genetycznym wyizolowanym z mikroorganizmów. Sondy najczęściej znakuje się fluorescencyjnie np. fluoresceiną lub rodaminą ale, także można znakować radioaktywnym izotopem np. <sup>32</sup>P

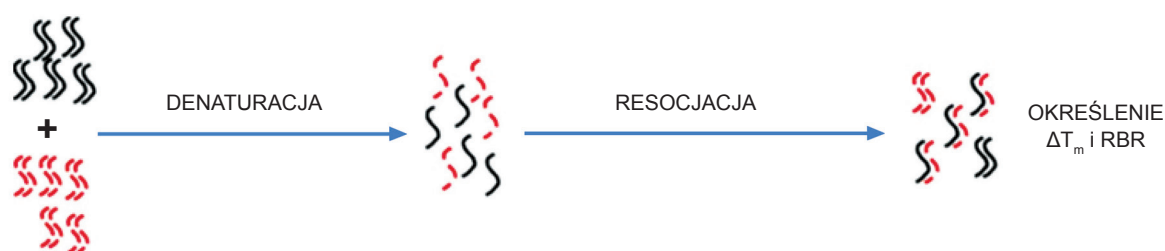
lub <sup>3</sup>H lub nieradioaktywnie np. digoskygeniną [6, 25, 27, 40, 73, 85, 89].

Wszystkie techniki hybrydyzacyjne używane do określania względnego podobieństwa drobnoustrojów, pomimo różnic metodycznych opierają się na tych samych podstawach. Izolaty DNA pochodzące z próbek środowiskowych miesza się ze sobą i denaturuje w celu uzyskania jednoniciowych struktur DNA. W ściśle określonych warunkach reakcji następuje reasocjacja i tworzenie cząsteczek hybrydowych. Im wyższe podobieństwo genetyczne dwóch badanych organizmów, tym więcej mają one wspólnych sekwencji nukleotydowych, a co za tym idzie powstaje więcej struktur hybrydowych. Porównanie wyników uzyskanych dla heterodupleksów z tymi dla referencyjnego DNA (homodupleksu), daje nam stopień podobieństwa DNA-DNA [27, 82, 89].

Wyróżniamy dwa główne parametry, które służą do pomiaru stopnia podobieństwa cząsteczek DNA: RBR oraz  $\Delta T_m$ .

- RBR (Relative Binding Ratio – względny współczynnik wiązania) to wskaźnik ilości heterodupleksów względem homodupleksów, które są wzorcem 100% reasocjacji.
- $\Delta T_m$  (różnica w temperaturze denaturacji termicznej dupleksów) to wskaźnik stabilności termicznej dupleksów DNA, czyli jest to różnica w temperaturze denaturacji homodupleksów i heterodupleksów. Stopień denaturacji DNA zależy od zawartości w nim zawartości G+C, siły jonowej roztworu oraz temperatury. Wartość  $T_m$  wskazuje na temperaturę, przy której 50% DNA znajduje się w stanie denaturowanym [39, 64, 82].

Hybrydyzacja genomowego DNA jest podstawą do klasyfikacji mikroorganizmów do rangi gatunku [64, 82]. Do jednego gatunku genomowego zaliczamy szczepy o wartości hybrydyzacji 70% i więcej oraz charakteryzujące się  $\Delta T_m$  mniejszą niż 5°C [20, 82, 94, 97]. Metodą hybrydyzacji oceniono różnorodność drobnoustrojów w 1 gramie różnych gleb i oszacowano ją na poziomie od 500 tysięcy do nawet 10 milionów genomów organizmów prokariotycznych [33]. Obecnie stosowanych jest kilka technik hybrydyzacji DNA-DNA, m.in. wprowadzona w latach 70. XX wieku hybrydyzacja w roztworze tzw. metoda De Ley'a, czy opisana pod koniec lat 80. metoda hybrydyzacji DNA wyznakowanego np. biotyną z DNA związanym kowalencyjnie do powierzchni specjalnej mikro płytki [18, 25, 63]. Hybrydyzacja może być również przeprowadzona na poziomie komórkowym i może być wykonana *in situ*. Ta metoda dostarcza cennych informacji dotyczących rozkładu przestrzennego mikroorganizmów w próbkach środowiskowych [42]. Jednym z najbardziej popularnych sposobów hybrydyzacji DNA jest technika FISH (fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*



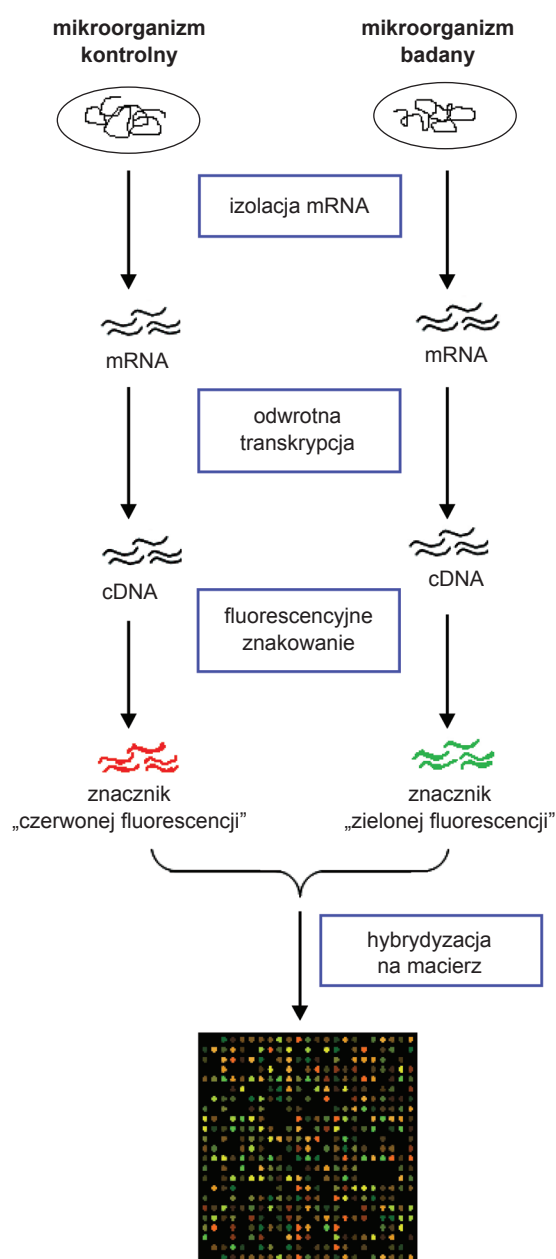
Rys. 4. Schemat przedstawiający hybrydyzację kwasów nukleinowych [82] (zmodyfikowano)

– fluorescent in situ hybridization). Za pomocą techniki FISH możemy określać rozkład przestrzenny bakterii w różnych środowiskach, takich jak np. biofilm [85]. Ograniczeniem hybrydyzacji FISH jest fakt, że bezpośrednio badanie próbek środowiskowych wyka-

zuje niską czułość. Związane jest to z obecnością małej liczby kopii sekwencji pochodzących z gatunków dominujących, które prawdopodobnie nie zostaną wykryte. Rozwiązaniem problemu jest technika PCR, gdzie DNA uzyskany bezpośrednio ze środowiska będzie stanowił matrycę w reakcji PCR i zostanie zamplifikowany [48].

W identyfikacji mikroorganizmów i badaniu bioróżnorodności coraz częściej używa się metody łączącej hybrydyzację DNA-DNA z mikromacierzami DNA z ang. microarray (inaczej DNA chip). Metoda mikromacierzy DNA opiera się na klasycznych technikach hybrydyzacyjnych używanych do analizy ekspresji genów. Wyznakowana próbka (badany materiał mikrobiologiczny) jest umieszczana na płytce zawierającej sondy DNA o znanej sekwencji nukleotydowej. Następnie płytka taka poddawana jest skanowaniu przez czytnik laserowy, co w efekcie daje punkty świecące z różną intensywnością co spowodowane jest występowaniem charakterystycznych sond dla określonych genów. Następnym etapem jest przyporządkowanie każdemu punktowi liczby określającej natężenie fluorescencji. Uzyskane w ten sposób dane liczbowe poddawane są analizie bioinformatycznej [5, 11, 44, 56, 62].

Mikromacierze DNA określane są jako uporządkowane zbiory fragmentów genów (sond molekularnych) (rys. 5). Zbiory te występują w postaci jednoniciowych odcinków DNA, charakteryzujących się różną długością, skorelowaną z typem mikromacierzy [44]. Mikromacierze zbudowane są z kilku tysięcy punktów unieruchomionych w określonych miejscach na podłożu, z których każdy zawiera fragmenty DNA, czyli pojedyncze sondy. Obecnie używane technologie wytwarzania mikromacierzy zawierają sondy oligonukleotydowe lub sondy cDNA [44, 56, 62, 100]. Technika ta umożliwia porównanie profili ekspresji genów komórek, tkanek, organizmów pod wpływem różnych czynników. Metoda charakteryzuje się możliwością jednoczesnego analizowania tysięcy genów [22, 62, 84]. Mikromacierze mogą posiadać charakterystyczne geny tzw. tarcze w postaci np. reduktazy azotanowej czy też nitrogenazy, dzięki czemu możliwe jest precyzyjne określenie różnorodności mikrobiologicznej. Macierze mogą, także zawierać fragmenty DNA, pochodzące od referencyjnych gatunków występujących w próbkach środowiskowych [38, 56].

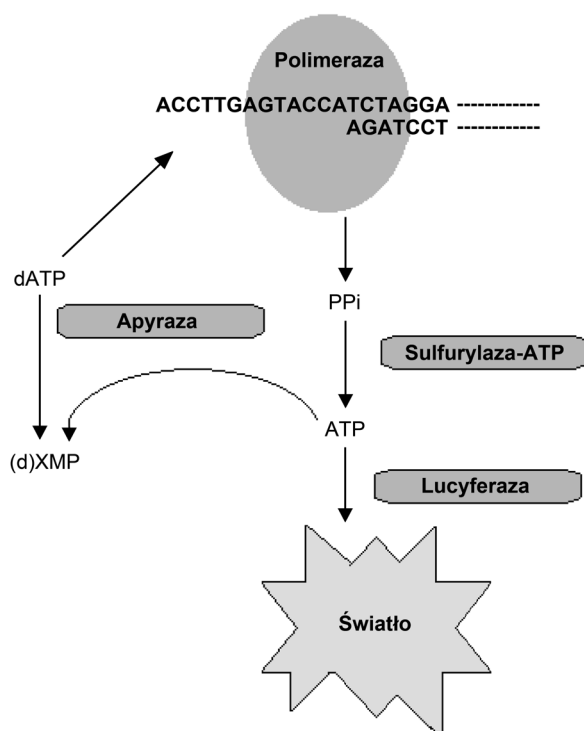


Rys. 5. Schemat techniki z wykorzystaniem mikromacierzy [5, 95] (zmodyfikowano)

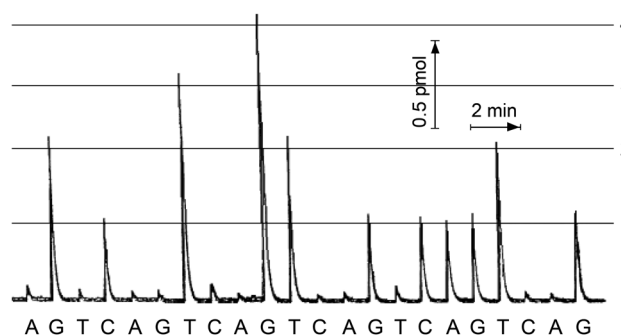


## 6. Analiza sekwencji kwasów nukleinowych

Sekwencjonowaniem nazywamy ustalenie kolejności nukleotydów, które stanowią informację genetyczną o badanym organizmie, o budowie genów ich funkcjonowaniu oraz o regulacji ich ekspresji [53]. Genom spełnia kluczową rolę w funkcjonowaniu organizmu, a jego znajomość ma decydujący wpływ na rozwój wielu dziedzin nauki. Duże znaczenie analizy sekwencyjnej odzwierciedla się w wzrastającym rozwoju technik sekwencjonowania. Metody sekwencjonowania bazują zasadniczo na dwóch metodach: metodzie terminacji łańcucha zwanej inaczej dideoksy sekwencjonowaniem i metodzie Maxama i Gilberta opartej na chemicznej degradacji DNA [54, 66, 75, 79, 83]. Wiele grup badawczych na całym świecie prowadziło badania na rzecz rozwoju alternatywnych zasad sekwencjonowania DNA. Trzy metody, które wydają się być bardzo obiecujące to sekwencjonowanie przez hybryzację [47, 72], sekwencjonowanie oparte równolegle na ligacji i rozszczepieniu [9] oraz pirosekwencjonowanie [80, 81]. Stosunkowo nową ale powszechnie stosowaną technologią oznaczania sekwencji kwasów nukleinowych jest pirosekwencjonowanie [79] (rys. 6). Metoda ta nazywana jest też sekwencjonowaniem w czasie rzeczywistym. Podstawą metody jest pomiar ilości pirofosforanu ( $PP_i$ ), uwalnianego w momencie wbudowywania komplementarnej zasady do nowosyntetyzowanej nici DNA. Detekcji dokonuje się pośrednio, poprzez rejestrację sygnału świetlnego, będącego wynikiem serii



Rys. 6. Schemat procedury pirosekwencjonowania, X – jeden z czterech nukleotydów [80, 81], zmodyfikowano



Rys. 7. Przykładowy pyrogram [80], zmodyfikowano

reakcji enzymatycznych. Reakcja przeprowadzana jest w obecności specyficznego startera i czterech enzymów: fragmentu Klenowa polimerazy DNA, sulfurylaza ATP, lucyferazy i apyrazy oraz substratów (dNTP). Sulfurylaza ATP katalizuje przekształcenie  $PP_i$  w ATP w obecności adenosyno-5'-fosfoarcanu. ATP przy udziale lucyferazy indukuje konwersję lucyferyny do oksylucyferyny czego efektem jest emisja światła o natężeniu proporcjonalnym do liczby wbudowywanych nukleotydów. Jest ono rejestrowane przez kamerę CCD i uwidaczniane w postaci pyrogramu. Ostatni etap to degradacja nadmiaru dNTP i ATP przez apyrazę (rys. 6 i rys. 7) [3, 7, 27, 43, 53, 79, 88].

Dzięki szybkiemu postępowi w analizie bioinformatycznej, informacje uzyskane z metod sekwencjonowania, każdy badacz może przeanalizować samodzielnie wykorzystując powszechnie dostępne bazy danych, w których zgromadzono sekwencje genomowe organizmów. Istnieją dwa główne serwery, w których przechowywane są sekwencje genomowe: europejski EMBL oraz amerykański GenBank [34, 69]. Obecnie obserwujemy wykładniczy wzrost liczby kompletnie zsekwencjonowanych genomów. Na początku 2015 roku liczba zsekwencjonowanych genomów wynosiła 63 170 (wg bazy danych GOLD) w tym z królestwa (domeny) *Archaea* – 1 078, *Bacteria* – 45 076, *Eukaryota* – 9 059 [45, 60]. Zsekwencjonowane zostały także genomy bakterii glebowych. W pełni poznany jest chociażby genom *Bradyrhizobium* sp. BTAi1, *Bradyrhizobium* sp. ORS278, *Pseudomonas putida* F1, *Pseudomonas stutzeri* A1501, *Sinorhizobium meliloti* 1021, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841, *Nitrosomonas eutropha* C91, *Bacillus subtilis* TPK 210909 [45].

Porównawcza charakterystyka (molekularna) izolatów bakterii i dokładna ich identyfikacja jest jednym z głównych problemów w mikrobiologii. Dla wielu gatunków mikroorganizmów technika MLST – Multilocus Sequence Typing uważana jest za „złoty standard” [57, 74]. Metoda ta polega na analizie zazwyczaj siedmiu sekwencji genów metabolizmu podstawowego (housekeeping genes) rozproszonych na chromosomie i powszechnie występujących u wszystkich badanych

organizmów. Technika ta charakteryzuje się bardzo wysoką powtarzalnością, ponieważ opiera się na analizie zmian (mutacji punktowych) w sekwencji nukleotydowej genów metabolizmu podstawowego [1, 23, 61, 93]. Sekwencje każdego fragmentu są porównywane ze wszystkimi wcześniej zidentyfikowanymi sekwencjami (allelami) w tym *locus* [1]. Allele siedmiu *loci* tworzą profil alleliczny, a następnie typ sekwencyjny ST (Sequence Type). Technika MLST pozwoliła utworzyć dwie główne sieci ogólnodostępnych międzynarodowych baz danych znajdujących się w Imperial College w Londynie [67] i Oxford University [1, 24, 76].

Badania nad identyfikacją mikroorganizmów dotyczą, także pomiaru średniego podobieństwa sekwencji nukleotydowych ANI (Average Nucleotide Identity) pomiędzy wspólnymi genami dwóch szczepów, których genom został zsekwencjonowany [51]. Szczepy z co najmniej 95% ANI należą do tego samego gatunku. Parametr ten jest rzetelnym i niezawodnym kryterium określania pokrewieństwa mikroorganizmów. Technika ANI jest wyjątkowo czułą metodą pomiaru ewolucyjnego pokrewieństwa pomiędzy ściśle spokrewnionymi szczepami bakterii, czyli takimi, które wykazują większe niż 60% ANI, większy niż 97% stopień identyczności sekwencji genu 16S rRNA [50, 51]. W badaniach Gorisa i wsp. stwierdzono zbieżność 95% ANI i 70% DDH (hybrydyzacja DNA-DNA, ponadto wykazano, że parametr ANI wskazuje największą korelację z wartościami DDH, spośród kilku badanych parametrów [37].

Analiza sekwencji rRNA jest jednym z najczęściej stosowanych parametrów umożliwiających ustalenie powiązań filogenetycznych pomiędzy mikroorganizmami [94]. Część rRNA spełnia jednocześnie kilka ważnych kryteriów, a mianowicie występuje powszechnie u wszystkich badanych organizmów, jest funkcjonalnie stała (wchodzi w skład rybosomu, którego podstawową funkcją jest synteza białka), zawiera domeny konserwowane i zmienne oraz posiada odpowiednią wielkość, niosącą wystarczającą ilość informacji [64, 82, 94]. W ciągu ostatnich 25 lat, metody obejmujące analizę rRNA lub geny kodujące rRNA (rDNA) zrewolucjonizowały taksonomię organizmów prokariotycznych [82]. Rybosomy *Prokaryota* zbudowane są z trzech typów rRNA o stałych sedymentacji 5S rRNA (120 nukleotydów), 16S rRNA (1 650 nukleotydów) i 23S rRNA (3 300 nukleotydów) [8, 82]. Obecnie ze względu na niewielką ilość informacji genetycznej niesionej przez cząsteczkę 5S rRNA nie jest ona stosowana przy identyfikacji mikroorganizmów. Sekwencjonowanie cząsteczki 23S rRNA ze względu na jej wielkość, także nie jest powszechnie stosowane w analizach filogenetycznych. Natomiast sekwencjonowanie cząsteczki 16S rRNA stało się obecnie standardem w badaniach taksonomicznych bakterii [94]. Bazy danych zawierające znaczne ilości

sekwencji 16S rDNA z pewnością przyczyniły się do częstego stosowania tego markera w badaniach porównawczych mikroorganizmów [82, 94]. Przykładowo na stronie internetowej Ribosomal Database Project *Relasae* zgromadzono 3 224 600 sekwencji 16S rDNA bakterii i archeonów (stan na dzień 26 maj 2015 rok) [78]. Jednakże istnieją pewne ograniczenia w zastosowaniu genu 16S rDNA w identyfikacji mikroorganizmów. Należy pamiętać, że ze względu na wolne tempo ewolucji, które charakteryzuje 16S rDNA, że nie powinna być stosowana do klasyfikacji blisko spokrewnionych organizmów [59, 94]. Dodatkowym problemem może być fakt, że genomy bakteryjne mogą zawierać kilka kopii genów rDNA, które w obrębie jednego organizmu mogą różnić się sekwencją np. u *Sinorhizobium meliloti* 1021 i *Rhizobium etli* CFN42 jest ich trzy [2, 64]. Gdy stopień podobieństwa sekwencji 16S rDNA dwóch szczepów wynosi przynajmniej 95%, wówczas organizmy zaliczane są do tego samego rodzaju. Z kolei, gdy identyczność sekwencji 16S rDNA wynosi więcej niż 97%, wówczas organizmy można uznać za ten sam gatunek [13, 77, 82, 94].

## 7. Podsumowanie

W pracy przedstawiono wybrane metody molekularne wykorzystywane do badań mikroorganizmów glebowych. Analiza bioróżnorodności środowiska glebowego jest ważna nie tylko dla podstawowych badań naukowych, ale także dla badań dotyczących poszukiwania nowych szczepów. Liczba dotychczas zidentyfikowanych mikroorganizmów jest niska. Ograniczeniem w klasyfikacji drobnoustrojów są problemy w izolacji w postaci czystych kultur i ograniczona wiedza na temat cech fenotypowych i genomowych. Metody molekularne stosowane w identyfikacji drobnoustrojów glebowych mają przewagę nad klasycznymi metodami fenotypowymi, ponieważ są niezależne od warunków hodowli, są bardziej powtarzalne i czułe. Genomika w sposób znaczący weryfikuje dotychczasową analizę bioróżnorodności oraz rozbudza olbrzymie nadzieje na dotarcie do mikroorganizmów niehodowanych. Wykorzystywane metody molekularne umożliwiają klasyfikowanie szczepów. I tak analiza zawartości zasad G+C wyznacza granice gatunku, podobnie jest w przypadku metody hybrydyzacji. Sekwencjonowanie DNA pozwala różnicować szczepy od gatunku przez rodzaj, aż do rodziny. Natomiast analiza sekwencji 16S rRNA umożliwia klasyfikację mikroorganizmów na poziomie gatunku i rodzaju. Postęp technologiczny i malejące koszty analiz genomowych są czynnikiem zachęcającym do coraz powszechniejszego stosowania metod molekularnych. Wyzwaniem dla mikrobiologów jest udoskonalanie i rozpowszechnienie metod genomowych.

### Podziękowania

Opracowanie wykonano w ramach realizacji zadania I.4. *Ocena i kształtowanie bioróżnorodności środowiska glebowego oraz aktywności mikrobiologicznej gleb z uwzględnieniem różnych warunków siedliskowych i systemów gospodarowania*. Program Wieloletni IUNG-PIB na lata (2016–2020).

### Piśmiennictwo

- Aanensen D.M., Spratt B.G.: The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Res.* **33**, 728–733 (2005)
- Acinas S.G., Marcelino L.A., Klepac-Ceraj V., Polz M.F.: Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple rrn operons. *J. Bacteriol.* **186**, 2629–2635 (2004)
- Ahmadian A., Ehn M., Hober S.: Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clin. Chim. Acta*, **363**, 83–94 (2006)
- Andren O., Bengtsson J., Clarholm M.: Biodiversity and species redundancy among litter decomposers (w) *The Significance and Regulation of Soil Biodiversity*, red. H.P. Collins, G.P. Robertson, M.J. Klug, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995, s. 141–151
- Babu M.M.: An Introduction to Microarray Data Analysis (w) *Computational Genomics: Theory and Application*, red. R.G. Grant, Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK, 2004, s. 225–249
- Baj J., Markiewicz Z.: Pozycja filogenetyczna bakterii i zasady ich taksonomii (w) *Biologia molekularna bakterii*, K. Mostowik, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2006, s. 4–18
- Benkovic S.J., Cameron C.E.: Kinetic analysis of nucleotide incorporation and disincorporation by Klenow fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I. *Method. Enzymol.* **262**, 257–269 (1995)
- Biodiversity and Microorganisms, [http://csls-text3.c.u-tokyo.ac.jp/inactive/01\\_08.html](http://csls-text3.c.u-tokyo.ac.jp/inactive/01_08.html) (19.10.2015)
- Brenner, S., Albrecht G. i wsp.: *In vitro* cloning of complex mixtures of DNA on microbeads: Physical separation of differentially expressed cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 1665–1670 (2000)
- Chargraff E.: *The Miracle of Complementarity* (w) *Heraclitean Fire: Sketches from a Life Before Nature*, The Rockefeller University Press, New York, 1978, s. 96
- Cho J.C., Tiedje J.M.: Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays. *Appl. Environ. Microb.* **67**, 3677–3682 (2001)
- Chorąży M.: Gen strukturalny – ewolucja pojęcia i dylematy. *Nauka*, **3**, 57–108 (2009)
- Coenye T., Gevers D., Van de Peer Y., Vandamme P., Swings J.: Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 147–167 (2006)
- Colwell R.R.: Polyphasic Taxonomy of the Genus *Vibrio*: Numerical Taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and Related *Vibrio* Species. *J. Bacteriol.* **104**, 410–433 (1970)
- Cytaty.info, <http://www.cytaty.info/autor/isaacnewton.htm> (19.10.2015)
- Daniel R.: The metagenomics of soil. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 470–478 (2005)
- Daniel R.: The soil metagenome – a rich resource for the discovery of novel natural products. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**, 199–204 (2004)
- De Ley, J., Cattoir, H., Reynaerts, A.: The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.* **12**, 133–142 (1970)
- DeLong E.F., Pace N.R.: Environmental diversity of Bacteria & Archaea. *Systematic Biol.* **50**, 1–9 (2001)
- Dykhuizen D.E.: Santa Rosalia revisited: why are there so many species of bacteria? *Anton. van Leeuw. J. Microb.* **73**, 25–33 (1998)
- Dz.U. 2002 Nr 184, poz. 1532, Konwencja o różnorodności biologicznej sporządzona w Rio de Janeiro dnia 5 czerwca 1992 r. (Dz.U. z dnia 6 listopada 2002 r.)
- Eisen M.B., Brown P.O.: DNA arrays for analysis of gene expression. *Method. Enzymol.* **303**, 179–205 (1999)
- Enright M.C., Spratt B.G.: A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology*, **144**, 3049–3060 (1998)
- Enright M.C., Spratt B.G.: Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol.* **7**, 482–487 (1999)
- Ezaki, T., Hashimoto, Y., Yabuuchi, E.: Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane later hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **39**, 224–229 (1989)
- Fakruddin M., Mannan K.S.B.: Methods for Analyzing Diversity of Microbial Communities in Natural Environments. *Ceylon J. Sci.* **42**, 19–33 (2013)
- Fakruddin M., Mazumdar M.R., Chowdhury A., Hossain N., Mahajan S., Islam S.: Pyrosequencing – A Next Generation Sequencing Technology. *World Appl. Sci. J.* **24**, 1558–1571 (2013)
- Forsdyke D.R., Mortimer J.R.: Chargaff's legacy, *Gene*, **261**, 127–137 (2000)
- Frać M., Jezierska-Tys S.: Różnorodność mikroorganizmów środowiska glebowego. *Post. Mikrobiol.* **40**, 47–58 (2010)
- Gabryelska M.M., Szymański M., Barciszewski J.: DNA – cząsteczka, która zmieniła naukę. Krótka historia odkryć. *Nauka*, **2**, 111–134 (2009)
- Gałązka A.: From basic research to practical applications in soil study” ISBN 978-83-933173-8-7 “Advantages and limitations of molecular-based methods used for bacterial diversity in soils contaminated with PAH's” pp. 455–472 (2011)
- Gałązka A., Gawryjolek K.: Glomalina – glikoproteina produkowana przez grzyby mykoryzy arbuskularnej. *Post. Mikrobiol.* **54**, 331–343 (2015)
- Gans J., Wolinsky M., Dunbar J.: Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, **309**, 1387–1390 (2005)
- Gevers D., Dawyndt P., Vandamme P., Willems A., Vancanneyt M., Swings J., De Vos P.: Stepping stones towards a new prokaryotic taxonomy. *Philos. T.R. Soc. B.* **361**, 1911–1916 (2006)
- Giller K.E., Beare M.H., Lavelle P., Izac A.M.N., Swift M.J.: Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. *Appl. Soil Ecol.* **6**, 3–16 (1997)
- Goodfellow M., O'Donnell A.G.: Roots of bacterial systematic (w) *Handbook of New Bacterial Systematics*, red. M. Goodfellow, A.G. O'Donnell, Academic Press, Harcourt Brace & Company, Publishers, London, 1993, s. 3–54
- Goris J., Konstantinidis K.T., Klappenbach J.A., Coenye T., Vandamme P., Tiedje J.M.: DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 1: 81–91 (2007)
- Greene E.A., Voordouw G.: Analysis of environmental microbial communities by reverse sample genome probing. *J. Microbiol. Meth.* **53**, 211–219 (2003)
- Grimont P.A.D., Popoff M.Y., Grimont F., Coynault C., Lemeilin M.: Reproducibility and correlation study of three deoxyribonucleic acid hybridization procedures. *Curr. Microbiol.* **4**, 325–330 (1980)

40. Guo C., Sun W., Harsh J.B., Ogram A.: Hybridization analysis of microbial DNA from fuel oil-contaminated and noncontaminated soil. *Microb. Ecol.* **34**, 178–187 (1997)
41. Gupta R.S.: Protein Phylogenies and Signature Sequences: A Reappraisal of Evolutionary Relationships among *Archaeobacteria*, *Eubacteria*, and *Eukaryotes*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1435–1491 (1998)
42. Head I.M., Saunders J.R., Pickup R.W.: Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb. Ecol.* **35**, 1–21 (1998)
43. Hyman E.D.: A new method of sequencing DNA. *Anal. Biochem.* **174**, 423–436 (1988)
44. Jaros S.: Mikromacierze DNA i ich wykorzystanie w parazytologii i medycynie. *Wiad. Parazytol.* **52**, 13–29 (2006)
45. JGI GOLD, Joint Genome Institute Genomes Online Database, <https://gold.jgi-psf.org> (19.10.2015)
46. Kellenberger E.: Exploring the unknown: the silent evolution of microbiology. *EMBO Rep.* **2**, 5–7 (2001)
47. Khrapko K.R., Lysov Yu. P., Khorlyn A.A., Shick V.V., Florentiev V.L., Mirzabekov A.D.: An oligonucleotide hybridization approach to DNA sequencing. *FEBS Lett.* **256**, 118–122 (1989)
48. Kirk J.L., Beaudette L.A., Hart M., Moutoglis P., Klironomos J.N., Lee H., Trevors J.T.: Methods of studying soil microbial diversity. *J. Microbiol. Meth.* **58**, 169–188 (2004)
49. Klimek B., Stefanowicz A.M., Woch M.W., Jaźwa M.: Czy istnieje związek między bioróżnorodnością roślin i mikroorganizmów glebowych? *Kosmos*, **59**, 589–598 (2010)
50. Konstantinidis K.T., Ramette A., Tiedje J.M.: The bacterial species definition in the genomic era. *Philos. T.R. Soc. B.* **361**, 1929–1940 (2006)
51. Konstantinidis K.T., Tiedje J.M.: Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 2567–2572 (2005)
52. Kozdrój J.: Metagenom – źródło nowej informacji o mikroorganizmach glebowych, *Post. Mikrobiol.* **52**, 185–200 (2013)
53. Krawczyk B., Kur J.: Sekwencjonowanie DNA (w) Diagnostyka molekularna w mikrobiologii, red. R. Szymkiewicz, Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk, 2008, s. 108–109
54. Krawczyk B.: Diagnostyka molekularna w zakażeniach szpitalnych. *Post. Mikrobiol.* **46**, 367–378 (2007)
55. Kumada Y., Benson D.R., Hillemann D., Husted T.J., Rocheford D.A., Tompson J., Wohlleben W., Taten Y.: Genus *Rhizobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 3009–3013 (1993)
56. Kumar R., Joshi S.R.: Microbial Ecology of Soil: Studying the diversity of microorganisms in the most complex of the environments – A review. *Adv. Appl. Microbiol.* **19**, 267–279 (2015)
57. Larsen M.V., Lunda O. i wsp.: Multilocus Sequence Typing of Total-Genome-Sequenced Bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 1355–1361 (2012)
58. LPSN List of prokaryotic names with standing in nomenclature, <http://www.bacterio.net> (19.10.2015)
59. Ludwig, W., Schleifer K.-H.: Phylogeny of Bacteria beyond the 16S rRNA standard. *ASM News*, **65**, 752–757 (1999)
60. Mackiewicz P., Zakrzewska-Czerwińska J., Cebat S.: Genomika – dziedzina wiedzy XXI wieku. *Biotechnologia*, **30**, 7–21 (2005)
61. Maiden M.C.J., Spratt B.G. i wsp.: Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 3140–3145 (1998)
62. Majtan T., Bukovska G., Timko J.: DNA Microarrays – Techniques and Applications in Microbial System. *Folia Microbiol.* **49**, 635–664 (2004)
63. Małek W., Wdowiak S.: Współczesna systematyka bakterii. *Post. Mikrobiol.* **35**, 119–137 (1996)
64. Małek W., Wdowiak-Wróbel S., Kalita M., Szlachetka M.: Dylematy związane z koncepcją i definicją gatunku bakteryjnego. *Post. Mikrobiol.* **47**, 177–182 (2008)
65. Małek W., Wdowiak-Wróbel S., Kalita M., Święcicka I., Studzińska B.: W poszukiwaniu koncepcji gatunku bakteryjnego. *Post. Mikrobiol.* **44**, 323–32 (2005)
66. Maxam A. & Gilbert W.: A new method of sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 560–564 (1977)
67. MLST Multi Locus Sequence Typing, <http://www.mlst.net> (19.10.2015)
68. Nannipieri P., Ascher J., Ceccherini M.T., Landi L., Pietrameller G., Renella G.: Microbial diversity and soil functions. *Eur. J. Soil Sci.* **54**, 655–670 (2003)
69. National Center for Biotechnology Information, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (19.10.2015)
70. Nusslein K., Tiedje J.M.: Soil bacteria community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil. *Appl. Environ. Microb.* **65**, 3622–3626 (1999)
71. On, S.L., Holmes W.B.: Reproducibility of tolerance tests that are useful in the identification of *Campylobacter*. *J. Clin. Microbiol.* **1**, 1785–1788 (1991)
72. Parinov S., Barsky V., Yershov G., Kirillov E., Timofeev E., Belgovskiy A., Mirzabekov A.: DNA sequencing by hybridization to microchip octa- and decanucleotides extended by stacked Pentanucleotides. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2998–3004 (1996)
73. Paul E.A., Clark F.E.: Metody badań mikroorganizmów glebowych (w) Mikrobiologia i biochemia gleb, red. M. Jędrzych, Wydawnictwo Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin, 2000, s. 81–84
74. Platonov A.E., Shipulin G.A., Platonova O.V.: Multilocus sequencing – a new method of genotyping bacteria and first results of its use. *Genetika*, **36**, 597–605 (2000)
75. Przybecki Z., Pawełkiewicz M.E., Wóycicki R.: Sekwencjonowanie genomów i rozwój biotechnologii. *Biotechnologia*, **4**, 9–23 (2010)
76. PubMLST – Public databases for molecular typing and microbial genome diversity, <http://pubmlst.org> (19.10.2015)
77. Ramasamy D., Mishra K., Lagier J.-Ch., Padhmanabhan R., Rossi M., Sentaosa M., Raoult D., Fournier P.: A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **64**, 384–391 (2014)
78. Ribosomal Database Project Relasae, <http://rdp.cme.msu.edu> (19.10.2015)
79. Ronaghi M.: Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. *Genome Res.* **7**, 3–11 (2015)
80. Ronaghi M., Karamohamed S., Pettersson B., Uhlen M., Nyren P.: Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal. Biochem.* **242**, 84–89 (1996)
81. Ronaghi M., Uhlen M., Nyren P.: A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*, **281**, 363–365 (1998)
82. Rossello-Mora R., Amann R.: The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 39–67 (2001)
83. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 12: 5463–5467 (1977)
84. Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O.: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, **270**, 467–470 (1995)
85. Schramm A., Larsen L.H., Revsbech N.P., Ramsing N.B., Amann R., Schleifer K.-H.: Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microb.* **62**, 4641–4647 (1996)
86. Sienkiewicz J.: Koncepcje bioróżnorodności – ICH wymiary i miary w świetle literatury. *Ochr. Śr. Zasobów Nat.* **45**, 7–29 (2010)

87. Staley J.T., Konopka A.: Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Ann. Rev. Microbiol.* **39**, 321–346 (1985)
88. Sztuba-Solińska J.: Systemy markerów molekularnych i ich zastosowanie w hodowli roślin. *Kosmos*, **54**, 227–239 (2005)
89. Theron J., Cloete T.E.: Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Crit. Rev. Microbiol.* **26**, 37–57 (2000)
90. Tiedje J.M., Asuming-Brempong S., Nusslein K., Marsh L., Flynn S.J.: Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl. Soil Ecol.* **13**, 109–122 (1999)
91. Torsvik V., Sorheim R., Goksoyr J.: Total bacterial diversity in soil and sediment communities – a review. *J. Ind. Microbiol.* **17**, 170–178 (1996)
92. Torsvik V., Daae F.L., Sandaa R.-A., Øvreås L.: Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 240–245 (2002)
93. Urwin R., Maiden M.C.J.: Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.* **11**, 479–487 (2003)
94. Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K., Swings J.: Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiol. Rev.* **60**, 407–438 (1996)
95. Vermeeren V., Michiels L.: Evolution Towards the Implementation of Point-Of-Care Biosensors, <http://www.intechopen.com/books/biosensors-for-health-environment-and-biosecurity/evolution-towards-the-implementation-of-point-of-care-biosensors> (19.10.2015)
96. Waleron M., Waleron K., Łojkowska E.: Systematyka bakteryjnych patogenów roślin. *Post. Mikrobiol.* **42**, 193–214 (2003)
97. Wayne L.G., Truper H.G. i wsp.: Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *The International Committee On Systematic Bacteriology*, **37**, 463–464 (1987)
98. Webster G., Embley T.M., Posser J.L.: Grassland management regimens reduce small-scale heterogeneity and species diversity of  $\beta$ -proteobacterial ammonia oxidisers. *Appl. Environ. Microb.* **68**, 20–30 (2002)
99. Woese C.R., Fox G.E.: Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5088–5090 (1977)
100. Zawada M., Czekalska S., Sacha T., Skotnicki A.B.: Technika mikromacierzy – podstawy metody oraz możliwość zastosowania w hematologii, *Acta Hematol. Pol.* **35**, 505–523 (2004)

Anna Mikołajczyk<sup>1\*</sup>, Elżbieta Stefaniuk<sup>1,2</sup>, Karolina Bosacka<sup>1</sup>, Waleria Hryniewicz<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej

<sup>2</sup>Narodowy Instytut Leków

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

1. Wstęp. 2. Przygotowywanie i przechowywanie podłoży. 3. Kontrola jakości. 4. Podział podłoży. 4.1. Podział ze względu na skład chemiczny. 4.2. Podział ze względu na konsystencję. 4.3. Podział ze względu na zawartość substancji odżywczych. 4.4. Podział ze względu na zastosowanie. 5. Podsumowanie

### Properties and uses of bacteriological media

**Abstract:** The aim of this article was to collate information about bacteriological media, presenting their composition, properties and the resulting possible applications of a particular medium or group of media in bacteriological diagnostics. The most important groups of culture media were classified basing on their composition (synthetic, semi-synthetic and natural), consistency (liquid, semi-solid, solid), nutrient content (minimum, nutrient-enriched) and use (transport, nutrient, selective, differential, selective-differentiating, for susceptibility testing). Taking into account the practical aspect, much space is devoted to the classification of culture media based on their possible use. For each group, several examples of culture media with their major components and bacterial species for which they are intended are given. Brief information about the quality assurance and control of media during their preparation, transport and storage is also presented.

1. Introduction. 2. Preparation and storage of media. 3. Quality control. 4. Classification of culture media. 4.1. Classification of culture media based on their composition. 4.2. Classification of culture media based on their consistency. 4.3. Classification of culture media based on their nutrient content. 4.4. Classification of culture media based on their use. 5. Summary

**Słowa kluczowe:** diagnostyka mikrobiologiczna, kontrola jakości, podłoża bakteriologiczne, zapewnianie jakości

**Key words:** bacteriological media, microbiology diagnostics, quality control, quality assurance

## 1. Wstęp

Hodowla bakterii uznawana jest za „złoty standard” w diagnostyce bakteriologicznej. Umożliwia m.in. wstępną identyfikację bakterii poprzez określenie ich właściwości biochemicznych, oznaczenie lekowrażliwości oraz stanowi źródło materiału do badań molekularnych. Aby hodowla spełniała swoje zadanie, podłoża należy dobrać do wymagań patogenów obecnych w badanym materiale, zapewniając im optymalne warunki wzrostu. Kontrola jakości podłoży mikrobiologicznych jest jednym z podstawowych elementów programu zapewniania jakości w laboratorium mikrobiologicznym, jednak na ich użyteczność składa się nie tylko odpowiednie przygotowanie i przechowywanie, ale i dobrane pożywki do rodzaju badanego materiału [18, 19].

W celu zapewnienia właściwych warunków rozwoju bakterii podłoża muszą spełniać szereg wymagań. Mogą się one od siebie znacząco różnić, jednak wszystkie powinny zawierać odpowiednią ilość przyswajalnych form pierwiastków biogennych: C, O, H, N, P, S, źródeł energii, soli mineralnych, mikroelementów: Zn, Mn, Cu, Mo, Co, Ni oraz innych substancji potrzebnych do wzrostu bakterii, takich jak witaminy i aminokwasy.

Ponadto, muszą odznaczać się odpowiednim potencjałem oksydoredukcyjnym, ciśnieniem osmotycznym i pH. Większość bakterii wykazuje najobfitszy wzrost na podłożach o odczynie obojętnym, jednak niektóre wymagają szczególnie niskiego lub wysokiego pH. Podłoża powinny być również jednorodnie i przejrzyste, o ile w ich skład nie wchodzi związek nierozpuszczalny, np. CaCO<sub>3</sub> lub tłuszcze. Podłoża specjalne, przeznaczone dla wybranych grup bakterii, zawierają dodatkowo składniki selekcyjne lub różnicujące [6, 18].

Hodowle bakterii obligatoryjnie wewnątrzkomórkowych, którym tradycyjnie podłoża bakteriologiczne nie są w stanie zapewnić właściwych warunków rozwoju, prowadzone są w zarodkach kurzych lub hodowlach komórkowych. Do tej grupy zaliczają się m.in. *Chlamydia* spp., *Coxiella* spp., *Rickettsia* spp. i *Mycobacterium leprae* [2, 3, 5].

## 2. Przygotowywanie i przechowywanie podłoży

Podłoża mikrobiologiczne dzielimy na dwie grupy:

- przygotowywane w laboratorium ze składników podstawowych lub komercyjnie dostępnych granulatów i odwodnionych proszków,

\* Autor korespondencyjny: Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej, ul. Rydygiera 8, 01-793 Warszawa; tel. 22 841 58 34; amikolajczyk@polmicro.edu.pl

- gotowe do użycia, w probówkach lub na płytkach Petriego.

Jeśli podłoża przygotowywane są w laboratorium, to właśnie na nim spoczywa odpowiedzialność za jakość przygotowywanych pożywek. W przypadku podłoży komercyjnych producenci zobowiązani są do kontroli jakości swoich produktów, czego potwierdzeniem jest certyfikat przedstawiający jej wyniki. Certyfikaty dla składników podstawowych i podłoży w proszku odnoszą się tylko do takiej postaci, jaka została dostarczona do laboratorium, ponieważ właściwości ostatecznej postaci pożywki zależą także od sposobu jej przygotowania. Bez względu na to, czy podłoża pochodzą od wytwórców komercyjnych, czy powstają w laboratorium, należy zapewnić nadzór nad wszystkimi czynnikami i etapami przygotowania, które mają wpływ na właściwości fizyko-chemiczne i użytkowe podłoży. Nadzór ten obejmuje standaryzację produkcji i przechowywania podłoży oraz wdrożenie programu kontroli ich jakości [13, 19, 20].

Do najistotniejszych elementów wpływających na jakość pożywek należą [9, 13, 19, 20]:

- zastosowane surowce lub podłoża sypkie, które powinny być przechowywane w szczelnych pojemnikach w przewiewnym, chłodnym i ciemnym miejscu,
- woda, której pH powinno zawierać się w zakresie 5,5–7,5, a przewodność właściwa mierzona w 25°C wynosić nie więcej niż 25  $\mu\text{S}/\text{cm}$  – przewodność zależy wprost proporcjonalnie od zawartości jonów soli, w tym jonów miedzi, które hamują wzrost drobnoustrojów,
- skład pożywki – odpowiednie proporcje poszczególnych składników warunkują właściwości odżywcze i użytkowe,
- sposób przygotowania pożywki zgodny z obowiązującymi procedurami i udokumentowany tak, by umożliwić odtworzenie przebiegu wytwarzania danej partii,
- przebieg procesu sterylizacji przeprowadzanej za pomocą pary wodnej pod ciśnieniem lub filtracji,
- opakowanie, warunki transportu i przechowywania zapewniające stabilność właściwości pożywki: zabezpieczające przed kontaminacją, uszkodzeniami mechanicznymi, odwodnieniem skutkującym zmianą stężenia poszczególnych składników, destrukcyjnym działaniem światła, które przy dłuższej ekspozycji może doprowadzić do zmiany składu chemicznego poprzez niepożądane reakcje między składnikami podłoża lub ich degradację, skrajnymi temperaturami – zbyt wysoka temperatura może doprowadzić do degradacji lub zmian stężenia komponentów, zbyt niska do wytrącenia niektórych składników, a duże wahania temperatury do nadmiernej kondensacji wody.

Aby umożliwić pełną identyfikację danej serii pożywki, każde naczynie z podłożem (płytką, kolbą, butelką czy probówka) powinno być opisane jego nazwą oraz datą przygotowania lub datą ważności partii, z której pochodzi [19].

### 3. Kontrola jakości

Jakość podłoży determinuje możliwość wykrycia bakterii w badanym materiale, ich prawidłową identyfikację oraz ocenę lekowrażliwości. Nawet najlepiej dobrane do profilu badania podłoże może sprawić, że uzyskany wynik nie będzie wiarygodny, jeśli pożywka będzie złej jakości. Od laboratoriów mikrobiologicznych wymaga się przeprowadzania kontroli podłoży niezależnie od źródła pochodzenia w celu potwierdzenia ich jakości i kwalifikacji dostawców. Wymagania te zawarte są w normach PN-EN ISO/IEC 17025:2007 i PN-EN ISO 15189:2015-05. W celu zapewnienia wiarygodności wyników wszystkie laboratoria powinny kontrolować jakość pożywek, nawet jeśli nie wdrażają systemu zarządzania jakością [14, 15, 19].

Na kontrolę jakości podłoży składa się kilka etapów: ocena ogólna, ocena szczegółowa, a w przypadku podłoży komercyjnych także ocena wstępna. Dopiero po pomyślnym przejściu wszystkich etapów kontroli dana partia pożywki może być przeznaczona do użytku [13].

Wstępna kontrola dostawy polega na każdorazowym sprawdzeniu certyfikatu jakości oraz dokumentacji opisującej warunki transportu. Certyfikat powinien zawierać nazwę producenta, nazwę podłoża, numer serii, datę ważności, opis jego właściwości fizyko-chemicznych (barwy, pH) i mikrobiologicznych (morfologii kolonii danego gatunku na podłożu oraz wykaz zastosowanych szczepów kontrolnych). Ponadto, laboratorium powinno odnotowywać datę dostawy i wizualnie ocenić opakowanie transportowe pod kątem jego oznakowania i szczelności [9, 19].

Kontrola ogólna obejmuje sprawdzenie jałowości oraz określenie właściwości fizycznych i chemicznych podłoży. Weryfikuje się także stopień wypełnienia opakowania pożywką sypką, formę wypełnienia i grubość warstwy agaru dla pożywki stałej lub objętość pożywki płynnej. Ocenie podlega pH oraz wygląd zewnętrzny: klarowność, jednorodność, zabarwienie, obecność artefaktów i stopień rozdrobnienia podłoży sypkich. Do najczęściej spotykanych nieprawidłowości należą: niewystarczająca ilość pożywki w płytce/butelce/probówce, uszkodzenia mechaniczne płytek, oderwanie pożywki stałej od dna płytki, zamrożenie agaru, chropowatość, obecność pęcherzyków lub pęknięć na powierzchni agaru, nadmiar wilgoci lub odwodnienie, nietypowe zabarwienie, hemoliza krwi oraz kontaminacja widoczna makroskopowo [9, 13, 19].

Kontrola szczegółowa polega na ocenie właściwości mikrobiologicznych, inaczej nazywanych użytkowymi. W celu jej przeprowadzenia stosuje się szczepy kontrolne pochodzące ze stowarzyszonych w ECCO (European Culture Collection's Organization) lub WFCC (World Federation for Culture Collection) kolekcji kultur takich jak np. ATCC (American Type Culture Collection), DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen) lub brytyjskie NCTC (National Collection of Type Culture). Zestaw szczepów odniesienia powinien składać się ze szczepów kontroli dodatniej, nazywanych szczepami docelowymi, słabo dodatniej i ujemnej. Ten etap kontroli ma na celu zbadanie intensywności wzrostu bakterii, stopnia zahamowania flory towarzyszącej oraz sprawdzenie czy na danym podłożu szczep wzorcowy wykazuje charakterystyczne dla siebie właściwości fizjologiczne i biochemiczne [9, 13, 19].

#### 4. Podział podłoży

Sprawnie działające laboratorium powinno dysponować najmniejszą możliwą liczbą rodzajów podłoży, niezbędną do wykonywania badań o określonym profilu, a kategoryzacja podłoży ułatwia ich odpowiednie dobranie. W zależności od potrzeb stosuje się wiele klasyfikacji podłoży, odnoszących się do ich składu, konsystencji, zawartości substancji odżywczych i zastosowania. Ze względu na znaczenie praktyczne, najszerszej omówiono podział podłoży pod kątem ich zastosowania [17, 20].

##### 4.1. Podział ze względu na skład chemiczny

Pod względem składu chemicznego podłoża dzieli się na naturalne, półsyntetyczne i syntetyczne. Pożywki naturalne sporządza się na bazie składników pochodzenia naturalnego, takich jak hydrolizaty białek czy wyciągi z tkanek (np. mięśni, wątroby) lub warzyw. Ich obecność sprawia, że skład chemiczny tej grupy podłoży nie jest w pełni zdefiniowany. Podłoża syntetyczne, w przeciwieństwie do naturalnych, charakteryzuje ściśle określony skład chemiczny. Podłoża półsyntetyczne posiadają zarówno składniki syntetyczne, jak i pochodzenia naturalnego [10, 19].

##### 4.2. Podział ze względu na konsystencję

Ze względu na konsystencję podłoża bakteriologiczne możemy podzielić na: płynne – służące głównie do namnażania, półpłynne, zawierające 0,1–0,7% agaru – przeznaczone dla mikroaerofili, oraz podłoża stałe o 1,5–2% zawartości agaru – umożliwiające izolację czystych kultur i obserwację wyglądu kolonii. Początkowo do hodowli bakterii stosowane były jedynie podłoża

płynne, np. Ludwik Pasteur stosował proste pożywki na bazie wyciągów z moczu i mięsa. Dopiero Robert Koch rozpoczął prace nad otrzymaniem podłoża stałego, wykorzystując w tym celu m.in. skrobię, skoagulowane albuminy jaja kurzego czy żelatynę. Ostatecznie zastosowanie agaru zasugerowała mu żona jednego ze współpracowników, Fannie Eilshemius Hesse. Na przewagę agaru nad innymi środkami zestalającymi składa się jego wysoka temperatura topnienia oraz fakt, że większość drobnoustrojów nie jest w stanie go rozłożyć [7, 10].

##### 4.3. Podział ze względu na zawartość substancji odżywczych

Stosowany jest również podział podłoży na podstawie zawartości substancji odżywczych. Pożywki minimalne (inaczej: podstawowe), zawierają jedynie niezbędne składniki pokarmowe, pozwalające podtrzymać żywotność bakterii. W skład podłoży odżywczych (inaczej: pełnych) wchodzi wszystkie substancje odżywcze, które są niezbędne do zapewnienia dobrego wzrostu bakterii. Podłoża wzbogacone zawierają dodatkowe substancje wzrostowe, takie jak krew, surowica, wyciąg z wątroby, płyny wysiękowe lub mleko, dzięki czemu umożliwiają wzrost bakterii wymagających [10, 17].

##### 4.4. Podział ze względu na zastosowanie

Ze względu na zastosowanie wyróżnia się siedem głównych grup podłoży:

- 1) transportowe – minimalne, utrzymujące żywotność drobnoustrojów w czasie transportu,
- 2) transportowo-wzrostowe – odpowiednie do namnażania drobnoustrojów podczas przechowywania, transportu i inkubacji materiału klinicznego
- 3) namnażające – bogate, odpowiednie do namnażania wielu grup bakterii,
- 4) selektywne – inaczej wybiórczo-namnażające, z dodatkiem substancji umożliwiających wzrost określonego rodzaju/gatunku i hamujących wzrost pozostałych drobnoustrojów,
- 5) różnicujące – inaczej izolacyjne, w ich skład wchodzi indykator, dzięki któremu na podstawie wybranych cech pozwalają rozróżnić określone grupy bakterii,
- 6) wybiórczo-różnicujące, które łączą właściwości podłoży selektywnych i różnicujących,
- 7) podłoża do badania lekowrażliwości drobnoustrojów [18].

###### 1) Podłoża transportowe

Podłoża należące do tej grupy używane są do transportu próbek materiału klinicznego i szczepów bakterii do laboratorium. Klasyczne podłoża transportowe utrzymują żywotność bakterii, ale nie pozwalają na ich namnożenie [17].



Najszerzej stosowanymi podłożami transportowymi są uniwersalne podłoża Stuarta i Amiesa oraz – stosowane głównie do próbek kału – podłoże Cary’ego-Blaira, ponieważ są one odpowiednie do przechowywania zarówno bakterii tlenowych, beztlenowych, jak i względnie beztlenowych. Za utrzymanie niskiego potencjału redukcyjnego, umożliwiającego przeżycie beztlenowców, odpowiada dodatek tioglikolanu sodu. Niektóre bakterie, np. *Bordetella pertussis*, są bardzo wrażliwe na zmiany czynników środowiskowych i giną już w kilka godzin po pobraniu materiału, dlatego wymagają specjalnych podłoży transportowych. Przy podejrzeniu krztuśca materiał należy pobierać na półpłynne podłoże Regan-Lowe, zawierające dodatek węgla drzewnego i krwi końskiej, w dwóch powtórzeniach: z antybiotykiem (cefaleksyną lub metycyliną), który zahamuje wzrost flory towarzyszącej oraz bez dodatku antybiotyku, po czym jak najszybciej należy przesiać materiał na podłoże Bordeta-Gengou [4, 17].

Istnieją także podłoża wzbogacone, nazywane transportowo-wzrostowymi, które są odpowiednie do namnażania bakterii w czasie przechowywania, transportu oraz późniejszej inkubacji materiałów klinicz-

nych. Mogą one zawierać dodatek substancji neutralizujących aktywność antybiotyków, a niektóre z nich mają charakter dwufazowy – stanowią połączenie podłoża stałego i płynnego, na którym możliwe jest szybsze zaobserwowanie wzrostu bakterii [17].

## 2) Podłoża namnażające

Podłoża bogate, stwarzające dogodne warunki dla wzrostu wielu rodzajów bakterii, nazywane są podłożami namnażającymi. Przykładami pożywek namnażających są: bulion odżywczy, w skład którego wchodzi wyciąg z mięsa i woda peptonowa (pepton, NaCl i woda) oraz bulion glukozowy, który różni się od bulionu odżywczego jedynie dodatkiem glukozy [10].

## 3) Podłoża selektywne (wybiórczo-namnażające)

Zadaniem podłoży wybiórczo-namnażających jest stworzenie dogodnych warunków do wzrostu określonych bakterii przy równoczesnym zahamowaniu rozwoju pozostałych. Przykłady pożywek selektywnych wraz z ich najważniejszymi składnikami i grupami bakterii, do których wzrostu są przystosowane, przedstawiono w tabelach I a i I b [2, 4, 16, 17, 21].

Tabela Ia  
Wybrane podłoża selektywne (wybiórczo-namnażające) dla bakterii Gram-ujemnych

Nazwa	Bakterie	Czynniki wybiórcze	Pozostałe istotne składniki
<b>Agar czekoladowy</b>	<i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Brucella abortus</i> i inne bakterie wymagające	Czynniki X (hemina) i V (NAD) ze zdenaturowanej krwi baraniej, w modyfikacji dla <i>Haemophilus</i> spp., bacytracyna	Enzymatyczny hydrolyzат kazeiny i tkanek zwierzęcych, wyciąg drożdżowy
<b>Podłoże MTM</b> (ang. <i>Modified Thayer-Martin</i> )	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i>	Wankomycyna, kolistyna, nystatyna, trimetoprim	Hemina, NAD, hemoglobina, witaminy
<b>Podłoże Roiron</b>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Wankomycyna, kolistyna, amfoterycyna B	Enzymatyczny hydrolyzат kazeiny, osocze końskie, glukoza
<b>Brucella agar</b>	<i>Brucella</i> spp.	Mieszanina antybiotyków: polimyksyna B, bacytracyna, kwas nalidyksowy, nystatyna, wankomycyna, cykloheksamid	Enzymatyczny hydrolyzат kazeiny i tkanek zwierzęcych, wyciąg drożdżowy, glukoza (w wersji stałej 10% odwłóknionej krwi końskiej)
<b>Agar BCYE</b> (ang. <i>Buffered Charcoal east Extract Agar</i> )	<i>Legionella</i> spp., <i>Tatlockia</i> spp., <i>Fluriobacter</i> spp.	Mieszanina antybiotyków: cefamandol, polimyksyna B, anizomycyna	Chlorowodorek L-cysteiny, kwas α-ketoglutarynowy, pirofosforan żelaza, wyciąg drożdżowy, węgiel drzewny
<b>Agar Bordeta-Gengou</b> (B-G)	<i>Bordetella</i> spp.	Metycylina, cefaleksyna	Krew końska lub barania, wyciąg z ziemniaków, glicerol
<b>Agar BCSA</b> (ang. <i>Burkholderia cepacia Selective Agar</i> )	<i>Burkholderia cepacia</i>	Fiolet krystaliczny, polimyksyna B, gentamycyna, wankomycyna	Pepton, laktoza, sacharoza
<b>Podłoże CCD A</b> (ang. <i>Charcoal, Cefoperazone, Deoxycholate Agar</i> )	<i>Campylobacter</i> spp. – kolonie wypukłe ( <i>C. jejuni</i> – możliwy wzrost mgławicowy)	Deoksyholan sodu, cefoperazon, amfoterycyna B	Aktywowany węgiel drzewny, siarczan żelaza (II), pirogronian sodu
<b>Bulion SF</b> (ang. <i>Selenite F Broth</i> )	<i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp.	Selenin sodowy (wzmaga wzrost <i>Salmonella</i> i <i>Shigella</i> )	Hydrolyzат kazeiny, laktoza

Tabela Ia – c.d.

Nazwa	Bakterie	Czynniki wybiórcze	Pozostałe istotne składniki
<b>Podłoże SS</b> (Salmonella- -Shigella agar)	<i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp. – kolonie bezbarwne, szczepy <i>Salmonella</i> wytwarzające H <sub>2</sub> S – z zaczernionym środkiem	Sole kwasów żółciowych, cytrynian	Laktoza (do odróżniania pałeczek laktozododatnich), tiosiarczan sodu
<b>Podłoże Simmons</b>	<i>Enterobacteriaceae</i> zdolne do wykorzystywania cytrynianu jako źródła węgla – kolonie niebieskie	Cytrynian sodowy, błękit bromotymolowy	Siarczan amonowy
<b>Podłoże z cetrimidem</b>	<i>Pseudomonas</i> spp.	Cetrimid	Enzymatyczny hydrolyzат żelazny
<b>Półpłynne podłoże Fletcher</b>	<i>Leptospira</i> spp. – zmętnienie górną warstwy pożywki	Pepton, surowica królicza (wspierają wzrost <i>Leptospira</i> )	Wyciąg mięsny
<b>Podłoże BSK II</b> (Barboura-Stoenera- -Kelly'ego II)	<i>Borrelia</i> spp.	Bardzo wolny wzrost krętków (inkubacja do 3 miesięcy)	Ok. 60 składników, m.in. aminokwasy, witaminy, elektrolity, surowica królicza
<b>Agar CHAB</b> (ang. <i>Cysteine Heart Agar with Blood</i> )	<i>Francisella tularensis</i>	Zhemolizowana krew barania	Wyciąg sercowo-mózgowy i chlorowodorek cysteiny

Tabela I b

Wybrane podłoża selektywne (wybiórczo-namnażające) dla bakterii Gram-dodatnich

Nazwa	Bakterie	Czynniki wybiórcze	Pozostałe istotne składniki
<b>Agar CNA</b> (ang. <i>Colistin Nalidixic Acid Agar</i> )	Bakterie Gram-dodatnie (gł. <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Listeria</i> spp.)	Kolistyna, kwas nalidyksowy	Krew barania
<b>Bulion LE</b> (ang. <i>Listeria Enrichment Broth</i> )	<i>Listeria</i> spp., ew. <i>Staphylococcus</i> spp.	Tiocyanian potasu lub chloro- wodorek akryflawiny, w modyfi- kacjach także: kolistyna, kwas nalidyksowy, cykloheksamid	Pepton, glukoza, witaminy
<b>PALCAM agar – agar selektywny wg Nettena</b> (ang. <i>Listeria Selective Agar Base</i> )	<i>Listeria</i> spp. – kolonie oliwkowo- zielone lub czarne, otoczone czarną strefą (rozkład eskuliny), ew. mannitolododatnie gronkowce (żółte)	Akryflawina, chlorek litu, antybiotyki (polimyksyna i ceftazydym)	Mannitol, eskulina, sole żelaza
<b>Agar CCF</b> (ang. <i>Cycloserine- -Cefoxitin-Fructose Agar</i> )	<i>Clostridium difficile</i> – kolonie żółte, przypominające matowe szkło na tle różowego podłoża, zapach końskiego nawozu	Cykloseryna, cefoksytyna	Fruktoza
<b>Podłoże Middlebrooka</b>	<i>Mycobacterium</i> spp.	Zieleń malachitowa, w systemach automatycznych także zestaw antybiotyków i chemioterapeutyków	Sole mineralne, glukoza, glicerol, albumina, kwas oleinowy, witaminy, czynniki wzrostowe i katalaza
<b>Podłoże Loewensteina-Jensena</b> (L-J)	<i>Mycobacterium</i> spp.	Zieleń malachitowa	Asparagina, glicerol, mąka ziemniaczana, jaja kurze
<b>Podłoże Stonebrinka</b>	<i>Mycobacterium</i> spp., w tym katalazoujemne, odporne na izoniazyd (INH)	Zieleń malachitowa	Pirogronian sodu, glicerol, mąka ziemniaczana, jaja kurze
<b>Podłoże Rogosa</b>	<i>Lactobacillus</i> spp.	pH 5,5	Pepton, wyciąg drożdżowy, glukoza, Tween 80, sole mineralne

## 4) Podłoża różnicujące (izolacyjne)

Podłoża różnicujące są odpowiednie dla wielu bakterii, jednak obecne w ich składzie czynniki różnicujące (inaczej: indykatory), umożliwiają ich rozróż-

nienie na podstawie identyfikacji określonych cech, np. hemolizy czy fermentacji danego cukru. Przykładowe podłoża izolacyjne wraz z ich najważniejszymi składnikami i grupami bakterii, do których

Tabela II  
Wybrane podłoża różnicujące (selektywne)

Nazwa	Bakterie	Czynniki wybiórcze	Pozostałe istotne składniki
<b>Agar Columbia</b>	Bakterie wymagające, różnicowanie na podstawie typu hemolizy ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )	Krew barania lub końska	Enzymatyczny hydrolizat kazeiny i tkanek zwierzęcych, wyciąg drożdżowy
<b>Agar CLED</b> (ang. <i>Cystine-Lactose-Electrolyte-Deficient Agar</i> )	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp. Bakterie laktozododatnie – kolonie żółte, zażółcenie podłoża; laktozoujemne – bezbarwne z ciemnoniebieską otoczką ( <i>Pseudomonas</i> spp. – brązowawy środek)	Laktoza	L-cysteina, mała ilość elektrolitów, błękit bromotymolowy
<b>Podłoże Kliglera</b>	<i>Enterobacteriaceae</i> , brak fermentacji cukrów – zmiana barwy podłoża z lososiowej na czerwoną, fermentacja glukozy – zażółcenie części słupkowej (skos wtórnie lososiowy), fermentacja laktozy – utrzymujące się zażółcenie skosu i słupka, wytwarzanie CO <sub>2</sub> lub H <sub>2</sub> – unoszenie lub rozerwanie podłoża, wytwarzanie H <sub>2</sub> S – czarny strął w części słupkowej	Glukoza, laktoza, tiosiarczan, jony żelaza, wskaźnik pH	Hydrolizat kazeiny i wyciąg z tkanek zwierzęcych
<b>Podłoże do obserwacji zdolności ruchu bakterii</b>	Bakterie urzęsione (ruchliwe) – wzrost w całej objętości podłoża, bakterie nieurzęsione (nieruchliwe) – wzrost w kanale wkłucia	0,3–0,4% agaru	Bulion odżywczy, w modyfikacji: 1% TTC (chlorek 3,2,5-trifenylo-tetrazoliowy – ciemnoczerwone zabarwienie ułatwia określenie strefy wzrostu)
<b>Podłoże Loefflera</b>	Bakterie wymagające, <i>Corynebacterium</i> spp. – rosną szybciej niż pozostałe, wytwarzają liczne ziarna metachromatyczne	Surowica końska	Bulion wzbogacony, glukoza
<b>Podłoże płynne Stuarta</b>	Bakterie wytwarzające ureazę – zmiana barwy podłoża z żółtej na różowoczerwoną, bakterie niewytwarzające ureazy – brak zmiany barwy	Mocznik (2%) i czerwień fenolowa	Ekstrakt drożdżowy
<b>Agar Christensena</b>	Bakterie wytwarzające ureazę – zmiana barwy podłoża z żółtej na różowoczerwoną w ciągu kilku godzin ( <i>Proteus</i> spp.) lub dni ( <i>Klebsiella</i> spp.), bakterie nie wytwarzające ureazy – brak zmiany barwy	Mocznik (2%) i czerwień fenolowa	Pepton, dekstroza

wzrostu są przystosowane, przedstawiono w tabel II [2, 4, 17, 21, 23].

#### 5) Podłoża wybiórczo-różnicujące

Podłoża tego typu łączą właściwości pożywek różnicujących i selektywnych, tzn. umożliwiają różnicowanie określonych rodzajów/gatunków bakterii oraz hamują wzrost flory towarzyszącej. Wybrane podłoża wybiórczo-izolacyjne wraz z ich najważniejszymi składnikami i grupami bakterii, do których wzrostu są przeznaczone, przedstawione zostały w tabelach III a i III b [2, 4, 11, 17, 21].

#### 6) Podłoża chromogenne

Podłoża chromogenne wydzielone zostały jako odrębna grupa ze względu na to, że mogą mieć one właściwości wybiórczo-różnicujące lub też wybiórczo-namnażające. Charakteryzują się dodatkiem substratów,

które ulegając hydrolizie pod wpływem wytwarzanych przez bakterie enzymów, przekształcane są do barwnych produktów. Oczekiwana cechą substratów chromogennych jest tworzenie produktów, które nie dyfundują do podłoża, co jest szczególnie istotne w wykrywaniu patogenów w kulturach mieszanych. W teorii, flora towarzysząca na pożywkach chromogennych powinna tworzyć bezbarwne kolonie lub jej wzrost powinien być całkowicie zahamowany. W skład podłoża często wchodzi kilka substratów chromogennych, co umożliwia rozróżnienie na jednym podłożu chromogennym kilku rodzajów/gatunków bakterii jednocześnie [1, 12].

Często spotykanymi substratami w podłożach komercyjnych są indoksył i jego chloropochodne, które mogą być przekształcane w wiele barwnych związków. Spontaniczna dimeryzacja cząsteczek indoksyłu w obecności tlenu powoduje tworzenie barwnika indygo.

Tabela III a  
Wybrane podłoża wybiórczo-różnicujące dla bakterii Gram-ujemnych

Nazwa	Bakterie	Czynniki wybiórcze	Czynniki różnicujące
<b>MacConkey agar</b>	<i>Enterobacteriaceae</i> laktozododatnie – kolonie różowe, laktozoujemne – kolonie bezbarwne	Sole żółciowe, fiolet krystaliczny	Laktoza, czerwień obojętna
<b>Podłoże HE</b> (ang. <i>Hektoen Enteric Agar</i> )	Bakterie nie fermentujące żadnego cukru ( <i>Shigella</i> , <i>Providencia</i> , <i>Morganella</i> ) – kolonie zielone, ale wytwarzające H <sub>2</sub> S ( <i>Salmonella</i> , <i>Proteus mirabilis</i> ) – zielone z czarnym środkiem, fermentujące przynajmniej jeden cukier ( <i>Escherichia</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Serratia</i> i <i>Shigella sonnei</i> ) – żółte z różową/pomarańczową strefą wokół, fermentujące cukry i wytwarzające H <sub>2</sub> S ( <i>Proteus vulgaris</i> ) – żółte z czarnym środkiem, ew. <i>Vibrio cholerae</i> – kolonie łososiowożółte	Sole żółciowe	Laktoza, sacharoza, salicyna, błękit tymolowy, fuksyna kwaśna
<b>Agar XLD</b> (ang. <i>Xylose Lysine Desoxycholate Agar</i> )	<i>Salmonella</i> spp. – kolonie czerwone z czarnym środkiem, <i>Shigella</i> spp. – kolonie czerwone, pozostałe <i>Enterobacteriaceae</i> – kolonie żółte, zażółcenie podłoża	Dezoksycholan sodu	Ksyloza, lizyna, czerwień obojętna
<b>Podłoże Wilsona-Blaira</b>	<i>Salmonella</i> Typhi – kolonie czarne z metalicznym połyskiem, czarne zabarwienie podłoża, <i>Salmonella</i> Enteritidis – kolonie czarne, bez połysku, czarne zabarwienie podłoża, pozostałe <i>Salmonella</i> – kolonie jasnozielone, brak zabarwienia podłoża, wzrost pozostałych pałeczek jelitowych silnie zahamowany, ew. drobne, brunatne kolonie	Zieleń brylantowa, siarczyn bizmutu	Siarczan żelaza, siarczyn bizmutu
<b>Bulion Schaedlera</b>	Bakterie beztlenowe o wysokich wymaganiach odżywczych, np. z rodzaju <i>Bacterioides</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Fusobacterium</i> , fermentacja cukru – zmiana barwy purpury bromokrezolowej na żółtą	Filochinon (witamina K1), L-cystyna	1% dodatek wybranego cukru, purpura bromokrezolowa (nakraplana na wyrosłe kolonie)
<b>Podłoże EMB</b> (ang. <i>Eosine Methylene Blue</i> )	<i>Enterobacteriaceae</i> Bakterie fermentujące laktozę i sacharozę (np. <i>Escherichia</i> ) – kolonie zielonkawoczarne z metalicznym połyskiem, słabo fermentujące – kolonie fioletowe, laktozoujemne – bezbarwne lub o barwie podłoża	Barwniki anilinowe: eozyna, błękit metylenowy	Laktoza, sacharoza
<b>Podłoże TCBS</b> (ang. <i>Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar</i> )	Przecinkowce fermentujące sacharozę ( <i>V. cholerae</i> , <i>V. alginolyticus</i> ) – kolonie gładkie, żółte z przezroczystymi brzegami, niefermentujące sacharozę ( <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> ) – kolonie niebieskozielone	Wysokie pH, żółć, sole żółciowe	Sacharoza
<b>Agar CIN</b> (ang. <i>Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin Agar</i> )	<i>Yersinia enterocolitica</i> – kolonie z jasnoróżowym lub czerwonym środkiem i bezbarwnym brzegiem (tzw. „bycze oko”), <i>Plesiomonas shigelloides</i> – kolonie bezbarwne, ew. drobne kolonie <i>Serratia</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp. i <i>Enterococcus</i> spp.	Cefsulodyna, irgasan, nowobiocyna	Mannitol, fiolet krystaliczny, czerwień obojętna
<b>Podłoże BBE</b> (ang. <i>Bacteroides Bile Esculin</i> )	<i>Bacteroides fragilis</i> – ciemne kolonie z czarnobrązową strefą zmętnienia (kompleks eskuletyny i żelaza)	Żółć, gentamycyna	Eskulina, cytrynian żelazowo-amonowy

Samo chlorowcowanie indoksyłu także ma duży wpływ na powstałą barwę, np. 5-bromo-4-chloro-indoksył jest zielononiebieski, a 5-bromo-6-chloro-indoksył intensywnie różowy. Drugą grupą popularnych substratów chromogennych są chelatory metali, np. eskulina czy 8-hydroksychinon. Eskulina jest substratem dla β-glukozydazy i pod jej wpływem przekształcana jest do eskuletyny (6,7-dihydroksykumaryny). Zarówno

eskuletyna, jak i glikozydy 8-hydroksychinonu tworzą czarnobrązowe chelaty żelaza [12].

Podłoża chromogenne stosowane są do różnicowania, izolacji, identyfikacji wstępnej – w określonych przypadkach identyfikacja może być uznana za ostateczną, np. *S. agalactiae* na podłożu Granada – oraz wykrywania mechanizmów oporności w diagnostyce zakażeń i testach przesiewowych w nadzorze epi-

Tabela III b  
Wybrane podłoża wybiórczo-różnicujące dla bakterii Gram-dodatnich

Nazwa	Bakterie	Czynniki wybiórcze	Czynniki różnicujące
<b>Podłoże Chapmana</b>	<i>Staphylococcus</i> spp. – wytwarzanie pigmentu (zwłaszcza <i>S. aureus</i> ), nakropienie 0,004% błękitu bromotymolowego – zabarwienie podłoża wokół gronkowców rozkładających mannitol na żółto, nakropienie nasyconego roztworu siarczanu amonowego – zmętnienie podłoża, strefy przejśnienia wokół <i>S. aureus</i>	NaCl (7,5%), azydek sodu (65 mg/l)	Mannitol, kazeina
<b>Podłoże z mannitolem i NaCl</b>	<i>Staphylococcus</i> spp., kolonie rozkładające mannitol są żółte, podłoże zmienia barwę z lososioworóżowej na żółtą	NaCl (7,5%)	Mannitol, czerwień fenolowa
<b>Podłoże Baird-Parker</b>	<i>Staphylococcus</i> spp. <i>S. aureus</i> – kolonie czarne (silna redukcja tellurynu), pozostałe gatunki – szare. Zmętnienie wokół kolonii (przy dodatku żółtka jaja najczęściej <i>S. aureus</i> , przy osoczu – gronkowce koagulazododatnie)	Chlorek litu, telluryn sodu (hamują wzrost innych bakterii), pirogronian i glicyna (stymulują wzrost gronkowców)	Żółtko jaja kurzego lub osocze królicze
<b>Podłoże z krwią i azydkiem</b>	<i>Streptococcus</i> spp. – kolonie szarawe, bardzo drobne, <i>Staphylococcus</i> spp. – kolonie białoszare, większe	Azydek sodu	Krew barania
<b>Podłoże Tinsdale'a</b>	<i>Corynebacterium</i> spp. – kolonie czarne lub szare, u <i>C. diphtheriae</i> , <i>C. ulcerans</i> i <i>C. pseudotuberculosis</i> – brązowe zabarwienie podłoża wokół kolonii	Telluryn potasowy	Telluryn sodowy, tiosiarczan sodowy

miologicznym. Zastosowanie podłoży chromogennych pozwala na szybsze podjęcie działań mających na celu ograniczenie rozprzestrzeniania się patogenu i rozpoczęcie leczenia pacjenta. Mimo, że same podłoża chromogenne są droższe od klasycznych, ich użycie przyczynia się do obniżenia całkowitych kosztów diagnostyki poprzez ułatwienie rozpoznawania patogenów w hodowlach mieszanych, zmniejszenie liczby niezbędnych podłoży i testów biochemicznych oraz ogólne uproszczenie i skrócenie procesu identyfikacji [1, 4, 18].

Poszczególne rodzaje podłoży chromogennych dedykowane są określonym gatunkom lub grupom drobnoustrojów, np. do wykrywania *E. coli* używane jest m.in. podłoże TBX (Tryptone Bile X-Glucuronide Agar), na którym pod wpływem działania  $\beta$ -glukuronidazy jej kolonie przyjmują barwę zielono-niebieską lub podłoże Rainbow Agar O157 dedykowane *E. coli* O157:H7. Przykładowe podłoża chromogenne dla *Salmonella* spp. to Rambach agar, SM-ID (ang. *Salmonella* Detection and Identification Medium), podłoże ABC ( $\alpha$ - $\beta$  chromogenic medium) i BBL CHROM-agar *Salmonella* [12, 22].

Podłożem do szybkiej izolacji i wstępnej identyfikacji większości patogenów układu moczowego jest np. HiCrome UTI agar. Różowa lub czerwona barwa kolonii na tym podłożu świadczy o obecności bakterii wytwarzających  $\beta$ -galaktozydazę (*E. coli*), niebieska –  $\beta$ -glukozydazę (bakterie z rodzajów *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* i *Serratia*), natomiast brązowa, z barwnikiem dyfundującym do podłoża – deami-

nazę tryptofanu (*Proteus* spp.). Białe kolonie tworzone są przez *S. saprophyticus*, a bezbarwne przez *Pseudomonas* spp. [1].

Do izolacji *S. aureus* używane są m.in. CHROMagar *S. aureus*, na którym gronkowiec złocisty tworzy kolonie różowe lub fioletowe, a pozostałe gronkowce – białe lub niebieskie i *S. aureus* ID, na którym wytwarzający  $\alpha$ -glukozydazę *S. aureus* barwi się na zielono, podczas gdy inne gronkowce – wytwarzające  $\beta$ -glukozydazę – wyrastają w postaci białych lub różowych kolonii. Osobną grupę stanowią podłoża dla szczepów metycylooopornych, np. ORSAB (ang. Oxacillin Resistance Screening Agar), CHROMagar MRSA, MRSA ID i MRSA Select [12].

Niektóre podłoża chromogenne, np. CHROMagar *Yersinia* (CAY), pozwalają odróżnić szczepy patogeniczne od niepatogennych. W tym przypadku kolonie szczepów patogennych *Yersinia enterocolitica* mają barwę jasnofioletową, a niepatogennych – niebieską z metalicznym połyskiem, podobnie jak kolonie pozostałych *Enterobacteriaceae*, których wzrost nie został zahamowany. Reakcje chromogenne nakierowane są na kilka enzymów, m.in.  $\beta$ -glukozydazę [8, 16].

#### 7) Podłoża do badania lekowrażliwości

Ważnym etapem diagnostyki bakteriologicznej jest oznaczanie lekowrażliwości bakterii. Można ją oceniać metodą dyfuzyjno-krążkową na podstawie pomiaru wielkości strefy zahamowania wzrostu wokół krążka z antybiotykiem, metodą pasków z gradientem stężeń

(oznaczanie wartości MIC [mg/l]), metodą rozcieńczeniową w bulionie lub agarze, czy przy użyciu komercyjnych systemów automatycznych (oznaczanie wartości MIC w zakresie punktów odcięcia). Do badania lekowrażliwości bakterii tlenowych stosuje się Mueller-Hinton agar, w którego skład wchodzi m.in. wyciąg wołowy, hydrolizat kazeiny i skrobia. W przypadku badania lekowrażliwości wymagających bakterii tlenowych wykorzystywany jest Mueller-Hinton agar z 5% dodatkiem krwi końskiej i  $\beta$ -NAD (20 mg/l). Lekowrażliwość wymagających bakterii beztlenowych najczęściej badana jest na agarze Brucella, zawierającym enzymatyczny hydrolizat kazeiny i tkanek zwierzęcych, odwłóknioną krew końską (10%), witaminę K i heminę. W niektórych laboratoriach stosowane jest w tym celu także podłoże Wilkins-Chalgren. W jego składzie obecne są wyciągi z mięsa i drożdży oraz menadion (witamina K3) i hemina (czynnik X) [4, 17, 18].

## 5. Podsumowanie

Podłoża bakteriologiczne można podzielić ze względu na skład chemiczny, konsystencję czy zawartość substancji odżywczych, jednak ze względów praktycznych najczęściej wykorzystywany w diagnostyce mikrobiologicznej jest podział podłoży pod kątem ich zastosowania. Istnieje szereg podłoży bakteriologicznych, które dedykowane są danym grupom bakterii, a także przeznaczonych do posiewu odpowiednich materiałów klinicznych. Na szczególną uwagę zasługują podłoża chromogenne, które upraszczają i przyspieszają proces identyfikacji bakterii, dzięki tworzeniu barwnych produktów hydrolizy – charakterystycznych dla określonych grup bakterii.

Przy planowaniu badań w laboratorium należy uwzględnić wszystkie rodzaje podłoży. Ich dobór powinien być adekwatny do zakresu prowadzonych badań, by przy możliwie najmniejszej liczbie podłoży uzyskiwać wszystkie niezbędne informacje. Zwykle jest to kwestia indywidualna, związana z charakterem działalności danego laboratorium, jednak w niektórych gałęziach przemysłu, np. w przemyśle farmaceutycznym czy spożywczym, obowiązujące normy i przepisy ściśle określają wymagany asortyment podłoży.

Niezmiernie istotne są także zagadnienia związane z prawidłowym przygotowaniem i przechowywaniem podłoży. Mają one wpływ na jakość pożywek, a co za tym idzie, na ich przydatność do użycia i wiarygodność przeprowadzanych badań. Dlatego właśnie tak ważna jest kontrola jakości podłoży zarówno na etapie ich produkcji, jak i przed użyciem danej partii. Mimo ciągłego opracowywania nowych metod diagnostycznych, wyhodowanie bakterii z badanego materiału pozostaje „złotym standardem” w diagnostyce bakteriologicznej.

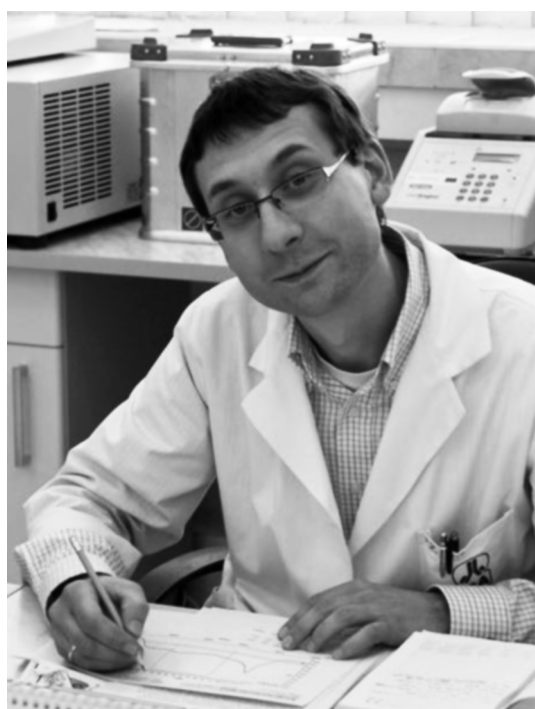
## Piśmiennictwo

1. Akter L., Haque R., Salam M.A.: Comparative evaluation of chromogenic agar medium and conventional culture system for isolation and presumptive identification of uropathogens. *Pak. J. Med. Sci.* **5**, 1033–1038 (2014)
2. Bulanda M., Zawilińska B. i wsp.: Bakteriologia szczegółowa (w) Mikrobiologia lekarska, red. P.B. Heczko, M. Wróblewska, A. Pietrzyk, PZWL, Warszawa, 2014, s. 100–236
3. Campbell L.A., Kuo C.C.: Cultivation and laboratory maintenance of *Chlamydia pneumoniae*. *Curr. Protoc. Microbiol.* doi: 10.1002/9780471729259.mc11b01s12 (2009)
4. De la Maza L.M., Pezzlo M.T., Shigei J.T., Tan G.L., Peterson E.M.: Color Atlas of Medical Bacteriology, 2nd Edition, ASM Press, USA, 2013
5. Fol M., Olek J., Kowalewicz-Kulbat M., Druszczyńska M., Rudnicka W.: Prątki niegruźlicze: *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. xenopi* – krótka charakterystyka drobnoustrojów i zmian klinicznych przez nie wywoływanych. *Postępy Hig. Med. Dośw.* **65**, 574–583 (2011)
6. Green L.H.: Practical Handbook of Microbiology, (w) Culturing and Preserving Microorganisms, 2nd Edition, red. E. Goldman, L.H. Green, CRC Press, USA, 2009, s. 31–35
7. Jarvis B., Druggan P. i wsp.: Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology, 3rd Edition, red. J.E.L. Corry, G.D.W. Curtis, R.M. Baird, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2011
8. Karhukorpi J., Paivanurmi M.: Differentiation of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A from pathogenic *Yersinia enterocolitica* biotypes by detection of  $\beta$ -glucosidase activity: comparison of two chromogenic culture media and Vitek2. *J. Med. Microbiol.* **63**, 34–37 (2014)
9. M22-A3:2004, Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media; Approved Standard – Third Edition, Clinical and Laboratory Standards Institute
10. Parija S.C.: General Microbiology (w) Textbook of Microbiology & Immunology, red. S. Nasim, Elsevier, India, 2009, s. 3–88
11. Park S.H., Ryu S., Kang D.H.: Development of an Improved Selective and Differential Medium for Isolation of *Salmonella* spp. *J. Clin. Microbiol.* **10**, 3222–3226 (2012)
12. Perry J.D., Freydiere A.M.: The application of chromogenic media in clinical microbiology. *J. Appl. Microbiol.* **30** (5), 2046–2055 (2007)
13. PN-EN 12322:2005, Wyroby medyczne do diagnostyki *in vitro*. Pożywki mikrobiologiczne – kryteria oceny działania pożywek mikrobiologicznych, Polski Komitet Normalizacyjny
14. PN-EN ISO 15189:2013-05, Laboratoria medyczne – wymagania dotyczące jakości i kompetencji, Polski Komitet Normalizacyjny
15. PN-EN ISO 17025:2005/Ap1:2007, Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących, Polski Komitet Normalizacyjny
16. Renaud N., Lecci L., Courcol R.J., Simonet M., Gaillot O.: CHROMagar *Yersinia*, a New Chromogenic Agar for Screening of Potentially Pathogenic *Yersinia enterocolitica* Isolates in Stools. *J. Clin. Microbiol.* **4**, 1184–1187 (2013)
17. Szewczyk E.M., Dudkiewicz B., Kwaszewska A., Lisiecki P., Różalska M., Sobiś-Glinkowska M., Szarapińska-Kwaszawska J., Szemraj J., Szemraj M., Wysocki P.: Podłoża, próby i metody diagnostyczne, Schematy diagnostyczne (w) Diagnostyka mikrobiologiczna, red. E.M. Szewczyk, PWN, Warszawa, 2013, s. 404–459
18. Stefaniuk E.: Medyczne laboratorium diagnostyczne. Metodyka i aparatura (w) Metody stosowane w diagnostyce mikrobiologicznej

- logicznej, red. B. Solnica, K. Sztefko, PZWL, Warszawa, 2015, s. 305–333
19. Strzyż M., Wendt U.: Zapewnienie jakości i kontrola jakości pożywek mikrobiologicznych w laboratorium medycznym. *Diagn. Lab.* **2**, 187–197 (2012)
20. Vandepitte J., Verhaegen J., Engbaek K., Rohner P., Piot P., Heuck C.C.: Zapewnienie jakości badań bakteriologicznych (w) Podstawowe procedury laboratoryjne w bakteriologii klinicznej, red. A. Przondo-Mordarska, PZWL, Warszawa, 2005, s. 12–28
21. Vandepitte J., Verhaegen J., Engbaek K., Rohner P., Piot P., Heuck C.C.: Najważniejsze podłoża i odczynniki (w) Podstawowe procedury laboratoryjne w bakteriologii klinicznej, red. A. Przondo-Mordarska, PZWL, Warszawa, 2005, s. 157–170
22. Verhaegen B., Reu K.D., Heyndrickx, De Zutter L.: Comparison of Six Chromogenic Agar Media for the Isolation of a Broad Variety of Non-O157 Shigatoxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) Serogroups. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **12**, 6965–6978 (2015)
23. Winn Jr. W., Allen S., Janda W., Koneman E.W., Procop G., Schreckenberger, Woods G.: Charts (w) Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6<sup>th</sup> Edition, red. E.W. Koneman, Lippincott Williams & Wilkins, USA, 2006, s. 1442–1461

## RADA REDAKCYJNA POSTĘPÓW MIKROBIOLOGII

Redakcja Postępów Mikrobiologii z prawdziwą przyjemnością przedstawia sylwetkę naukową nowego członka Redakcji, który z dniem pierwszego czerwca b.r. obejmuje funkcję sekretarza naukowego.



**Piotr Zaleski**

*Adres: Zakład Bioinżynierii, Instytut Biotechnologii i Antybiotyków, ul. Starościńska 5, 02-516 Warszawa, tel.: (22)3786229, e-mail: zaleskip@iba.waw.pl*

**dr Piotr Zaleski** ukończył studia na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego w 2000 r. Tytuł magistra biologii w zakresie mikrobiologii uzyskał brniąc pracy pt.: „Detekcja i charakterystyka ludzkich

astrowirusów w próbkach wody” pod opieką naukową prof. dr. hab. Jacka Bieleckiego. Część eksperymentalna pracy została wykonana w ramach wymiany studenckiej w programie Sokrates-Erasmus w laboratorium dr. Alberta Bosch-Navarro w Departamencie Mikrobiologii Wydziału Biologii Uniwersytetu w Barcelonie. Zainteresowanie biologią molekularną wirusów P. Zaleski rozwijał w czasie studiów doktoranckich w Zakładzie Wirusologii Instytutu Mikrobiologii Wydziału Biologii UW. Tytuł naukowy decyzją Rady Wydziału Biologii UW uzyskał w 2005 roku na podstawie pracy pt.: „Rola metylotransferazy Dam w biologii *Haemophilus influenzae* i bakteriofaga HP1”, której promotorem był prof. dr. hab. Andrzej Piekarczyk. Po studiach doktoranckich P. Zaleski podjął pracę w Zakładzie Bioinżynierii Instytutu Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie. Jest autorem prac oryginalnych publikowanych w takich czasopismach jak: *SGM Microbiology*, *Plasmid*, *FEMS Microbiology Letters* czy *BioMed Research International*. P. Zaleski aktywnie uczestniczy w programie praktyk studenckich realizowanych przez Instytut Biotechnologii i Antybiotyków, jest również promotorem kilkunastu prac inżynierskich i magisterskich. W pracy naukowej P. Zaleski specjalizuje się w genetyce bakterii. Główne pole zainteresowania to biologia molekularna mobilnych elementów genetycznych bakterii, ze szczególnym uwzględnieniem wykorzystania plazmidów w biotechnologii. Od 2010 roku jest kierownikiem Pracowni Genetyki Bakterii w Zakładzie Bioinżynierii IBA. Ponadto od 2008 jest członkiem Rady Naukowej Instytutu Biotechnologii i Antybiotyków pełniąc funkcję jej sekretarza.



## SPIS TREŚCI

U. Wachowska, A.D. Stasiulewicz-Paluch – Drożdże w bioindykacji zanieczyszczeń rolniczych .....	237
E. Prażmo, R. Godlewska, M. Kwaśny, A. Mielczarek – Udział czynników wirulencji <i>Enterococcus faecalis</i> w rozwoju chorób miazgi i tkanek okołowierzchołkowych ...	247
M. Andrejko – Modulacja humoralnej odpowiedzi odpornościowej gąsienic <i>Galleria mellonella</i> przez enzymy proteolityczne bakterii <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	255
K. Piasecka-Jóźwiak, B. Chabłowska, I. Stefańska – Kultury starterowe w piekarstwie – możliwość odzwierciedlenia tradycyjnego procesu fermentacji poprzez kształtowanie mikrobiota zakwasów piekarskich w przemysłowej produkcji pieczywa .....	268
M. Malinowska, B. Tokarz-Deptuła, W. Deptuła – Mikrobiom układu oddechowego w warunkach fizjologicznych i patologicznych .....	279
P. Niedźwiedzka-Rystwej, B. Tokarz-Deptuła, W. Deptuła – Granule RNA – nowe elementy odporności regulujące homeostazę organizmu .....	284
G. Stasiak, A. Mazur, P. Koper, K. Żebracki, A. Skorupska – Symbioza rizobiów z roślinami bobowatymi (Fabaceae) .....	289
K.I. Wolska, A.M. Grudniak, K. Markowska – Związki interferujące z bakteryjnymi systemami wyczuwania liczebności i ich potencjalna funkcja terapeutyczna .....	300

### PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

M. Łyszcz, A. Gałązka – Wybrane metody molekularne wykorzystywane w ocenie bioróżnorodności mikroorganizmów glebowych .....	309
A. Mikołajczyk, E. Stefaniuk, K. Bosacka, W. Hryniewicz – Właściwości i zastosowanie podłoży bakteriologicznych .....	320

## CONTENTS

U. Wachowska, A.D. Stasiulewicz-Paluch – Yeast as bioindicators of agricultural pollution .....	237
E. Prażmo, R. Godlewska, M. Kwaśny, A. Mielczarek – Virulence factors of <i>Enterococcus faecalis</i> in relation to pulp diseases and periapical infections .....	247
M. Andrejko – Modulation of the humoral immune response in <i>Galleria mellonella</i> larvae by proteolytic enzymes produced by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	255
K. Piasecka-Jóźwiak, B. Chabłowska, I. Stefańska – Starter cultures for baked goods – the traditional fermentation process by formation of sourdough microbiota in the industrial bread production .....	268
M. Malinowska, B. Tokarz-Deptuła, W. Deptuła – The respiratory tract microbiota in physiological and pathological conditions .....	279
P. Niedźwiedzka-Rystwej, B. Tokarz-Deptuła, W. Deptuła – Granule RNA – nowe elementy odporności regulujące homeostazę organizmu .....	284
G. Stasiak, A. Mazur, P. Koper, K. Żebracki, A. Skorupska – Symbiosis of rhizobia with legume plants (Fabaceae) .....	289
K.I. Wolska, A.M. Grudniak, K. Markowska – Inhibitors of bacterial quorum sensing systems and their role as potential therapeutics .....	300

### METHODS AND STANDARDS

M. Łyszcz, A. Gałązka – Selected molecular methods used in assessing the biodiversity of soil organisms .....	309
A. Mikołajczyk, E. Stefaniuk, K. Bosacka, W. Hryniewicz – Properties and uses of bacteriological media .....	320

