

Kwartalnik

Tom 55

Zeszyt 4•2016

PAŹDZIERNIK – GRUDZIEŃ

CODEN:

PMKMAV 55 (4)

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 RÓŻAŁSKI (Uniwersytet Łódzki),
ALEKSANDRA SKŁODOWSKA (Uniwersytet Warszawski), RADOŚLAW STACHOWIAK (Uniwersytet Warszawski),
BOHDAN STAROŚCIAK (Warszawski Uniwersytet Medyczny), BOGUSŁAW SZEWCZYK (Uniwersytet Gdański),
ELŻBIETA TRAFNY (Wojskowa Akademia Techniczna),
STANISŁAWA TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA (Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego), GRZEGORZ WĘGRZYN (Uniwersytet Gdański),
PIOTR ZALESKI (Instytut Biotechnologii i Antybiotyków), PIOTR ZIELENKIEWICZ (Uniwersytet Warszawski)

REDAKCJA

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

ADRES REDAKCJI

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

Redaktorzy:

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

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

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

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

PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

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

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

STALI RECENZENCI:

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

ISBN 978 - 83 - 923731 - 3 - 1

Informacja o zdjęciu na okładce:

Komórki Neisseria gonorrhoeae, mutant szczepu FA1090.

Preparatyka: dr Agnieszka Kwiatek, Zakład Wirusologii, Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet Warszawski.
Zdjęcie: mgr Paweł Bącal, Pracownia Teorii i Zastosowań 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.walendzewicz@gmail.com; projekt okładki: Jerzy Grzegorkiewicz

Podziękowania

Redakcja *Postępów Mikrobiologii* serdecznie dziękuje naszym Recenzentom
spoza Rady Redakcyjnej:

Pani Doktor Tamarze Aleksandrak-Piekarczyk

Pani Doktor Jadwidze Baj

Panu Profesorowi Wiesławowi Barabaszowi

Panu Doktorowi Piotrowi Borsukowi

Pani Profesor Katarzynie Jagusztyn-Krynckiej

Panu Profesorowi Wiesławowi Kurzątkowskiemu

Panu Doktorowi Antoniemu Miernikowi

Pani Profesor Magdalenie Popowskiej

Pani Profesor Annie Skorupskiej

Panu Profesorowi Zdzisławowi Targońskiemu

Panu Profesorowi Stefanowi Tyskiemu

Pani Profesor Krystynie I. Wolskiej

Kamil Adamczewski^{1*}, Jarosław Kowalik¹, Adriana Łobacz¹

¹ Katedra Mleczarstwa i Zarządzania Jakością, Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

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

1. Wprowadzenie. 2. Przypadki listeriozy. 3. Listerioza wywołana konsumpcją żywności zanieczyszczonej *L. monocytogenes*. 4. Innowacyjne rozwiązania technologiczne obniżające ryzyko występowania *L. monocytogenes* w żywności. 5. Podsumowanie

***Listeria monocytogenes* – survival and methods of its elimination from dairy products**

Abstract: Changing consumer's preferences and expectations exhort food producers to seek for new technological solutions. Many research and epidemiological studies confirm that *Listeria monocytogenes* can grow in many types of food products, thus posing a serious threat to consumers. The growth of this pathogen in food may be limited by the application of different natural substances which have antimicrobial effect. Some species, oils as well as certain microorganisms and/or their metabolites exhibit antilisterial activity. Occurrence in foods and outbreaks caused by *L. monocytogenes* mobilize science and food industry to explore more effective, innovative but at the same time natural methods of food preservation, which would ensure the microbiological safety of food products.

1. Introduction. 2. Listeriosis outbreaks. 3. Listeriosis resulting from the consumption of food contaminated with *L. monocytogenes*. 4. Innovative technological solutions to reduce the risk of occurrence of *L. monocytogenes* in food. 5. Summary

Słowa kluczowe: bezpieczeństwo żywności, *L. monocytogenes*, naturalne konserwanty

Key words: food safety, *L. monocytogenes*, natural preservatives

1. Wprowadzenie

Przeżywalność drobnoustrojów w żywności zależy od wielu czynników. Do rozwoju mikroorganizmów niezbędne jest zapewnienie optymalnych warunków środowiska, przede wszystkim temperatury, pH, aktywności wody oraz dostępność substancji odżywczych. Wpływ na przeżywalność i namnażanie się bakterii w produktach spożywczych mają głównie takie czynniki jak: skład chemiczny i struktura produktu, obecność środków konserwujących i mikroflory towarzyszącej oraz sposób ich utrwalania, pakowania i przechowywania [25, 26, 44]. Żywność jest idealnym środowiskiem do rozwoju mikroflory zarówno saprofitycznej, jak i niepożądananej, w tym patogenicznej.

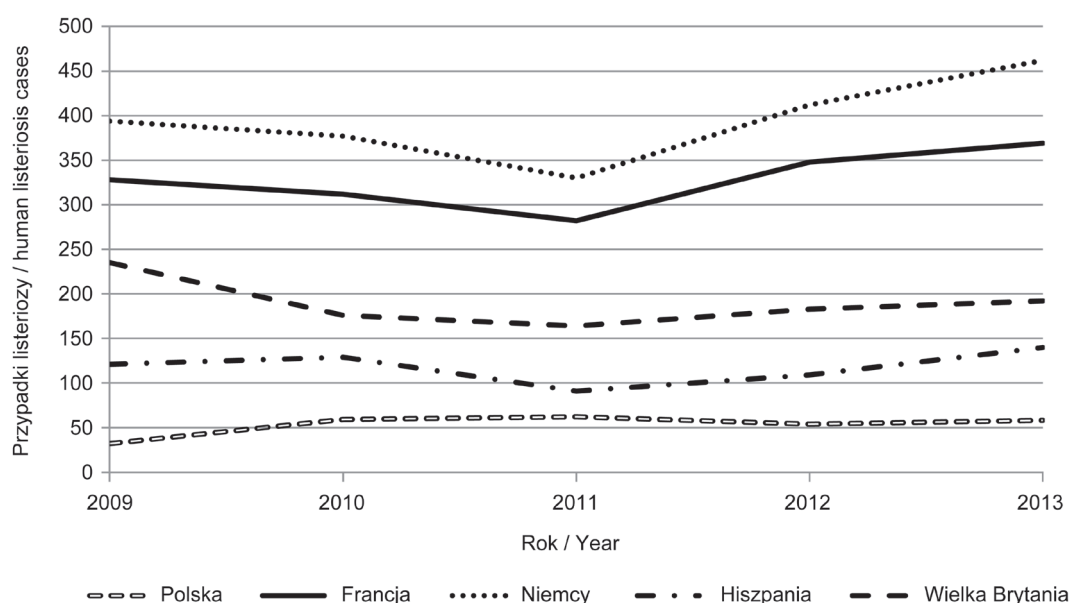
Pałeczka *Listeria monocytogenes* to niewielka (średnica: $0,5 \times 0,5\text{--}2\text{ }\mu\text{m}$) Gram-dodatnia bakteria, która wraz z *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. murrayi* oraz *L. welshimeri* należy do rodziny *Listeriaceae*. *Listeria* jest drobnoustrojem szeroko rozpowszechnionym w środowisku naturalnym. W łatwy sposób może znaleźć się w środowisku produkcyjnym żywności, a następnie w wyniku niewłaściwego procesu np. mycia czy też reinfekcji produktu, może je zanieczyszczać. Komórki *Listeria* posiadają zdolność do namnażania się w szerokim zakresie pH (4,4–9,6)

i temperatury (0–45°C) [10, 18, 24, 28, 35, 48]. Obecność tego patogenu odnotowano w wielu grupach środków spożywczych: mięso, ryby, owoce, warzywa, produkty mleczarskie oraz mrożonki. [5, 7, 10, 11, 36, 47]. Komórki patogenu mogą być przyczyną: zapalenia żołądka, jelit, opon mózgowych, wywoływać posocznice (szczególnie u noworodków). Listerioza charakteryzuje się wysoką śmiertelnością (20–30%) i dotyczy głównie określonych grup ryzyka (nosiciele wirusa HIV, kobiety w ciąży i noworodki, osoby z chorobą nowotworową i po przeszczepach). Wystąpienie listeriozy zależy od stopnia zanieczyszczenia produktów spożywczych, stanu zdrowia konsumenta oraz patogenności szczepów [1, 25, 35].

2. Przypadki listeriozy

Na przestrzeni ostatnich 25 lat najczęściej przypadków listeriozy wywołanej spożyciem zanieczyszczonej komórkami patogenu żywności odnotowano we Włoszech. W 1997 roku w wyniku konsumpcji sałatki z tuńczyka zawierającej 10^6 jtk/g *L. monocytogenes* zachorowało 1566 osób [42]. Na obszarze Unii Europejskiej (UE) zaobserwowano wzrost liczby zachorowań na listeriozę. Największy odsetek choroby odnotowano

* Autor korespondencyjny: Katedra Mleczarstwa i Zarządzania Jakością, Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. M. Oczapowskiego 7, 10-719 Olsztyn; tel. 89 523 43 39; e-mail: kamil.adamczewski@uwm.edu.pl



Rys. 1. Przypadki ludzkiej listeriozy w wybranych krajach UE. Opracowano na podstawie [13]

w 2013 roku w Finlandii, Hiszpanii, Szwecji i Danii (odpowiednio: 1,12, 1,00, 0,97 i 0,91 przypadków na 100 000 mieszkańców). Obecność tego patogenu w żywności stwierdzono w wielu krajach UE gdzie zarejestrowano wzrost przypadków listeriozy z 1425 w 2008 roku do 1763 w 2013 roku (Rys. 1) [13, 14].

Od 2002 roku na obszarze UE funkcjonuje system RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) w celu ochrony konsumentów przed potencjalnie niebezpieczną żywnością. Działanie tego systemu polega na gromadzeniu, analizowaniu i szybkim rozpowszechnianiu informacji o produktach spożywczych i paszach stanowiących zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Wszystkie powiadomienia publikowane są w rocznych raportach zamieszczonych na stronie internetowej systemu [17, 32]. W 2015 roku do systemu RASFF wpłynęło 107 zgłoszeń dotyczących wykrycia *L. monocytogenes* w żywności, co stanowi wzrost o 3 i 31 przypadków, odpowiednio w 2014 i 2013 roku. Obecność tego patogenu stwierdzono m.in. w serze gorgonzola (3,7 log jtk/g, Włochy), w serach wyprodukowanych z surowego mleka krowiego (> 3,77 log jtk/g, Francja) i owczego (3,2 log jtk/g, Hiszpania).

3. Listerioza wywołana konsumpcją żywności zanieczyszczonej *L. monocytogenes*

Obecność pałeczek *L. monocytogenes* w mleku surowym wynosi na świecie od 0,4 do 16% [2, 20, 22]. Zdolności adaptacyjne *L. monocytogenes* wpływają na rozwój tego patogenu w produktach przechowywanych w niskich temperaturach, o wysokiej zawartości NaCl i tłuszczu. W 1999 roku w Finlandii odnoto-

wano epidemię listeriozy po spożyciu masła wyprodukowanego z pasteryzowanej śmietanki metodą ciągłą [23]. W wyniku epidemii analizie poddano 259 próbek masła z opakowań o zróżnicowanej gramaturze pochodzących ze szpitali, restauracji i sklepów. Obecność komórek *L. monocytogenes* stwierdzono w 46% pobranych próbek. Liczba komórek patogenu w próbkach masła wynosiła 4, 2,5 oraz 1,17 log jtk/g. (odpowiednio w opakowaniach jednostkowych o masie: 7, 10 i 500 g). Na podstawie zebranych danych oszacowano, iż średnie spożycie zanieczyszczonego masła przez pacjentów, u których wystąpiła listerioza wyniosło 13,78 g na osobę. Najwięcej przypadków listeriozy zanotowano w szpitalnych oddziałach hematologii, pulmonologii i onkologii. Stwierdzono również, że źródłem *L. monocytogenes* w zakładzie produkcyjnym był przenośnik ślimakowy oraz rura wylotowa masła z masielnicy. Obecność pałeczek patogenu stwierdzono również w kratkach ściekowych i na powierzchniach urządzeń pakujących [23].

Przypadki listeriozy zanotowano także w północno-zachodniej części Szwajcarii zamieszkaną przez ok. 150 000 mieszkańców. Po spożyciu sera miękkiego typu „tomme” odnotowano 10 przypadków listeriozy, z czego 8 to osoby w podeszłym wieku, a w wyniku posocznicy 3 osoby zmarły. Dwa przypadki dotyczyły kobiet w ciąży, które poroniły w wyniku zakażenia płodu. Służby sanitarne wykazały, że ser był zanieczyszczony komórkami *L. monocytogenes* na poziomie 3–4 log jtk/g. Pomimo wszczęcia procedury wycofania produktów z rynku w ciągu kolejnych 10 dni zanotowano jeszcze dwa przypadki listeriozy [4].

Przedstawione przypadki zachorowań na listeriozę wskazują potrzebę monitorowania i badania jakości

mikrobiologicznej produktów spożywczych zgodnie z kryteriami bezpieczeństwa zdefiniowanymi w Rozporządzeniu WE 2073/2005 w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych (z późn. zm.). Badania zgodności produktów spożywczych z kryteriami zawartymi w ww. Rozporządzeniu powinny uwzględniać zmiany zachodzące w produkcji na etapach produkcji oraz przechowywania, w trakcie całego okresu przydatności do spożycia. Producent powinien na podstawie dostępnej literatury naukowej, badań fizykochemicznych i mikrobiologicznych produktu oraz innych narzędzi (np. mikrobiologii prognostycznej) opracować takie warunki produkcji żywności, aby zapewnić jej bezpieczeństwo [31, 45].

4. Innowacyjne rozwiązania technologiczne obniżające ryzyko występowania *L. monocytogenes* w żywności

Zachowanie drobnoustrojów chorobotwórczych (wzrost, inaktywacja, przeżywalność) zależy od zewnętrznych i wewnętrznych czynników środowiskowych, m.in.: czasu i temperatury, sposobu pakowania (warunki: tlenowe, beztlenowe, modyfikowana atmosfera), wilgotności względnej, jakości mikrobiologicznej surowca, pH, aktywności wody, zawartości składników antymikrobiologicznych czy sposobu postępowania konsumenta z produktem. W produkcji serów na rozwój niepożądanego mikroflory duże znaczenie ma rodzaj i aktywność kultur starterowych, szybkość oraz stopień ukwaszenia gęstwy serowej, metoda solenia, a także temperatura prowadzonego procesu technologicznego [33]. Ze względu na niską kwasowość i dużą zawartość wody sery miękkie stanowią dobre środowisko do rozwoju *L. monocytogenes*. Zawartość NaCl (2,3–3,5%) oraz kwasowość sera (pH 4,5–6,5) nie stanowią wystarczającej bariery dla rozwoju tego patogenu [12, 41].

W celu zapewnienia bezpieczeństwa mikrobiologicznego w produkcji żywności stosowane są dodatki w postaci konserwantów chemicznych (np. kwas sorbowy, benzoesowy). Ilość dodawanych konserwantów reguluje dyrektywa WE 52/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 5 lipca 2006 r. (z późn. zm.) w sprawie dodatków do żywności innych niż barwniki i substancje słodzące. Obecny na rynku spożywczym trend eliminacji wszelkich dodatków chemicznych jest pozytywnie postrzegany przez konsumentów, którzy coraz częściej analizują etykietę pod względem składu produktu. W związku z tym, do utrwalania produktów spożywczych zamiast konserwantów syntetycznych coraz częściej zastosowanie mają substancje pochodzenia naturalnego. Dodatki te odgrywają istotną rolę w procesie projektowania nowych i innowacyjnych wyrobów, modyfikacji składu istniejących produktów

oraz ustalania parametrów procesów technologicznych. Niektóre zioła i przyprawy stosowane w produkcji spożywczej wykazują potencjalne działanie antagonistyczne wobec pałeczek *L. monocytogenes*. Należą do nich: ziele angielskie, ekstrakt z oregano, goździki czy owoce np. borówki [37, 39]. Wykazano również antibakteryjne właściwości olejku z rozmarynu lekarskiego (*Rosmarinus officinalis*). Związki fenolowe pochodzenia roślinnego (tymol i karwakrol) działają hamująco na rozwój *Listeria* przy stężeniu 0,5–1%. W badaniach prowadzonych przez Tajkarimi i wsp. wykazano, iż wyekstrahowany z szałwii i rozmarynu wolny alkohol o nazwie borneol wykazywał działanie antymikrobiologiczne już przy stężeniu 0,02–0,05% [43].

Działanie bakteriobójcze lub bakteriostatyczne wobec *Listeria* wykazuje wiele szczepów bakterii fermentacji mlekowej (LAB) wchodzących w skład kultur starterowych wykorzystywanych w przemyśle mleczarskim do produkcji różnego rodzaju produktów fermentowanych. Wymieranie pałeczek *L. monocytogenes* prawdopodobnie wynika ze współzawodnictwa o składniki pokarmowe, zmian potencjału oksydoredukcyjnego środowiska oraz syntezy przez LAB kwasów organicznych, bakteriocyn i substancji bakteriocynopodobnych. Bakterie fermentacji mlekowej wykazują antagonistyczne działanie wobec wielu patogenów i są zdolne do syntezy bakteriocyn (klasy IIa). Udowodniono, że wytwarzana przez *Lactococcus lactis* laktocyna 3147 redukowała o 99,9% liczebność *L. monocytogenes* w serach twarogowych, natomiast pediocyna produkowana przez *Lactococcus lactis* CL1 obniżała poziom o 3 log jtk/g tego patogenu w serach dojrzewających [3, 39]. Większość bakteriocyn produkowanych przez LAB nie wpływa negatywnie na aktywność metaboliczną pożądanego mikroflory, a substancje te największą aktywność antylisterijną wykazują w warunkach chłodniczych. Skuteczność działania bakteriocyn zależy również od składu produktu. Bakteriocyny często wiążą się ze składnikami żywności lub ulegają inaktywacji wskutek działania enzymów proteolitycznych [16, 39, 40]. Wykazano, że największe działanie antagonistyczne wobec *Listeria* posiadają następujące szczepy: *Lactococcus lactis*, *Lactococcus garvieae*, *Lactobacillus plantarum* i *Leuconostoc mesenteroides*. Wymienione gatunki drobnoustrojów znalazły zastosowanie w produkcji różnych rodzajów serów, tj. twarogowych kwasowych, kwasowo-podpuszczkowych i dojrzewających typu holenderskiego [39]. Montiel i wsp. zbadali wpływ reuteryny, wytwarzanej przez probiotyczny szczep *Lactobacillus reuteri*, na zachowanie *Listeria* w łososiu wędzonym na zimno zanieczyszczonym na poziomie 5 log jtk/g. Zaobserwowano, iż dodatek reuteryny w ilości 10 mg/g zahamował wzrost *Listeria* w temperaturze 8°C w czasie 15 dni, a w 30°C przez 8 godzin [27]. Ze względu na swoje

właściwości reuteryna znalazła już zastosowanie w medycynie. W badaniach klinicznych stwierdzono ponadto, że szczep *L. reuteri* ATCC 55730 wykazuje pozytywne działanie w zwalczaniu problemów gastrycznych niemowląt [30]. Syntetyzowana przez *L. reuteri* bakteriocyna charakteryzuje się szerokim spektrum antybakteryjnym, aktywnością w środowisku o zmiennej kwasowości, a także odpornością na działanie enzymów lipo- i proteolitycznych. Powyższe właściwości tego związku czynią go użytecznym w zapewnieniu dodatkowej ochrony przed rozwojem *L. monocytogenes*, np. w przypadku produktów gotowych do spożycia przechowywanych w warunkach chłodniczych [48].

Niektóre grupy drobnoustrojów zdolne są do biosyntezy metabolitów wtórnych, np.: związków powierzchniowo czynnych zwanych biosurfaktantami. Szczep *Bacillus subtilis* wytwarza lipopeptyd surfaktinę, której amfifilowa struktura utrudnia adhezję *L. monocytogenes*, *Salmonella* oraz *Enterobacter sakazakii* do powierzchni stalowych urządzeń przemysłowych oraz opakowań [6, 29]. Hamujące działanie surfaktyny wobec *Listeria* potwierdzili Sabaté i Audisio [34]. Badacze zaobserwowali również, że metabolit ten zachowywał właściwości przeciwbakteryjne w szerokim zakresie pH (2–10) w obecności enzymów proteolitycznych. Na aktywność surfaktyny nie miały wpływu analizowane procesy cieplne: ogrzewanie pożywki (Brain Heart Infusion) przez 10 minut w 96°C oraz autoklawowanie przez 15 minut w temperaturze 121°C [34].

Innowacyjne metody ograniczenia czy też zahamowania wzrostu drobnoustrojów w żywności polegają na jednoczesnym zastosowaniu wielu czynników inaktywujących. Huq i wsp. zaobserwowali synergistyczny efekt promieniowania gamma i zastosowanych substancji o potencjalnym działaniu antylisteryjnym (olejek z oregano, cynamon, nizyna) w gotowych do spożycia produktach mięsnych [15]. Poprzez zastosowanie kilku zabiegów redukujących ryzyko wystąpienia niepożądanych drobnoustrojów w żywności eliminuje się stosowanie syntetycznych konserwantów co wpływa na poprawę postrzegania produktu przez konsumenta [49].

Peptydy anionowe pochodzące z białek serwatkowych stanowią przykład naturalnych substancji hamujących wzrost *L. monocytogenes*. Demers-Mathieu i wsp. poddali serwatkę procesowi nanofiltracji, a pozyskane białka hydrolizowano przy udziale enzymu trypsyny [8]. Badacze potwierdzili skuteczność antybakteryjną otrzymanych peptydów na przykładzie sera typu Cheddar. Możliwość zastosowania tych substancji w przemyśle spożywczym stanowić może dodatkowe zabezpieczenie przed rozwojem potencjalnie niebezpiecznej mikroflory [8]. Peptydy anionowe mogą reagować z innymi składnikami żywności, jak białka i tłuszcze. Z tego względu konieczne jest potwierdzenie skutecz-

ności antymikrobiologicznej tych substancji dla określonego produktu spożywczego [9]. Siła i wsp. badali antybakteryjne właściwości peptydów pochodzenia zwierzęcego [38]. Autorzy pozyskali peptydy (m.in.: Gly-Val-His, Trp-His-Arg, Trp-His-Phe) z białek mięsniowych ryby słodkowodnej – brzany (*Barbus callensis*) zdolne do niszczenia błony komórkowej pałeczek *Listeria*. Cytowane badania wskazują na możliwość zastosowania peptydów anionowych do eliminowania *L. monocytogenes* z żywności [38].

Innym sposobem zabezpieczania produktów spożywczych przed *L. monocytogenes* jest zastosowanie techniki wysokich ciśnień. Valdramidis i wsp. przeprowadzili badania z wykorzystaniem tej techniki w produktach mięsnych [46]. Autorzy stwierdzili, iż przy zastosowaniu ciśnienia powyżej 500 MPa *Listeria* nie była wykrywana już po 24 godzinach przechowywania [46]. Badania wykazały, że warunki prowadzenia procesu utrwalania żywności, jak również poziom stosowanych dodatków, wpływają na przeżywalność *Listeria* w produktach mięsnych. Przytoczone badania sugerują możliwości aplikacyjne techniki wysokich ciśnień również w innych gałęziach przemysłu spożywczego.

5. Podsumowanie

Na przeżywalność *L. monocytogenes* w produkcji żywności wpływają zarówno czynniki wewnętrzne (charakterystyka fizykochemiczna i mikrobiologiczna produktu spożywczego), jak również czynniki zewnętrzne (parametry technologiczne procesu, warunki pakowania i przechowywania produktów) [19, 21, 24]. W aspekcie bezpieczeństwa żywności stosowanie naturalnych substancji hamujących rozwój patogenów może być w pełni uzasadnione. Działanie naturalnych substancji o właściwościach hamujących wzrost i/lub przeżywalność mikroflory niepożądaną wykorzystujące zjawisko synergizmu może skutecznie chronić produkty spożywcze przed potencjalnym rozwojem *L. monocytogenes*. Przed wprowadzeniem do obrotu produktów zawierających naturalne inhibitory w postaci dodatków takich jak przyprawy i bakteriocyny, należy poddać je szczegółowej analizie pod względem ich kumulacji i oddziaływania na organizm człowieka (odkładanie się związków chemicznych w tkankach). Należy zwrócić szczególną uwagę na ewentualność wystąpienia nietolerancji pokarmowych, oddziaływania alergicznego oraz interakcji z przyjmowanymi przez konsumenta lekami. Poszukiwanie substancji pochodzenia naturalnego, które można wykorzystać jako składniki produktu pełniące funkcję naturalnego konserwantu, może mieć dodatkowe, szczególne znaczenie w przemyśle spożywczym z uwagi na wartości prozdrowotne, które są także elementem strategii marketingowej.

Piśmiennictwo

- Adamczewski K., Kowalik J.: Application of predictive microbiological tool for assuring the health safety of food. *Towarozn. Probl. Jakości*, **1**, 26–32 (2015)
- Almeida G., Magalhaes R., Carneiro L., Santos I., Silva J., Ferreira V., Hogg T., Teixeira P.: Foci of contamination of *Listeria monocytogenes* in different cheese processing plants. *Int. J. Food Microbiol.* **167**, 303–309 (2013)
- Araujo L.V., Abreu F., Lins U., Melo L.M.S.A., Nitschke M., Freire D.M.G.: Rhamnolipid and surfactin inhibit *Listeria monocytogenes* adhesion. *Food Res. Int.* **44**, 481–488 (2011)
- Bille J., Blanc D.S., Schmid H., Boubaker K., Baumgartner A., Siegrist H.H., Tritten M.L., Lienhard R., Berner D., Anderau R., Treboux M., Ducommun J.M., Malinverni R., Genné D., Erard P.H., Waespi U.: Outbreak of human listeriosis associated with tomme cheese in northwest Switzerland 2005. *Eurosurveillance*, **11**, 91–93 (2006)
- Cesare A., Valero A., Lucchi A., Pasquali F., Manfreda G.: Modeling growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in pork cuts from packaging to fork under different storage practices. *Food Control*, **34**, 198–207 (2013)
- Czaczyk K., Marciniak A., Białas W., Mueller A., Myszka K.: Wpływ czynników środowiskowych na biosyntezę lipopeptydów przez *Bacillus* spp. *Zywn. Nauk. Technol. Ja.* **1**, 140–149 (2007)
- Danyluk M.D., Friedrich L.M., Schaffner D.W.: Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* on cut cantaloupe, honeydew and watermelon. *Food Microbiol.* **38**, 52–55 (2014)
- Demers-Mathieu V., Gauthier S.F., Britten M., Fliss I., Robitaille G., Jean J.: Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth in Cheddar cheese by an anionic peptides-enriched extract from whey proteins. *J. Dairy J.* **32**, 6–12 (2013)
- Devlieghere F., Vermeiren L., Debevere J.: New preservation technologies: possibilities and limitations. *J. Dairy J.* **14**, 273–285 (2004)
- Dmowska K., Osek J.: Molekularne aspekty chorobotwórczości *Listeria monocytogenes*. *Med. Weter.* **66**, 236–241 (2010)
- Flessa S., Lusk D.M., Harris L.J.: Survival of *Listeria monocytogenes* on fresh and frozen strawberries. *Int. J. Food Microbiol.* **101**, 255–262 (2005)
- Gnanou B.N., Brissonnet F.D., Lafarge V., Leclerc V.: Effect of various environmental parameters on the recovery of sublethally salt-damaged and acid-damaged *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* **89**, 944–950 (2000)
- <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/EU-summary-report-zoonoses-food-borne-outbreaks-2012.pdf> (10 sierpnia 2015 roku)
- <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3991.pdf> (10 sierpnia 2015 roku)
- Huq T., Dang Vu K., Riedl B., Jean Bouchard J., Lacroix M.: Synergistic effect of gamma (γ)-irradiation and microencapsulated antimicrobials against *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat (RTE) meat. *Food Microbiol.* **46**, 507–514 (2015)
- Ibarguren C., Grosso C.R.F., Apella M.C., Carina Audisio C.: Anti-*Listeria monocytogenes* activity of enterocins microencapsulated by ionic gelation. *Food Hydrocolloid*, **29**, 21–26 (2012)
- Kleter G.A., Prandini A., Filippi L., Marvin H.J.P.: Identification of potentially emerging food safety issues by analysis of reports published by the European Community's Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) during a four-year period. *Food Chem. Toxicol.* **47**, 932–950 (2009)
- Kowalik J., Adamczewski K., Ziajka S.: Szacowanie wzrostu liczby komórek *Listeria monocytogenes* w serze mozzarella z wykorzystaniem urządzenia impedymetrycznego. *Zywn. Nauk. Technol. Ja.* **1**, 66–77 (2014)
- Kowalik J., Łobacz A., Adamczewski K., Tarczyńska A.S.: Zastosowanie alternatywnych metod oceny bezpieczeństwa mikrobiologicznego wybranych serów. *Zywn. Nauk. Technol. Ja.* **5**, 134–143 (2014)
- Kowalik J., Łobacz A., Tarczyńska A.S., Ziajka S.: Graphic validation of growth models for *Listeria monocytogenes* in the milk during storage. *Milchwissenschaft*, **1**, 67, 38–42 (2012)
- Latorre A.A., Van Kessel J.S., Karns J.S., Zurakowski M.J., Pradhan A.K., Boor K.J., Jayarao B.M., Houser B.A., Daugherty C.S., Schukken Y.H.: Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *J. Dairy Sci.* **93**, 2792–2802 (2010)
- Lomonaco S., Decastelli L., Nucera D., Gallina S., Bianchi D.M., Civera T.: *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola: subtypes, diversity and persistence over time. *Int. J. Food Microbiol.* **128**, 516–520 (2009)
- Majjala R., Lyytikäinen O., Johansson T., Autio T., Aalto T., Haavisto L., Honkanen-Buzalski T.: Exposure of *Listeria monocytogenes* within an epidemic caused by butter in Finland. *Int. J. Food Microbiol.* **70**, 97–109 (2001)
- Melo J., Andrew P.W., Faleiro M.L.: *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. *Food Res. Int.* **64**, 75–90 (2015)
- Molenda J.: Listerioza – patogeniza, perspektywy bezpieczeństwa żywności. *Med. Weter.* **65**, 151–154 (2009)
- Molenda J.: Wybrane niekonwencjonalne metody utrwalania żywności. *Med. Weter.* **63**, 1016–1020 (2007)
- Montiel R., Martín-Cabrejas I., Langa S., Aouad N., Arques J.L., Reyes F., Medina M.: Antimicrobial activity of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* on *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon. *Food Microbiol.* **44**, 1–5 (2014)
- Muhterem-Uyar M., Wagner M. i wsp.: Environmental sampling for *Listeria monocytogenes* control in food processing facilities reveals three contamination scenarios. *Food Control*, **51**, 94–107 (2015)
- Nitschke M., Araújo L.V., Costa S.G.V.A.O., Pires R.C., Zeraik A.E., Fernandes A.C.L.B., Freire D.M.G., Contiero J.: Surfactin reduces the adhesion of food-borne pathogenic bacteria to solid surfaces. *Lett. Appl. Microbiol.* **49**, 241–247 (2009)
- Nowak A., Śliżewska K., Libudzisz Z., Socha J.: Probiotyki – efekty zdrowotne. *Zywn. Nauk. Technol. Ja.* **4**, 20–36 (2010)
- Palka R.: *Listeria monocytogenes* – badanie na liczbę czy obecność. *Gosp. Mięsna*, **8**, 50–54 (2014)
- Petróczy A., Taylor G., Nepusz T., Naughton D.P.: Gate keepers of EU food safety: Four states lead on notification patterns and effectiveness. *Food Chem. Toxicol.* **48**, 1957–1964 (2010)
- Pintado C.M.B.S., Oliveira A., Pampulha M.E., Ferreira M.A.S.S.: Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. *Food Microbiol.* **22**, 79–85 (2005)
- Sabaté D.C., Audisio M.C.: Inhibitory activity of surfactin, produced by different *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strains, against *Listeria monocytogenes* sensitive and bacteriocin-resistant strains. *Microbiol. Res.* **168**, 125–129 (2013)
- Saludes M., Troncoso M., Figueroa G.: Presence of *Listeria monocytogenes* in Chilean food matrices. *Food Control*, **50**, 331–335 (2015)
- Schvartzman M.S., Maffre A., Tenenhaus-Aziza F., Sanaa M., Butler F., Jordan K.: Modelling the fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of smeared cheese made with pasteurised or raw milk. *Int. J. Food Microbiol.* **145**, 531–538 (2011)
- Shen X., Sun X., Xie Q., Liu H., Zhao Y., Pan Y., Hwang C.A., Wu V.C.H.: Antimicrobial effect of blueberry (*Vaccinium*

- corymbosum* L.) extracts against the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis*. *Food Control*, **35**, 159–165 (2014)
38. Sila A., Hedhili K., Przybylski R., Ellouz-Chaabouni S., Dhulster P., Bougatef A., Nedjar-Arroume N.: Antibacterial activity of new peptides from barbel protein hydrolysates and mode of action via a membrane damage mechanism against *Listeria monocytogenes*. *J. Funct. Foods*, **11**, 322–329 (2014)
39. Sip A., Gardo A.: *Listeria monocytogenes* metody eliminowania z żywności – chemiczne, biologiczne i kombinowane. *Przem. Spoż.* **3**, 35–38 (2011)
40. Sip A., Więckowicz M., Olejnik-Schmidt A., Grajek W.: Anti-*Listeria* activity of lactic acid bacteria isolated from golka, a regional cheese produced in Poland. *Food Control*, **26**, 117–124 (2012)
41. Skandamis P.N., Yoon Y., Stopforth J.D.P., Kendall P.A., Sofos J.N.: Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. *Food Microbiol.* **25**, 294–303 (2008)
42. Swaminathan B., Gerner-Smidt P.: The epidemiology of human listeriosis. *Microbes. Infect.* **9**, 1236–1243 (2007)
43. Tajkarimi M.M., Ibrahim S.A., Cliver D.O.: Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, **21**, 1199–1218 (2010)
44. Tiwari U., Walsh D., Rivas L., Jordan K., Duffy G.: Modelling the interaction of storage temperature, pH, and water activity on the growth behaviour of *Listeria monocytogenes* in raw and pasteurised semi-soft rind washed milk cheese during storage following ripening. *Food Control*, **42**, 248–256 (2014)
45. Todd E.C.D., Notermans S.: Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, **22**, 1484–1490 (2011)
46. Valdramidis V.P., Patterson M.F., Linton M.: Modelling the recovery of *Listeria monocytogenes* in high pressure processed simulated cured meat. *Food Control*, **47**, 353–358 (2015)
47. Valero A., Hernandez M., De Cesare A., Manfreda G., González-García P., Rodríguez-Lázaro D.: Survival kinetics of *Listeria monocytogenes* on raw sheep milk cured cheese under different storage temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* **184**, 39–44 (2014)
48. Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K-H., Whitman W.B.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: V.3: The Firmicutes*, Springer Science & Business Media, 2011, s. 244.
49. Walczycka M.: Metody inaktywacji i hamowania wzrostu *Listeria monocytogenes* w przetworach mięsnych. *Zywn. Nauk. Technol. Ja.* **2**, 61–72 (2005)

Katarzyna Wolska^{1*}, Alina Górską¹, Alina Adamiak¹

¹ Katedra Dietetyki i Oceny Żywności, Instytut Nauki o Zdrowiu Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach

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

1. Wstęp. 2. Ogólna charakterystyka propolisu. 3. Aktywność przeciwbakteryjna propolisu. 4. Podsumowanie

Antibacterial properties of propolis

Abstract: Propolis is a natural product which honey bees (*Apis mellifera*) manufacture from balsamic resins, actively secreted by plants on leaf buds and barks. The chemical composition of propolis is highly variable. More than 300 compounds, such as polyphenols, phenolic aldehydes, sesquiterpene, quinines, coumarins, amino acids, steroids and inorganic compounds, have been identified in propolis samples. The content depends on the specific local flora at the site of collection, on the season of collection and also on the local climate. Propolis is a complex mixture of balsams, resins, waxes, essential oils, pollen and other substances which are used by bees in the construction, repair and protection of their hives, mainly thanks to its mechanical properties, antiseptic efficacy and antimicrobial activity. Because of the broad spectrum of biological activities, propolis is still used in traditional medicine. In this article, we review the current knowledge about propolis geographic diversity and its antimicrobial activity.

1. Introduction. 2. General characteristics of propolis. 3. The antimicrobial activity of propolis. 4. Conclusion

Słowa kluczowe: aktywność przeciwbakteryjna, propolis, substancje farmakologiczne
Keywords: antimicrobial activity, pharmacological substances, propolis

1. Wstęp

W związku ze wzrostem oporności bakterii na antybiotyki, rośnie zainteresowanie zastosowaniem propolisu, jako produktu pszczelego o najwyższej aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Naukowcom udało się dowiedzieć, że działanie antybiotyczne ekstraktów propolisu zapewniają liczne flawonoidy oraz kwasy fenolowe i ich estry. Ponieważ propolis zawiera kilkadziesiąt różnych substancji bakteriobójczych, wyklucza to możliwość nabycia przez drobnoustroje oporności w stosunku do całego spektrum tych substancji. Godne podkreślenia jest występowanie synergistycznego działania propolisu i wielu antybiotyków. Skuteczność działania takich leków, jak cefalosporyny, gentamycyna, oksytetracyklina, erytromycyna, wankomycyna i bacytracyna w obecności ekstraktu propolisu wzrasta od 10 nawet do 100 razy. Jest to doskonały sposób, aby zmniejszyć dawkowanie antybiotyku, a tym samym uniknąć skutków jego działania niepożądanego [4, 45, 56, 86, 88, 92].

2. Ogólna charakterystyka propolisu

Propolis jest wysoce złożonym, naturalnym kompleksem biologicznym, składającym się z mieszaniny wytworzonej przez pszczoły z roślinnych substancji żywicznych, wosku pszczelego, pyłku kwiatowego, pierzgi, wydzieliny gruczołowej pszczoł oraz domieszek mechanicznych. W zbiorze propolisu bierze udział wyspecjalizowana niewielka grupa (od 10 do 30)

pszczół zdrowych i silnych, doświadczonych w pracach polowych, zwykle w wieku powyżej 15 dni. Najlepiej propolis zbiera rozpowszechniona w Europie Wschodniej pszczoła kaukaska *Apis mellifera caucasica*. Pszczoły zbierają balsamiczne substancje z pączków niektórych drzew, np. topoli, brzozy, wierzby, olchy i kasztanowca oraz żywic występujących na uszkodzonych częściach tych drzew. Zbierają je przede wszystkim od początku lata do jesieni, w najcieplejszych godzinach dnia, między 10.00 a 16.00 przy sprzyjających temperaturach (powyżej 20°C), kiedy substancje żywiczne są dostatecznie miękkie [3, 21, 24, 51].

2.1. Wykorzystanie propolisu przez pszczoły

Gromadzenie się olbrzymiej liczby owadów społecznych na bardzo ograniczonej powierzchni, stwarza podwyższone ryzyko pojawienia się chorób zakaźnych, zwłaszcza nosemozy i zgnilca amerykańskiego. Głównym czynnikiem, który gwarantuje obronę przed zachorowalnością pszczoł jest magazynowanie w ulu propolisu. Słowo „propolis” jest pochodzenia greckiego i oznacza dosłownie „przedmurze miasta”. Pszczoły budują barierę propolisową tuż za otworem wejściowym, czyli „przedmurze przed swoim domem”. Jest ono tak zbudowane, że wszyscy mieszkańcy muszą przez nie przejść wchodząc do ula lub z niego wychodząc. W ten sposób jakby przechodzą przez barierę dezynfekcyjną czy matę odkażającą, by nie wnieść do „domu” bakterii, pleśni i innych zarazków. Pszczoły pokrywają warstwą

* Autor korespondencyjny: Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny, Instytut Nauk o Zdrowiu, 08-110 Siedlce, ul. Prusa 14; tel. 25 643 12 86; e-mail: kwolska@uph.edu.pl

propolisu komórki plastra przed złożeniem do nich przez matkę jaj lub pokrywają jego warstwą uśmierconych jadłem szkodników, których nie są w stanie usunąć z ula, a których produkty rozkładu stanowiłyby zagrożenie dla całego roju [3, 24, 51].

Propolis stanowi dla pszczół materiał budulcowy i izolacyjny. Jest wykorzystany do powlekania wewnętrznych ścian ula i wszystkich jego części cienką warstwą o grubości od 0,3 do 0,5 mm, a także do przymocowania luźnych części. Pszczoły za pomocą propolisu uszczelniają gniazdo, zasklepiają wszelkie otwory o szerokości mniejszej niż 4,5 mm oraz zmniejszają wielkość otworu wylotowego w okresach chłódów, mając na celu ochronę gniazda przed zimnem, wiatrem i przeciągiem [24, 51].

2.2. Właściwości fizyczne propolisu

Właściwości fizyczne propolisu zależą od regionu pochodzenia i rodzaju roślin. Jest on produktem bezpostaciowym, o ostrym, cierpkim, piekącym i gorzkawym smaku. Świeży propolis jest silnie aromatyczny. Zapach jest słodkawy, przypominający nieco korzenny, cynamonowy, zapach pączków topoli, kadzidła bądź bukietu kwiatowego. W bardzo starych próbkach lub zanieczyszczonych dużą zawartością wosku zapach jest słabo wyczuwalny, przypomina bardziej zapach wosku i miodu. Propolis ma różne barwy, od żółtej poprzez żółto-zieloną, zielonkawą, pomarańczową, czerwoną, ciemnobrązową do prawie czarnej. Barwa propolisu zależy od gatunku rośliny, z której jest zbierany (np. topola-brązowy, olsza-żółty, brzoza-czarny, kasztanowiec-czerwony) oraz od ilości domieszanego przez pszczoły wosku. Zwykle propolis jest koloru żółtego i brązowego. Podczas przechowywania próbki propolisu ciemnieją. Propolis dobrze rozpuszcza się w alkoholu etylowym, acetonie, eterze etylowym i chloroformie. W ostatnich latach opracowano technologię przetwarzania propolisu na rozpuszczalny w wodzie proszek propolisowy. Konsystencja propolisu zależy głównie od temperatury. Jest on dużo twardszy i odporniejszy na temperaturę niż wosk. W temperaturze 15°C propolis jest twardy i kruchy, w 34,5–36°C (temperatura gniazda) staje się miękki i plastyczny, a w temperaturze ponad 45°C – lepki i kleisty. Jest płynny w temperaturze 70–80°C, chociaż dla niektórych próbek propolisu punkt topnienia wynosi powyżej 100°C. Gęstość propolisu mieści się w przedziale od 1,20 do 1,27 g/cm³, jest więc cięższy od wosku pszczelego (0,96 g/cm³) [24, 51].

2.3. Skład chemiczny propolisu

Skład chemiczny propolisu jest zróżnicowany i uzależniony od roślinności obszaru geograficznego, z którego pochodzi, od pory roku i rasy pszczół. Ogól-

nie w skład propolisu wchodzi: żywice (50%), olejki eteryczne (10%), woski (30%), pyłki kwiatowe (5%) i domieszki mechaniczne (5%). Dotychczas wyodrębniono ponad 300 substancji wchodzących w jego skład. Znalezione w składzie propolisu substancje należą do tzw. substancji grupy GRAS (generally recognized as safe), ogólnie uznanych za bezpieczne. Polski propolis pochodzi przede wszystkim z pączków liściowych topoli czarnej (*Populus nigra*). Znajduje się w nim ok. 65% substancji biologicznie czynnych. Substancje uznane za lecznicze to głównie flawonoidy, których zawartość w propolisie wynosi od 3,0 do 8,5% i różne substancje fenolowe oraz aromatyczne (około 77%). Wśród kwasów aromatycznych należy wymienić: cynamonowy, kawowy, ferulowy, benzoesowy, salicylowy, *p*-kumaryny. Do najważniejszych estrów aromatycznych zalicza się estry etylowe i fenyloetylowe kwasu cynamonowego i kawowego. Najczęściej wykrywa się w propolisie następujące flawonoidy: chryzynę, tektochryzynę, pinostrobinę, pinocembrynę, galanginę i chalkon pinostrobinowy, rzadziej kemferol, kwercetynę, apigeninę, genkwaninę czy pinobanksynę. Z pozostałych związków występujących w polskim propolisie warto wymienić: związki lotne (geraniol, nerol, farnesol, β -eudesmol, kariofilen, patchulen, skwalen) i inne związki aromatyczne (kumaran, wanilinę) oraz węglowodory (eikosan, trikosan, pentakosan, heksadekanol), alkohole triterpenowe (cholinasterol, fukosterol, stigmasterol), enzymy (amylazy, esterazy), biopierwiastki, m.in.: wapń, magnez, mangan, cynk, cyna, miedź, krzem, żelazo, glin, srebro, sód, potas, chrom, stront i witaminy: B1, B2, B5, B6, C, D, E, prowitaminę A [3, 5, 21, 24, 25].

Propolis wykazuje różnorodne aktywności farmakologiczne. Jest najaktywniejszy biologicznie wśród produktów pszczelich. Najważniejsze i najbardziej znane właściwości propolisu to działanie przeciwdrobnoustrojowe oraz przeciwzapalne, antyoksydacyjne, przeciwnowotworowe i immunostymulacyjne [51].

3. Aktywność przeciwbakteryjna propolisu

Propolis wykazuje szerokie spektrum aktywności, zarówno przeciwko bakteriom tlenowym i beztlenowym, Gram-dodatnim, jak również, chociaż w mniejszym stopniu Gram-ujemnym (Tabela I). Jest to spowodowane m.in. złożoną budową ściany komórkowej u tej grupy bakterii, niską przepuszczalnością błony zewnętrznej oraz występowaniem systemu efflux, białek membranowych odpowiadających za aktywny transport z komórki leków i innych substancji chemicznych, w tym składników propolisu. Warto podkreślić, że wchodzące w skład propolisu żywice i zawarte w nich substancje są wydzielane przez rośliny do ich ochrony przed patogenami, głównie bakteriami Gram-dodatnimi [44, 49].

Tabela I
Wpływ ekstraktu etanolowego z propolisu na bakterie

Bakterie Gram-dodatnie tlenowe	MIC mg/ml	Bakterie Gram-ujemne tlenowe	MIC mg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus</i> spp. (<i>S. epidermidis</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. warnerii</i> , <i>S. auricularis</i> , <i>S. capitis</i>)	0,05–1	<i>Escherichia coli</i>	≥ 2,56
		<i>Salmonella</i> spp. (<i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Typhi</i> , <i>S. Typhimurium</i>)	≥ 2,56
<i>Streptococcus</i> spp. (<i>S. pyogenes</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. sorbinus</i> , <i>S. viridans</i>)	0,05–1	<i>Proteus vulgaris</i> , <i>P. mirabilis</i>	≥ 2,56
<i>Enterococcus</i> spp. (<i>E. faecalis</i>)	0,5–5	<i>Shigella dysenteriae</i> , <i>S. sonnei</i>	≥ 2,56
<i>Micrococcus luteus</i>	0,05–1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	≥ 5,12
<i>Bacillus cereus</i> , <i>B. subtilis</i>	0,125–0,5	<i>Enterobacter aerogenes</i>	≥ 5,12
<i>Mycobacterium</i> spp.	≥ 1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	≥ 2,56
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	≥ 2–5	<i>Aeromonas hydrophila</i>	≥ 2,56
<i>Corynebacterium</i> spp.	0,05–1	<i>Helicobacter pylori</i>	≥ 5,12
		<i>Campylobacter jejuni</i>	≥ 5
		<i>Hemophilus influenzae</i>	≥ 5
<i>Listeria monocytogenes</i>	≥ 2,56	<i>Brucella abortus</i> , <i>B. melitensis</i>	≥ 5,12
Bakterie Gram-dodatnie beztlenowe	MIC mg/ml	Bakterie Gram-ujemne beztlenowe	MIC mg/ml
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	0,01–0,5	<i>Actinobacillus oralis</i> , <i>A. gingivalis</i>	0,06
<i>Peptococcus</i> spp.	1–3	<i>Porphyromonas anaerobius</i> , <i>P. melaninogenica</i>	0,05
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0,5–1	<i>Bacteroides</i>	0,01–0,5
<i>Eubacterium</i> spp.	0,5–1	<i>Prevotella intermedia</i>	0,05
<i>Propionibacterium</i> spp.	0,5–1	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	0,01–0,06
<i>Arachnia</i> spp.	0,5–1	<i>Veillonella parvula</i>	1–3
<i>Actinomyces</i> spp.	1–3	<i>Leptotricha</i>	1–3
<i>Clostridium</i> spp.	1–3		

MIC – minimalne stężenie propolisu hamujące wzrost bakterii, na podstawie: [17, 16, 19, 20, 35, 39, 40]

Występuje korelacja między aktywnością przeciwbakteryjną propolisu a jego składem chemicznym, który jest zależny od pochodzenia. Fakt ten przyczynił się do wydzielenia określonych typów chemicznych propolisu [30]. Pomimo zróżnicowanego składu chemicznego, wszystkie zbadane dotąd typy propolisu wykazują podobnie wysoką aktywność przeciwbakteryjną [4, 5, 44]. W propolisie europejskim, północno-amerykańskim i azjatyckim klimatu umiarkowanego, którego głównym źródłem roślinnym jest topola, zwłaszcza topola czarna (*Populus nigra*), podstawowymi związkami bakteriobójczymi są flawony, flawanony, kwasy fenolowe i ich estry. Flawony i flawonole (inne niż w propolisie topolowym) występują w brzozie brodawkowatej (*Betula verrucosa*), z której otrzymuje się propolis rosyjski. Natomiast w Ameryce Pd., głównie w Brazylii, popularny jest propolis zielony, który jest zbierany przez pszczoły miodne z *Baccharis dracunculifolia*, rośliny typowej dla regionu tropikalnego. W propolisie *Baccharis*, flawonoidy są obecne w małych ilościach, natomiast przeważają prenylowe pochodne kwasu kawowego i *p*-kumarowego oraz pochodne kwasu cynamonowego, zwłaszcza artepilina C i bakcharyna, a także kwasy diterpenowe. Inny typ pro-

polisu, o którym należy wspomnieć, to propolis czerwony występujący w Brazylii i na Kubie, a pochodzący z rośliny *Dalbergia ecastophyllum* [21, 24, 33, 37, 42]. Ważne związki bioaktywne propolisu europejskiego oraz brazylijskiego zielonego i czerwonego zostały wymienione w tabeli II.

Ze względu na złożony skład propolisu, nie może on być stosowany bezpośrednio w stanie surowym. Dlatego istotny wpływ na aktywność propolisu mają rozpuszczalniki stosowane do jego ekstrakcji. Wiele z substancji bakteriobójczych rozpuszcza się w alkoholu lub/i wodzie, a niektóre w innych rozpuszczalnikach (Tabela III). Efekt przeciwbakteryjny propolisu zależy ponadto od stężenia i jest do niego wprost proporcjonalny. Duży wpływ na wrażliwość na propolis ma również pochodzenie szczepów bakteryjnych (ludzkie, zwierzęce), ich zjadliwość, oporność na antybiotyki oraz metodyka przeprowadzonych badań (działanie bakteriostatyczne lub bakteriobójcze, wielkość inokulum, użyte podłoże bakteriologiczne, warunki inkubacji) [2, 31].

Właściwości przeciwbakteryjne propolisu zostały potwierdzone w licznych badaniach. Zdaniem Stojko i wsp. [45] wysoce aktywny propolis to ten, który w stężeniu 0,15–0,6 mg/ml hamuje wzrost szczepu

Tabela II
Główne składniki europejskiego propolisu topolowego [3], brazylijskiego propolisu zielonego [31] i czerwonego [42]

Związki chemiczne	Zawartość (mg/g)	Związki chemiczne	Zawartość (mg/g)	Związki chemiczne	Zawartość (mg/g)
Propolis topolowy		Propolis zielony		Propolis czerwony	
Chryzyna	8,4	Artepilina C	82,96	Formononetyna	10,2
Octan 3-pinobanksyny	8,0	Octan 3-pinobanksyny	13,92	Izolikwirytygenina	4,8
Galangina	7,8	Kemferyd	11,6	Pinocembryna	3,3
Pinocembryna	7,2	Galangina	9,75	Likwirytygenina	1,8
Pinobanksyna	3,7	Sakuranetyna	5,57	Octan 3-pinobanksyny	1,7
Estry pentenyłowe kwasu kawowego	3,3	Kwas kumarowy	3,56	Pinobanksyna	1,7
Estry benzylowe kwasu kawowego	3,0	Chryzyna	3,51	Luteolina	1,2
Estry fenyletyłowe kwasu kawowego	2,8	Kemferol	1,77	Rutyna	0,7
Glicerydy fenolowe	1,1	Kwas cynamonowy	1,66	Kwercetyna	0,5
		Kwercetyna	1,38	Daidzeina	0,3
		Izoramnetyna	0,91		

Tabela III
Substancje zawarte w ekstraktach propolisowych w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika [11]

Woda	Metanol	Etanol	Chloroform	Eter	Dichlorometan	Aceton
Antocyjany	Antocyjany	Taniny	Terpeny	Terpeny	Terpeny	Flawonole
Skrobia	Terpeny	Polifenole	Flawonoidy	Taniny	Kumaryny	
Taniny	Saponiny	Poliacytleny		Polifenole	Alkaloidy	
Saponiny	Garbniki	Flawonole		Poliacytleny	Kwasy tłuszczowe	
Terpeny	Xanthoxylina	Terpeny		Flawonole		
Poliptydy	Quassinoidy	Sterole		Sterole		
Lektyny	Totarol	Alkaloidy		Alkaloidy		
	Laktony					
	Flawony					
	Fenony					
	Polifenole					
	Poliptydy					
	Lektyny					

wzorcowego *S. aureus* P 209 (Oxford). Zbadano aktywność etanolowych ekstraktów z propolisu (EEP, ethanolic extract of propolis) zbieranego z 18 regionów w Rosji wobec *Staphylococcus aureus* i *Bacillus cereus* jako przedstawicieli bakterii Gram-dodatnich oraz *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* – bakterii Gram-ujemnych. W badaniach zastosowano test rozcieńczeń i określono najmniejsze stężenie propolisu całkowicie hamujące wzrost, co odpowiada MIC (minimal inhibitory concentration) tego propolisu wobec badanej bakterii. Stwierdzono, że próbki propolisu o stężeniu 0,125–0,5 mg/ml hamowały wzrost *S. aureus* i *B. cereus*, natomiast nie miały wpływu na wzrost *E. coli* i *P. aeruginosa* nawet w stężeniu wyższym niż 1,0 mg/ml [40]. Badania Kędzi [18] dały podobne efekty. Na EEP były wrażliwe głównie bakterie Gram-dodatnie z rodzaju *Staphylococcus*, *Streptococcus* i *Corynebacterium* (MIC=0,05–1,0 mg/ml).

Mniejszą podatność na propolis wykazywały paciorkowce kałowe z rodzaju *Enterococcus* (0,5–5,0 mg/ml), natomiast niską jelitowe pałeczki Gram-ujemne fermentujące z rodzaju *Escherichia*, *Klebsiella* i *Proteus* oraz pałeczki niefermentujące z rodzaju *Pseudomonas* (MIC=0,5–10,0 mg/ml). W badaniach użyto szczepów wyizolowanych z materiału szpitalnego.

Inne doświadczenia potwierdzają aktywność propolisu w stężeniu 0,5–1,0 mg/ml przeciwko 106 szczepom *S. aureus*. Ponadto, propolis wykazał synergistyczne działanie z następującymi antybiotykami: benzopenicylinami, tetracyklinami i erytromycyną oraz był aktywny wobec szczepów opornych na te leki [41]. Z badań przeprowadzonych w Turcji wynika, że spośród bakterii Gram-dodatnich najbardziej wrażliwy na 45 różnych próbek propolisu okazał się wywołujący próchnicę zębów *Streptococcus mutans*, a z bakterii Gram-ujem-

ných – pałeczka czerwonej *Shigella sonnei*. Zastosowane ekstrakty propolisu w DMSO (dimethylsulfoxide) wykazywały większą aktywność w porównaniu z ekstraktami acetonowymi, z wyjątkiem wpływu na *Brucella melitensis*, bezwzględnie pasożyta wewnątrzkomórkowego zwierząt i ludzi. Propolis turecki posiadał taką samą, a nawet większą aktywność niż antybiotyki podawane w zakażeniach szczepami *S. mutans*, *Salmonella* Typhi, *S. sonnei* i *P. aeruginosa* [50].

Kolejne prace także potwierdzają różnice we wrażliwości na propolis chorobotwórczych bakterii tlenowych Gram-dodatnich i Gram-ujemnych [12, 16, 23, 26]. W badaniach Grange i Daweya [23], zastosowany EEP całkowicie hamował wzrost *S. aureus*, *Enterococcus* spp. i *B. cereus*, a częściowo *E. coli* i *P. aeruginosa*. Nie wykazywał natomiast działania inhibicyjnego wobec *Klebsiella pneumoniae*. Badania przeprowadzone w Iraku wykazały także wyższą aktywność propolisu wobec bakterii Gram-dodatnich oraz przewagę w działaniu bakteriobójczym EEP nad wodnym ekstraktem z propolisu (EAP, aqua extract of propolis). Minimalne stężenie EEP hamujące wzrost *S. aureus* i *Streptococcus pyogenes* wyniosło $\geq 1,28$ mg/ml, zaś dla *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *S. Typhi* i *P. aeruginosa* było to $\geq 2,56$ mg/ml. Największe wartości MIC zanotowano dla *Enterobacter aerogenes*, *K. pneumoniae* i *Helicobacter pylori* – $\geq 5,12$ mg/ml. Natomiast MIC EAP dla szczepów *S. aureus*, *S. pyogenes* i *E. coli* wyniósł $\geq 2,56$ mg/ml, a dla pozostałych badanych gatunków bakterii był $\geq 5,12$ mg/ml [16]. Z badań Łazebnika i wsp. [26] wynika z kolei, że wodny ekstrakt z propolisu o stężeniu 1,2 mg/ml hamował wzrost dwóch szczepów wzorcowych *H. pylori* i jednego szczepu wyizolowanego z materiału klinicznego.

Wysokie stężenia EEP były konieczne do zahamowania wzrostu ludzkich patogenów opornych na antybiotyki. Wartości MIC propolisu libańskiego były następujące: 6,25 mg/ml dla szczepu *S. aureus* metycylinoopornego (MRSA) i 12,5 mg/ml dla szczepu *K. pneumoniae* ESBL-dodatniego [8]. Duże zróżnicowanie we wrażliwości na propolis wykazują prątki kwasoodporne z rodzaju *Mycobacterium*. Scheller i wsp. [39] stwierdzili u 6 (37,5%) z 13 klinicznych szczepów *Mycobacterium* spp., zahamowanie wzrostu w obecności propolisu o stężeniu 1,8 mg/ml. Do zahamowania rozwoju pozostałych 7 szczepów wymagane były stężenia EEP wielokrotnie wyższe (MIC > 10 mg/ml). Rojas-Hernandez i wsp. [35] dowodzą, że wszystkie szczepy szpitalne *Mycobacterium* spp. (n = 30) były hamowane przez EEP już w stężeniu 1,0 mg/ml. Znacznie mniej wrażliwe były szczepy prątka gruźlicy (*M. tuberculosis*), zastosowany EEP w stężeniach 2,0–5,0 mg/ml zahamował wzrost tylko 30% z nich.

EEP jest skuteczny wobec bakterii beztlenowych. Największą aktywność wykazywał wobec bakterii

z rodzaju *Bacteroides* i *Peptostreptococcus* (MIC = 0,01–0,5 mg/ml), nieznacznie mniejszą w stosunku do *Propionibacterium*, *Arachnia* i *Eubacterium* (MIC = 0,5–1,0 mg/ml), natomiast najmniej efektywny był wobec sporującej laseczki *Clostridium* (MIC = 1,0–3,0 mg/ml) [19]. W innych badaniach [20], EEP o stężeniach 0,01–3 mg/ml był aktywny wobec 690 szczepów bakterii beztlenowych wyizolowanych ze zmian zapalnych w obrębie jamy ustnej i jamy brzusznej. Z tymże bakterie z rodzaju *Bacteroides*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Actinomyces*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Leptotricha*, *Veilonella* były mniej podatne na EEP (najwięcej szczepów wrażliwych tylko na wyższe stężenia EEP: 1,0–3,0 mg/ml) niż bakterie z rodzaju *Fusobacterium* (najwięcej szczepów wrażliwych na niskie stężenia EEP: 0,01–0,06 mg/ml).

Do oceny wrażliwości danej bakterii na propolis, badacze stosują często dwie metody: krążkową i studzienkową. W pierwszej mierzy się wielkość strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół krążka nasączonego określoną ilością propolisu, a w drugiej metodzie stosuje się rezerwuariki wypełnione propolisem. Według obowiązującej zasady, ekstrakt propolisowy wykazuje pozytywny efekt działania na bakterie, gdy strefa wokół krążka jest większa od 6 mm. Hendi i wsp. [16] zastosowali obie te metody i stwierdzili, że szczepy *S. aureus* charakteryzowały się większą wrażliwością niż inne badane bakterie Gram-dodatnie, a przede wszystkim bakterie Gram-ujemne, z wyjątkiem szczepu wzorcowego *E. coli*. W metodzie studzienkowej przy zastosowaniu 10% EEP otrzymano następujące wyniki: *S. aureus* – 25 mm, *S. pyogenes* – 14 mm, *L. monocytogenes* – 18 mm, *E. coli* – 15 mm, *S. Typhi* – 12 mm, *E. aerogenes* – 10 mm, *K. pneumoniae* – 12 mm, *P. aeruginosa* – 10 mm i *H. pylori* – 10 mm. Wielkość strefy zahamowania wzrostu bakterii wzrastała proporcjonalnie do zastosowanego wyższego stężenia EEP, 20 i 30%. W metodzie krążkowej średnica strefy zahamowania wzrostu była mniejsza dla większości badanych gatunków bakterii i wyniosła od 10 do 13 mm dla bakterii Gram-dodatnich oraz od 7 do 12 mm dla bakterii Gram-ujemnych. Doświadczenia przeprowadzone z EAP dowiodły, że ma on dużo niższą aktywność przeciwbakteryjną niż EEP. Tylko trzy gatunki bakterii wykazywały wrażliwość (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*), a wielkość strefy zahamowania wzrostu tych bakterii wokół studzienek wypełnionych 10% EAP była kolejno następująca: 11, 13 i 11 mm. W metodzie krążkowej, 10% EAP wykazywał właściwości przeciwbakteryjne wyłącznie wobec szczepów *S. aureus* (9 mm) i *E. coli* (7 mm) [35]. W badaniach przeprowadzonych przez El-Shouny i wsp. [11] stwierdzono, że wzrost dwóch dominujących patogenów, paciorkowca ropotwórczego (*S. pyogenes*) i pałeczki *Hemophilus influenzae* izolowanych z wymazu z gardła od dzieci chorych

na zakażenie górnych dróg oddechowych, w obecności 20% EEP uległ zahamowaniu. Średnia wartość strefy wokół krążków była dla wymienionych szczepów kolejno następująca: 24 mm i 17 mm.

Zbadano aktywność 30% EEP z Bułgarii wobec 38 szczepów klinicznych *H. pylori* izolowanych od chorych z wrzodami żołądka i dwunastnicy. Średnia wielkość strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół studzienki przy zastosowaniu kolejno 30, 60 i 90 μ l 30% EEP oraz 30 μ l etanolu jako kontroli wyniosła odpowiednio: 17,8; 21,2; 28,2 i 8,5 mm. EEP okazał się znacznie bardziej aktywny niż etanol w zahamowaniu wzrostu szczepów *H. pylori* ($p < 0,001$). Wyniki otrzymane metodą krążkową były zbliżone, choć wartości nieco niższe [7]. Metodę krążkową do zbadania wpływu 10% EEP na 26 szczepów *H. pylori* i 18 szczepów *Campylobacter jejuni*, Gram-ujemną bakterię, która u człowieka wywołuje zapalenie jelit, zastosowali Kimoto i wsp. [22]. Uzyskana średnia wielkość strefy zahamowania wzrostu dla szczepów *H. pylori* wyniosła 12,4 mm, a dla *C. jejuni* – 11,6 mm. Z kolei Dobrowolski i wsp. [9] stwierdzili, że średnice stref zahamowania wzrostu bakterii z rodzaju *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Diplococcus* i *Corynebacterium* wokół krążków bibułowatych zawierających 10% EEP są większe (12–17 mm) w porównaniu do stref zahamowania wzrostu bakterii z rodzaju *Escherichia*, *Salmonella* i *Shigella* (11–13 mm). Także inni autorzy stosując te same techniki badawcze wykazali nieco większą wrażliwość na EEP bakterii Gram-dodatnich niż Gram-ujemnych [3, 10, 24].

3.1. Mechanizm działania propolisu

Mechanizm działania bakteriobójczego propolisu jest złożony i nie da się go odnieść do działania jakiegokolwiek antybiotyku. Jest to bowiem suma działań wszystkich zawartych w propolisie substancji bioaktywnych, zwłaszcza związków fenolowych i flawonoidów. Odpowiadają one m.in. za uszkodzenie struktury i funkcji ściany komórkowej oraz błony cytoplazmatycznej. Inaktywują białka enzymatyczne zlokalizowane w błonie cytoplazmatycznej oraz zaburzają transport substancji pokarmowych przez błonę, a także syntezę składników komórkowych. Substancje te mają także wpływ na permeabilizację błony komórkowej, w wyniku czego dochodzi do nadmiernej utraty jonów wodorowych i potasowych, a w rezultacie obniża się potencjał błonowy. Następstwem tego jest zaburzenie funkcjonowania pompy protonowej oraz związanego z tym zmniejszenia energii w postaci ATP, która jest niezbędna dla ruchu rzęsek, w ten sposób bakterie urzęsione wykazują zmniejszony ruch lub jego brak. Propolis również hamuje syntezę białka i atakuje materiał genetyczny, powodując dezintegrację i fragmentację DNA. Wszystkie zaburzenia prowadzą do lizy i śmierci komórki bakteryjnej [29, 47].

Omówione działania propolisu zależą od szczepu bakteryjnego, stężenia związków bioaktywnych zawartych w propolisie i czasu ekspozycji. Dla przykładu, związki fenolowe w niskich stężeniach wpływają ujemnie na bilans bioenergetyczny błony cytoplazmatycznej, co skutkuje uszkodzeniem ruchu bakterii *Bacillus subtilis*. Natomiast wysokie dawki związków fenolowych powodują denaturację białek bakteryjnych, m.in. enzymów biorących udział w metabolizmie komórkowym [29]. Kwasy kawowy, benzoesowy i cynamonowy najprawdopodobniej powodują uszkodzenia strukturalne i funkcjonalne ściany komórkowej i błony cytoplazmatycznej. Flawonoidy zaburzają metabolizm komórkowy poprzez ujemny wpływ na reakcje fosfo- i defosforylacji [28, 29, 47]. Przy pomocy mikroskopii elektronowej stwierdzono, że EEP i zawarte w nim substancje przeciwbakteryjne (flawonoidy i ester fenyloetylowy kwasu kawowego – CAPE, caffeic acid phenethyl ester) hamowały podziały komórkowe bakterii z rodzaju *Streptococcus agalactiae*, konsekwencją tego było tworzenie struktur pseudo-wielokomórkowych. Metoda kolorymetryczna zaś wykazała zmniejszony poziom białka w komórce bakteryjnej [47]. Liczne składniki propolisu działają na czynniki wirulencji bakterii Gram-dodatnich, m.in. całkowicie hamują aktywność koagulazy gronkowcowej i zmniejszają aktywność lipazy oraz zabezpieczają przed produkcją biofilmu bakteryjnego [38].

3.2. Wpływ składników propolisu na bakterie

Próbki propolisu w zależności od pochodzenia różnią się zawartością flawonoidów. Analizowano 38 próbek propolisu pobranych z różnych regionów Chorwacji i dowiedziono, że te, które zawierały największą ilość flawonu – pinocembryny wykazywały wysoki stopień zahamowania wzrostu *B. subtilis* [32]. Nie tylko stężenie flawonoidów miało wpływ na zahamowanie pięciu szczepów z rodzaju *Mycobacterium*, ale także ich właściwości biologiczne. Szczep *Mycobacterium* spp. 279 okazał się najbardziej wrażliwy, a minimalne stężenie flawonoidów, które spowodowało zahamowanie jego wzrostu wyniosło 9,96 μ g/ml [17]. Koru i wsp. [23] wymieniają także flawonoidy, a wśród nich pinobanksynę, kwercetynę, naryngeninę, galanginę i chryzynę oraz kwasy aromatyczne, m.in. kwas kawowy, jako składniki EEP z Turcji, które działały bakteriobójczo na patogeny jamy ustnej. Wartości MBC (minimal bactericidal concentration) propolisu dla badanych bakterii mieściły się w zakresie od 8 do 512 mg/ml. Śmierć bakterii beztlenowych Gram-dodatnich (*Peptostreptococcus anaerobius*, *P. micros*, *L. acidophilus*, *Actinomyces naeslundii*) obserwowano już po 4 h inkubacji bakterii w obecności EEP, natomiast dla bakterii beztlenowych Gram-ujemnych czas ten był dłuższy i wyniósł 8 h dla *Prevotella oralis*, *P. melaninogenica* i *Porphyromonas gingivalis*; 12 h dla *Fusobacterium nucleatum*, a 16 h

dla *Veilonella parvula*. Propolis wykazuje działanie bakteriobójcze w szerokim zakresie stężeń ($9 \pm 0,3$ do $85 \pm 2,1$ mg/ml) wobec szczepów *Lactobacillus fermentum*, wyizolowanych od pacjentów z próchnicą zębów. Przeprowadzona analiza chromatograficzna pozwoliła na identyfikację związków polifenolowych o właściwościach przeciwbakteryjnych: kwasu kawowego, CAPE oraz flawonoidów (myricetyny, kwercetyny, kemferolu, apigeniny, pinocembryny i galanginy) [36].

Próbki propolisu pochodzące z różnych regionów geograficznych Turcji w wysokich stężeniach (rozcieńczenie 1:10) wykazywały silny efekt bakteriobójczy wobec patogenów przenoszonych drogą pokarmową: *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076 i *Listeria monocytogenes* ATCC 1462. Głównymi składnikami poszczególnych 25 próbek EEP były: flawonoidy, estry kwasów aromatycznych, alkohole aromatyczne, kwasy aromatyczne, alifatyczne kwasy karboksylowe, terpeny, estry alifatycznych kwasów karboksylowych [44]. Badania dotyczące związku między aktywnością EEP wobec *B. cereus* a zawartością w poszczególnych próbkach propolisu polifenoli, wykazały, że aż w 91% przypadków wysoka zawartość tych związków ($\geq 59\%$) miała wpływ na właściwości przeciwbakteryjne [27]. W innych badaniach stwierdzono, że duże stężenie CAPE, ferulanu benzylu i galanginy występujących w propolisie niemieckim odpowiadały za aktywność przeciwko *S. aureus* i *E. coli* [15]. Podobnie wysoka zawartość związków fenolowych w propolisie portugalskim miała wpływ na zahamowanie wzrostu szczepów izolowanych z materiału klinicznego, takich jak: *S. aureus* (MIC = 15 µg/ml), *S. mutans* (MIC = 28 µg/ml), *Actinomyces israelii* (MIC = 1,75 µg/ml) i *E. faecalis* (MIC = 7 µg/ml) [14]. Niektóre diterpeny oraz związki fenolowe obecne w propolisie bułgarskim posiadały aktywność wobec *H. pylori* [7].

Ważnym związkiem przeciwbakteryjnym zidentyfikowanym w propolisie zielonym jest artepilina C, pochodna 3,5-diprenylo-4-hydroksylowa kwasu cynamonowego. Wysoką aktywność tego związku stwierdzono w stosunku do *B. cereus*, *E. aerogenes* i *Arthroderna benhamiae*. Wskazuje się również na flawonoidy: galanginę, sakuranetynę, kemferol, pinocembrynę i pinobanksynę, jako związki o silnym działaniu przeciwbakteryjnym [1]. Hashimoto i wsp. [13] w 1998 r. zaobserwowali, że najsilniejszym działaniem na *H. pylori* odznaczał się kwas *p*-kumarowy, składnik chloroformowego ekstraktu z propolisu *Baccharis*, który hamował wzrost dwóch szczepów wzorcowych w stężeniu 15 µg/ml. Trzy lata później inni naukowcy, Banskota i wsp. [6] z metanolowego ekstraktu wydzielili 8 związków zdolnych do zahamowania wzrostu trzech wzorcowych szczepów *H. pylori* w stężeniach 130–1000 µg/ml. Najsilniejszym działaniem inhibycyjnym odznaczał się ester metylowy kwasu agatowego. Oprócz kwasów fenolowych i flawonoidów również di-

i triterpeny izolowane z propolisu brazylijskiego, ale także i kreteńskiego wykazują aktywność wobec szerokiego spektrum drobnoustrojów chorobotwórczych [34].

Należy jednak podkreślić, że działanie natywnego ekstraktu z propolisu jest zdecydowanie silniejsze niż poszczególnych jego frakcji.

4. Podsumowanie

Propolis jest skuteczny w stosunku do bakterii chorobotwórczych Gram-dodatnich, tlenowych i bez-tlenowych. Wiele bakterii Gram-ujemnych jest także wrażliwych na ten produkt. Jego właściwości przeciwbakteryjne są wypadkową działania flawonoidów, kwasów aromatycznych i ich estrów oraz seskwiterpenów.

Podsumowując, propolis wykazuje potencjalne możliwości wykorzystania w terapii przeciwbakteryjnej, jako alternatywy dla dziś stosowanych farmaceutyków.

Piśmiennictwo

1. Aga H., Shibuya T., Sugimoto T., Kurimoto M., Nakajima S.: Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 945–946 (1984)
2. Awale S., Shrestha S.P., Tezuka Y., Ueda J.Y., Matsushige K., Kadota S.: Neoflavonoids and related constituents from Nepalese propolis and their nitric oxide production inhibitory activity. *J. Nat. Prod.* **68**, 858–864 (2005)
3. Bankova V.S., Castro D.S.L., Marcucci M.C.: Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, **31**, 3–15 (2000)
4. Bankova V.S.: Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-based Complementary Altern. Med.* **2**, 29–32 (2005)
5. Bankova V.S., Popova M., Trusheva B.: Plant origin of propolis: Latest developments and importance for research and medicinal use (w) Apicultura – De la stiinta la agribusiness si apiterapie, red. L.A. Marghitas, D. Dezmiorean, Editura Academic Pres, Cluj Napoca, 2007, s. 40–46
6. Banskota A.H., Tezuka Y.Y., Kadota S.: Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytoter. Res.* **15**, 561–571 (2001)
7. Boyanova L., Derejian S., Koumanova R., Katsarov N., Gergova G., Mitov I., Nikolov R., Krastev Z.: Inhibition of *Helicobacter pylori* growth in vitro by Bulgarian propolis: preliminary report. *J. Med. Microbiol.* **52**, 417–419 (2003)
8. Chamandi G., Olama Z., Holail H.: Antimicrobial effect of propolis from different geographic origins in Lebanon. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* **4**, 328–342 (2015)
9. Dobrowolski J.W., Vohora S.B., Sharma K., Shah S.A., Naqvi S.A., Dandiya P.C.: Antibacterial, antifungal antiameobic, anitinfammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J. Ethnopharmacol.* **35**, 77–82 (1991)
10. Dota K.F.D., Consolaro M.E.L., Svidzinski T.I.E., Bruschi M.L.: Antifungal activity of brazilian propolis microparticles against yeasts isolated from vulvovaginal candidiasis. *Evidence-based Complementary Altern. Med.* DOI: 10.1093/ecam/nea029 (2011)
11. El-Shouny W., Muagam F., Sadik Z., Hamza W.: Antimicrobial activity of propolis extract on URT infections in pediatric patients admitted to Al-Thowrah hospital, Hodeidah City, Yemen. *World J. Med. Sci.* **7**, 172–177 (2002)

12. Grange J.M., Davey R.W.: Antibacterial properties of propolis (bee glue). *J. Royal Soc. Med.* **83**, 159–160 (1990)
13. Hashimoto T., Aga H., Abchi A.: Anti-*Helicobacter pylori* compounds in Brazilian propolis. *Nat. Med.* **52**, 518–520 (1998)
14. Havsteen B.I.I.: The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therapeut.* **96**, 67–202 (2002)
15. Hegazi A.G., Abd El Hady F.K.: Egyptian propolis: antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands. *Z. Naturforsch.* **57**, 395–402 (2002)
16. Hendi N.K.K., Naher H.S., Al-Charrakh A.H.: *In vitro* antibacterial and antifungal activity of Iraqi propolis. *J. Med. Plant Res.* **5**, 5058–5066 (2011)
17. Jóźwik Z., Trytek J.: The effect of propolis extracts containing flavonoid compounds on acid-resistant saprophytic bacilli. *Pszczel. Zesz. Nauk.* **29**, 47–65 (1985)
18. Kędzia B.: Przeciwdrobnoustrojowe działanie etanolowego ekstraktu z propolisu (EEP). Dokumentacja tematu 3/73. Inst. Rośl. Przetw. Ziel. Poznań, 1974
19. Kędzia A.: Działanie wyciągu etanolowego z propolisu na bakterie beztlenowe. *Herba Pol.* **32**, 53–57 (1986)
20. Kędzia A.: Wrażliwość bakterii bezwzględnie beztlenowych na wyciąg etanolowy z propolisu. *Herba Pol.* **34**, 267–272 (1988)
21. Kędzia B.: Skład chemiczny i aktywność biologiczna propolisu pochodzącego z różnych rejonów świata. *Post. Fitoterapii*, **1**, 23–35 (2006)
22. Kimoto T., Arai S., Kohguchi M., Aga M., Nomura Y., Micallef M.J., Kurimoto M., Mito K.: Apoptosis and suppression of tumor growth by artemisin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer Detect. Prev.* **22**, 506–515 (1998)
23. Koru O., Toksoy F., Acikel C.H., Tunca Y.M., Baysallar M., Uskudar Guclu A.: *In vitro* antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. *Anaerobe*, **13**, 140–145 (2007)
24. Kujumgiev A., Tsvetkova I., Serkedjieva Y., Bankova V., Christov R., Popov S.: Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J. Ethnopharmacol.* **64**, 235–240 (1999)
25. Lotfy M.: Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **7**, 22–31 (2006)
26. Łazebnik L.B., Dubtsova E.A., Kasianenko V.I., Komissarenko I.A.: Composition and some biological effects of propolis. *Eksp. Klin. Gastroenterol.* **2**, 112–116 (2006)
27. Malimon G.L., Shub T.A., Kagramanova K.A., Kivman G.Y.A.: Comparative study of alcoholic extracts of propolis from different geographic zones by spectrophotometric and antimicrobial action. *Khimiko-farmatsevticheskii Zhurnal*, **14**, 114–117 (1980)
28. Marcucci M.C.: Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, **26**, 83–99 (1995)
29. Mirzoeva O.K., Grishanin R.N., Balder P.C.: Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol. Res.* **152**, 239–246 (1997)
30. Nostro A., Cellini L., di Bartolomeo S., Cannatelli M.A., di Campli E., Procopio F., Grande R., Marzio L., Alonzo V.: Effects of combining extracts (from propolis or *Zingiber officinale*) with clarithromycin on *Helicobacter pylori*. *Phytother. Res.* **20**, 187–190 (2006)
31. Park Y.K., Alencar S.M., Aguiar C.L.: Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2502–2506 (2002)
32. Pepelnjak S., Jalsenjak I., Maysinger D.: Flavonoid content in propolis extracts and growth inhibition of *Bacillus subtilis*. *Pharmazie*, **40**, 122–123 (1985)
33. Piccinelli A.L., Lotti C., Campone L., Cuesta-Rubio O., Campo Fernandez M., Rastrelli L.: Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by highperformance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 6484–6491 (2011)
34. Popova M.P., Chinou I.B., Marekov I.N., Bankova V.S.: Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. *Phytochem.* **70**, 1262–1271 (2009)
35. Rojas-Hernandez N.M., Candelario M., Olivares E.: Antimicrobial activity of propolis against representatives of the genus *Mycobacterium*. *Rev. Biol. (Habana)*, **7**, 69–75 (1993)
36. Saavedra N., Barrientos L., Herrera C.L., Alvear M., Montenegro G., Salazar L.A.: Effect of Chilean propolis on cariogenic bacteria *Lactobacillus fermentum*. *Cienc. Investig. Agrar.* **38**, 117–125 (2011)
37. Sawaya A.C., Barbosa da Silva Cunha I., Marcucci M.C.: Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chem. Cent. J.* **5**, 27 (2011)
38. Scazzocchio F., D'Auria F.D., Alessandrinia D., Pantanella F.: Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiol. Res.* **161**, 327–333 (2006)
39. Scheller S., Kowalski H., Oklek K., Dworniczak S., Matsunoc T., Waldemar-Klimmek K., Rajca M., Shanid J.: Correlation between virulence of various strains of mycobacteria and their susceptibility to ethanolic extract of propolis (EEP). *Z. Naturforsch.* **53**, 1040–1044 (1998)
40. Shub T.A., Kagramanova K.A., Kivman G.Y.A., Tikhonov A.I., Gritsenko V.I.: Antimicrobial activity of propolis extracts. *Pharm. Chem. J.* **11**, 1242–1244 (1978)
41. Shub T.A., Kagramanova K.A., Voropaeva S.D., Kivman G.Y.A.: Effect of propolis on strains of *Staphylococcus aureus* resistant to antibiotics. *Antibiotiki*, **26**, 268–271 (1981)
42. Silva B.B., Rosalen P.L., Cury J.A., Ikegaki M., Souza V.C., Esteves A., Alencar S.M.: Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. *Evid. Based Compl. Alt.* **5**, 313–316 (2008)
43. Speciale A., Costanzo R., Puglisi S., Musumeci R., Catania M.R., Caccamo F., Iauk L.: Antibacterial activity of propolis and its active principles alone and in combination with macrolides, β -lactams and fluoroquinolones against microorganisms responsible for respiratory infections. *J. Chemother.* **18**, 164–171 (2006)
44. Stepanović S., Antić N., Dakić I., Svabić-Vlahović M.: *In vitro* antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiol. Res.* **158**, 353–357 (2003)
45. Stojko A., Scheller S., Szwarnowiecka I., Tustanowski J., Ostach H., Obuszko Z.: Biological properties and clinical application of propolis. *Arzneimittel-Forsch.* **28**, 35–37 (1978)
46. Sytnik I.A., Kovalik P.V.: Combined effect of propolis and different antibiotics on staphylococci. *Vestn. Otorinolaringol.* **6**, 47–50 (1983)
47. Takasi K., Kikuni N.B., Schiller H.: Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of propolis. *Provenance Planta Med.* **60**, 222–227 (1994)
48. Temiz A., Sener A., Ozkok Tüylü A., Sorkung K., Salih B.: Antibacterial activity of bee propolis samples from different geographical regions of Turkey against two foodborne pathogens, *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes*. *Turk. J. Biol.* **35**, 503–511 (2011)
49. Tosi B., Donini A., Romagnoli C., Bruni A.: Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. *Phytother. Res.* **10**, 335–336 (1996)
50. Ugur A., Arslan T.: An *in vitro* study on antimicrobial activity of propolis from Mugla province of Turkey. *Med. Food.* **7**, 90–94 (2004)
51. Włoch V.D.: Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Advances in Pharmacol. Sci.* DOI: 10.1155/2013/308249 (2013)

Karol Stasiak^{1*}, Jerzy Rola¹, Jan Franciszek Żmudziński¹

¹ Zakład Wirusologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy

Wpłynęło w lutym 2016 r.
Zaakceptowano w kwietniu 2016 r.

1. Wstęp. 2. Charakterystyka ogólna rodziny *Herpesviridae*. 3. Rys historyczny. 4. Wirion. 5. Genom. 6. Glikoproteiny. 7. Patogeneza zakażenia. 8. Choroby układu oddechowego. 9. Poronienia. 10. Zakażenia nowo narodzonych źrebiąt. 11. Zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego. 12. Zakażenia innych gatunków zwierząt. 13. Diagnostyka laboratoryjna. 14. Immunoprofilaktyka. 15. Podsumowanie

Equine Herpesvirus type 1 – well known, but still challenging

Abstract: Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) is a double-stranded DNA virus occurring in all breeds of horses. It belongs to the *Varicellovirus* genus, *Herpesviridae* family and *Alphaherpesvirinae* subfamily. EHV-1 may cause epidemic respiratory disorders, abortions in pregnant mares, neonatal foal death, chorioretinopathy and also neurological disease, termed equine herpesvirus myeloencephalopathy (EHM). The infection spreads by inhalation of the aerosolised infectious virus or close contact with aborted fetuses, fetal membranes and fomites. Lifelong latency has been demonstrated especially in trigeminal ganglion, lymphatic tissues draining the respiratory tract and in peripheral blood leukocytes, from where the virus can be periodically reactivated. Both traditional serologic and virus isolation tests have been available for a long time, however, these assays have disadvantages, interfering with fast and reliable detection of EHV-1. Advances in molecular biology and the use of quantitative PCR system allow for more sensitive detection in a single genome copy range, higher analytical specificity and calculation of EHV-1 viral loads.

1. Introduction. 2. General characteristics of *Herpesviridae* family. 3. Historical background. 4. Virion. 5. Genome. 6. Glycoproteins. 7. Pathogenesis. 8. Respiratory disorders. 9. Abortions. 10. Neonatal foal deaths. 11. Equine herpesvirus myeloencephalopathy. 12. Infections in other species. 13. Laboratory demonstration of EHV-1 infections. 14. Immunoprophylaxis. 15. Conclusion

Słowa kluczowe: Diagnostyka, herpeswirus koni typ 1, mieloencefalopatia, ronienia, szczepionki

Key words: Diagnostic methods, equine herpesvirus type 1, myeloencephalopathy, abortions, vaccines

1. Wstęp

Herpeswirus koni typ 1 (EHV-1), początkowo nazywany wirusem zakaźnego ronienia kłaczy jest jednym z najbardziej powszechnych patogenów występujących w populacji koni, będąc częstą przyczyną poważnych strat ekonomicznych. Wirus ten powoduje zakażenia górnych dróg oddechowych, poronienia u ciężarnych kłaczy, śmierć nowonarodzonych źrebiąt, choroby oczu jak również przypadki zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego w postaci herpeswirusowej mieloencefalopatii (EHM – Equine Herpesvirus Myeloencephalopathy). U osobników chorych, wirus może umiejscowić się w zwoju nerwu trójdzielnego, węzłach chłonnych zlokalizowanych w obrębie górnych dróg oddechowych i w leukocytach krwi obwodowej przyjmując postać zakażenia latentnego, mogącego utrzymywać się przez wiele lat.

Wyniki szeroko prowadzonych badań nad EHV-1, jednoznacznie potwierdzają występowanie w populacji koni szczepów różniących się wirulencją (wysoko- i słabo-zjadliwe). Jednakże pomimo zdobytej wiedzy i nieustannych wysiłków badaczy na całym świecie, wiele zagadnień dotyczących natury EHV-1 jest nadal słabo poznana.

2. Charakterystyka ogólna rodziny *Herpesviridae*

Wirusy należące do rodziny *Herpesviridae* są szeroko rozpowszechnione w populacji wielu gatunków ssaków, ptaków i gadów. W jej skład zaliczamy trzy podrodziny: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* i *Gammapherpesvirinae*. Posiadają one liniowy, dwuniciowy DNA (o wielkości 124–230 tys. par zasad), otoczony ikosaedralem zbudowanym ze 162 kapsomerów, które otacza tegument. Zewnętrzną warstwę wirionu stanowi białkowo-lipidowa otoczka na powierzchni której znajdują się glikoproteiny. W skład rodziny *Herpesviridae* zalicza się 14 rodzajów, które ze względu na przynależność gatunkową można podzielić na: wirusy występujące u ludzi, małych czelakowatych, wirusy innych ssaków, a także ptaków, płazów i gadów, ryb kostnoszkieletowych oraz wirusy bezkręgowców [35, 57].

Z biologicznego punktu widzenia, rodzina *Herpesviridae* charakteryzuje się czterema właściwościami. Pierwszą z nich jest możliwość ustanowienia stanu latencji w komórkach gospodarza. Po drugie, zarówno proces syntezy wirusowego DNA jak i formowania się kapsydu ma miejsce w jądrze komórkowym. Kolejną właściwością jest posiadanie dwuniciowego kwasu deoksyrybonukleinowego, kodującego szereg enzymów

* Autor korespondencyjny: Zakład Wirusologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; tel. 81 889 31 21, e-mail: karol.stasiak@piwet.pulawy.pl

biorących udział w metabolizmie kwasów nukleinowych, białek i w syntezie DNA. Czwartą cechą jest śmierć komórki gospodarza na skutek uwalniania się wirusów potomnych [57].

3. Rys historyczny

Badania nad czynnikami zakaźnymi o etiologii wirusowej wywołującymi ronienia u klaczy miały swój początek w latach trzydziestych ubiegłego wieku na Uniwersytecie Rolniczym w stanie Kentucky (USA). Infekcja, za wywołanie której podejrzewano nieznaną współczesnej nauce wirus, została po raz pierwszy opisana w 1933 roku na podstawie zaobserwowanych zmian anatomopatologicznych u poronionego końskiego płodu [16]. Niecałe dwie dekady później w diagnostyce zakaźnego ronienia klaczy posłużono się metodami serologicznymi z których najszerze zastosowanie znalazł odczyn wiązania dopełniacza [18]. W tym samym czasie podjęto próby wyizolowania i namnożenia w pełni zjadliwego wirusa, początkowo przy użyciu osesków chomików syryjskich [19], załazonych zarodków kurzych [20] jak również i hodowli komórkowych [44].

Kolejne badania dotyczące wyjaśnienia patogenezy poronień na tle EHV-1, przyczyniły się do odkrycia powinowactwa zarazka do układu oddechowego. Inokulowanie ciężarnych klaczy filtratami pochodzącymi od poronionych płodów końskich ze zmianami anatomopatologicznymi sugerującymi zakażenie wirusem, wykazało pojawienie się u nich objawów chorobowych ze strony górnych dróg oddechowych [40]. Badania dotyczące etiopatogenezy wirusa zakaźnego ronienia klaczy w odniesieniu do układu oddechowego dotyczyły również koni młodych. Stwierdzono, że u tych osobników wirus także jest odpowiedzialny za występowanie zakażeń w obrębie górnych dróg oddechowych [21]. Fakt ten został potwierdzony, po dokładnym przeanalizowaniu charakteru i umiejscowienia zmian anatomopatologicznych, występujących u zakażonych młodych koni i poronionych płodów. Dlatego też badacze zasugerowali, by wirus odpowiedzialny za przypadki poronień u klaczy był także brany pod uwagę jako jeden z głównych patogenów układu oddechowego [17].

Do początku lat osiemdziesiątych wyróżniano dwa podtypy wirusa EHV-1. Pierwszy z nich uważany był za czynnik etiologiczny wywołujący ronienia i zaburzenia ze strony układu nerwowego, podczas gdy podtyp drugi miał odpowiadać głównie za infekcje w obrębie górnych dróg oddechowych. Punktem zwrotnym była analiza wyżej wymienionych podtypów z zastosowaniem enzymów restrykcyjnych, która wykazała szereg różnic w profilach elektroforetycznych, jednoznacznie

wskazując na ich odrębność [65, 78, 82]. Dlatego też zespół badaczy z Australii zasugerował aby oba te podtypy nazywano odpowiednio EHV-1 i EHV-4 [78].

W 2005 roku przeprowadzono szczegółową analizę genetyczną sekwencji nukleotydowych szczepów EHV-1, z których jeden został wyizolowany z przypadku klinicznego, manifestującego się objawami neurologicznymi (Ab4) i drugi będący przyczyną poronień, gdzie nie odnotowano zaburzeń nerwowych (V592). Badacze odkryli mutację punktową (substytucja) w pozycji 2254 genu ORF30. Sekwencja szczepu V592 zawiera w tej pozycji adeninę, natomiast w sekwencji szczepu Ab4 występuje guanina. Mutacja ta określana jest jako polimorfizm pojedynczego nukleotydu i charakteryzuje się zmianą w sekwencji aminokwasowej polimerazy DNA (pozycja 752), czego efektem jest zastąpienie asparaginy kwasem asparaginowym. Po przeanalizowaniu sekwencji nukleotydowej genu ORF30 większej liczby izolatów, autorzy wysunęli hipotezę, na podstawie której uznali, że za wywołanie postaci nerwowej EHV-1 odpowiadają szczepy posiadające genotyp G_{2254} (potencjał neuropatogeny), podczas gdy szczepy o wariantie A_{2254} są nie-neuropatogenne i są zwykle odpowiedzialne za występowanie zakażeń układu oddechowego i poronień [52].

W ostatnich latach pojawiła się znaczna liczba raportów dotyczących ostrych przypadków zachorowań wśród koni w wielu rejonach świata na tle postaci nerwowej EHV-1 [14, 60, 81, 88]. W Polsce odnotowano dwa przypadki poronień u klaczy, gdzie przyczyną był wirus o wariantie neuropatogeny (G_{2254}), jednakże w naszym kraju ostre kliniczne zakażenie na tle EHM nie zostało do tej pory potwierdzone laboratoryjnie [76]. Warto wspomnieć o pojawianiu się w literaturze dowodów świadczących o istnieniu większej liczby mutacji w genomie EHV-1, które mogą warunkować występowanie herpeswirusowej mieloencefalopatii [24, 60, 61].

4. Wirion

Wirion EHV-1 składa się z dwuniciowego DNA, otoczonego cienkościnnym, ikosaedralnym nukleokapsydem o średnicy około 120 nm, wokół którego znajduje się lipoproteinowa otoczka wraz z glikoproteinami. Przestrzeń zlokalizowana pomiędzy nukleokapsydem a otoczką nosi nazwę tegumentu [9]. Dwudziestościenne kapsyd zbudowany jest ze 162 kapsomerów, z których każdy ma cylindryczny kształt i kanał, położony wzdłuż jego osi długiej. Dwanaście z nich określa się mianem pentonów, zlokalizowanych na wierzchołkach, natomiast pozostałe kapsomery – heksony znajdują się na płaszczyznach dwudziestokątów [51]. Pod względem gęstości – wyróżniamy trzy rodzaje nukleokapsydów EHV-1: lekkie ($1,237 \text{ g/cm}^3$), pośrednie ($1,244 \text{ g/cm}^3$) i ciężkie ($1,258 \text{ g/cm}^3$). Wyżej

wymienione nukleokapsydy, różnią się między sobą zawartością DNA, strukturą wewnętrzną, właściwościami chemicznymi i składem białkowym [58].

5. Genom

EHV-1 posiada liniowy, dwuniciowy DNA z ustalonym składem zasad 56,7% G+C [80]. Badania z zastosowaniem mikroskopu elektronowego i analizy restrykcyjnej wykazały, że genom wirusa zawiera około 150 tysięcy par zasad (pz) i podzielony jest na dwa połączone ze sobą komponenty: długą – L oraz krótką – S [31, 80]. Komponent L składa się z sekwencji unikatowej U_L zawierającej 112 870 pz, otoczonej końcową sekwencją powtórzoną TR_L (32 pz) i wewnętrzną sekwencją powtórzoną IR_L (32 pz). Podobnie, komponent krótki, zawiera w swoim składzie sekwencję unikatową U_S (11 861 pz) otoczoną dwiema sekwencjami powtórzonymi IR_S i TR_S (obie składają się z 12 714 pz) [80]. Genom EHV-1 posiada 80 otwartych ramek odczytu (ORFs), z czego 4 z nich (ORF 64, 65, 66 i 67) ulega powtórzeniu w sekwencjach TR_S i IR_S i stąd uważa się, że kodowaniu ulega 76 odmiennych genów [80].

6. Glikoproteiny

Na powierzchni otoczki EHV-1 jest zlokalizowanych 12 glikoprotein odgrywających główną rolę w procesach adsorpcji, penetracji, uwalniania cząstek wirusów potomnych, a także rozprzestrzeniania się z komórki do komórki. Jedenaście z nich (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM i gN) swoją nomenklaturę zawdzięcza wysokiej konserwatywności analogicznie do wirusa opryszczki pospolitej (HSV-1). W skład glikoprotein otoczkowych EHV-1 zalicza się również gp2, która obecna jest tylko u dwóch przedstawicieli podrodziny *Alphaherpesvirinae*: herpeswirusa koni typu 4 (EHV-4) i herpeswirusa osłów typu 3 (AHV-3) [56, 62].

Jedną z najważniejszych glikoprotein, niezbędnych do replikacji EHV-1 jest po raz pierwszy opisana w 1985 roku glikoproteina B [49, 73]. Uczestniczy ona w procesie penetracji wirusa i jego rozprzestrzenianiu się między komórkami [49, 92]. Ze względu na wysoką konserwatywność – gen ORF33 (o wielkości około 3000 par zasad), kodujący gB znalazł zastosowanie w diagnostyce jako miejsce przyłączenia wielu starterów i sond molekularnych [15, 34, 36]. Drugą, odgrywającą kluczową rolę w cyklu namnażania herpeswirusa koni typu 1 glikoproteiną jest gD. Jej obecność warunkuje przebieg procesu penetracji [93]. Współdziała ona także w szerzeniu się wirusa pomiędzy komórkami [13, 91]. Dowiedziono, że znajdujący się w jej składzie tripeptyd składający się z argininy, seryny

i kwasu asparaginowego (RSD) ma zdolność wiązania się z αV integrzynami komórkowymi, ułatwiając tym samym przenikanie EHV-1 drogą endocytozy [84].

Za początkowe interakcje zachodzące pomiędzy wirusem a siarczanem heparanu znajdującym się na powierzchni błony komórkowej, odpowiada glikoproteina C. Ponadto, współdziała ona w uwalnianiu wirionów potomnych, zwłaszcza w przypadku namnożenia EHV-1 na pierwotnych końskich liniach komórkowych [53]. Glikoproteina C EHV-1 ma zdolność aglutynacji erytrocytów końskich, która jest hamowana jedynie za pomocą przeciwciał monoklonalnych anti-gC. Sytuacja wygląda inaczej w przypadku glikoprotein C występujących u innych herpeswirusów – tam aglutynacja jest blokowana przez heparynę [6]. Glikoproteina G pełni rolę wirusowego białka wiążącego chemokiny np. min. IL8 i CCL3, tym samym mając wpływ na przebieg zapalenia płuc i replikację wirusa podczas zakażenia EHV-1 [11, 83, 85].

Badania nad szczepami w których dokonano delekcji genu kodującego glikoproteinę E i I wykazały, że ułatwiają one rozprzestrzenianie się wirusa między komórkami, jednocześnie nie uczestnicząc w adsorpcji i penetracji, a także w procesach dojrzewania i uwalniania cząstek wirusowych [41]. Wirus, pozbawiony genu kodującego glikoproteinę M wywołuje wyraźnie słabsze zmiany cytopatyczne w hodowlach komórkowych w porównaniu do szczepu macierzystego, tym samym wskazując na fakt, że gM odgrywa ważną rolę zarówno w penetracji EHV-1 jak również w jego szerzeniu się między komórkami [54]. Zbadano również, że jej obecność jest ściśle powiązana z ekspresją genu ORF10 kodującego glikoproteinę N [63].

Funkcjami, jakie pełni glikoproteina K jest oprócz ułatwiania procesu penetracji, także częściowy współudział w powstawaniu syncytiów w dalszych etapach infekcji [50]. Pomimo stwierdzonej obecności gH i gL w zakażonych komórkach, ich funkcja w cyklu namnażania EHV-1 nie jest dokładnie poznana [77]. Jednakże, ostatnio przeprowadzone badania dotyczące glikoproteiny H, wykazały obecność tripeptydu zbudowanego z seryny, kwasu asparaginowego i izoleucyny (SDI), który ma zdolność wiązania się $\alpha 4\beta 1$ integrzynami znajdującymi się na powierzchni błony komórkowej. Zasugerowano, że interakcje zachodzące między nimi umożliwiają cząstkom wirusa wybranie odpowiedniej drogi wniknięcia do wnętrza komórki gospodarza (fuzja z błoną komórkową/endocytoza) [8], jak również przyczyniają się do zwiększenia stężenia jonów wapnia (Ca^{2+}) w cytoplazmie, co jest zapoczątkowane aktywowaniem fosfolipazy C i wytwarzaniem trifosforanu 1,4,5-inozytolu, który po połączeniu się z receptorem powoduje uwalnianie Ca^{2+} z retikulum endoplazmatycznego. Efektem tego jest aktywacja enzymu – skramblazy fosfolipidowej która transportuje

fosfatydyloserynę na zewnątrz błony komórkowej. I dlatego obecnie przyjmuje się, że powyższa zmiana układu lipidów ułatwia wnikanie EHV-1 do komórki [7].

Dokładna rola ostatniej glikoproteiny – gp2, w cyklu namnażania wirusa nadal pozostaje niewyjaśniona. Do tej pory wykazano, że delecja genu ORF71 kodującego gp2 znacząco obniża adsorbcję, penetrację i uwalnianie wirionów, skutkując powstawaniem mniejszych lysinek [79].

7. Patogeneza zakażenia

W środowisku naturalnym, do infekcji EHV-1 dochodzi najczęściej drogą kontaktu bezpośredniego z wydzielinami z górnych dróg oddechowych koni chorych. Źródłem zakażenia może być kontakt z poronionym płodem końskim oraz zawartością pochodzącą z dróg rodných klaczy, która poroniła. Ważną rolę w rozprzestrzenianiu się EHV-1 odgrywa kontakt pośredni, gdzie funkcję wektorów pełnią zanieczyszczone wirusem ręce personelu obsługującego konie czy też niedostatecznie dezynfekowane przyrządy codziennego użytku (żłoby, poidła) [3]. Istnieją dane dotyczące możliwej transmisji wirusa poprzez nasienie ogierów, zarówno podczas krycia naturalnego (przez okres do trzech tygodni od momentu zakażenia) jak i drogą sztucznej inseminacji [29, 89]. U koni, u których zakażenie EHV-1 przyjmie postać latentną (lokalizacja materiału genetycznego wirusa w zwoju nerwu trójdzielnego, tkance limfoidalnej układu oddechowego, leukocytach), pomimo braku widocznych objawów klinicznych wskazujących na infekcję, może nastąpić reaktywacja zakażenia wskutek działania bodźców stresogennych [12, 27, 68].

Na poziomie komórkowym, wirus początkowo ulega adsorbcji dzięki interakcjom pomiędzy glikoproteinami C i B a siarczanem heparanu [53]. Aby cały proces mógł dojść do skutku, niezbędne jest połączenie się glikoproteiny D z cząsteczką MHC klasy I, będącą swoistym receptorem dla gD, która znajduje się na błonie komórkowej komórek gospodarza [37]. Po zapoczątkowaniu adsorbcji, EHV-1 ma zdolność wnikania zarówno poprzez fuzję cząsteczek wirusowych z błoną komórkową jak i drogą endocytozy. Następnie doprowadzając do acetylacji tubuliny, wirus powoduje stabilizację mikrotubul i korzystając z dyneiny transportowany jest do jądra komórkowego. Należy podkreślić, że przemieszczanie się cząstek wirusowych jest uzależnione od aktywowania serynowo/treoninowej kinazy ROCK1 [23].

W odpowiedzi na kontakt cząstek EHV-1 z błoną komórek nabłonka górnych dróg oddechowych dochodzi do zwiększonej ekspresji receptorów błonowych Toll-like 3 i 9 (TLR3 i TLR9), a także cytokin zapalnych

(IL-1, TNF- α , IFN- α , IL-6) i chemokin (IL-8, MCP-1). Ponadto, jako efekt zakażenia obserwuje się znaczące zmniejszenie ekspresji cząsteczek MHC klasy I i II oraz spadek wytwarzania interferonu gamma (IFN- γ) [32]. Warto dodać, że decydujące znaczenie w regulowaniu wrodzonej odporności przeciwko zakażeniu EHV-1 ze strony komórek wyścielających górne drogi oddechowe odgrywa gen ORF1 [33].

Naturalną bramą wejścia dla szczepów neuropatogennych jak i nieneuropatogennych jest błona śluzowa górnych dróg oddechowych, gdzie wskutek fuzji cząsteczek wirusowych z błoną komórek nabłonka jednowarstwowego wielorzędowego, a następnie replikacji wirusa dochodzi do ich destrukcji. Zwiększa to ryzyko zakażeń oportunistycznych wywołanych przez inne patogeny górnych dróg oddechowych [38, 42]. Następnie, EHV-1 nie uszkadzając błony podstawnej komórek nabłonkowych, przedostaje się głównie za pomocą komórek CD172a⁺ (uważanych za śluzowe komórki dendrytyczne) i limfocytów T CD5⁺ do lokalnych węzłów chłonnych [28]. Należy zwrócić uwagę na fakt, iż w patogenie zakażenia istotną rolę „przenośników wirusa” pełnią leukocyty krwi obwodowej (limfocyty T CD8⁺, limfocyty B, monocyty i limfocyty T CD4⁺) [94].

W miarę postępowania zakażenia, EHV-1 wykorzystując zdolność tripeptydu RSD umiejscowionego w gD do wiązania z integrzynami błony komórkowej leukocytów krwi obwodowej przenika do ich wnętrza drogą endocytozy [55]. Prowadzi to do powstania ogólnoustrojowej wiremii, której pojawienie się jest powiązane z drugim od momentu zakażenia wzrostem ciepłoty wewnętrznej. Zaistniała sytuacja ma najczęściej miejsce między czwartym a dziesiątym dniem trwania zakażenia [34]. Charakterystyczną cechą infekcji szczepami o potencjale neuropatogennym jest dłuższy czas trwania wiremii i jej znacznie większa skala w porównaniu do zakażenia wirusami o wariantie nieneuropatogennym [4, 52]. Wykazano również, że po przedostaniu się do leukocytów, EHV-1 indukuje znaczny wzrost poziomu ekspresji chemokin: CCL5, CXCL9 i CXCL10 a także spadek ekspresji chemokiny CCL2 oraz CCL3 [95]. W trakcie trwania wiremii, wirus może przedostać się drogą fuzji do komórek śródbłonka naczyń krwionośnych ciężarnej macicy klaczy oraz do centralnego układu nerwowego, prowadząc do ostrego zapalenia naczyń krwionośnych i rozległej zakrzepicy, czego efektem jest poronienie i herpeswirusowa mieloencefalopatia [22, 71].

8. Zakażenia układu oddechowego

Niepowikłane przypadki zakażeń EHV-1 charakteryzują się ostrym zapaleniem jamy nosowej i gardła z ewentualnym rozprzestrzenieniem się zakażenia

w rejon dolnych dróg oddechowych (zapalenie tchawicy i oskrzeli, zapalenie oskrzelików). Ponadto u koni chorych występuje obfity surowiczy wypływ z nozdrzy, który w miarę nasilenia się procesu zapalnego staje się śluzowo-ropny. Objawami towarzyszącymi są gorączka (38,9–41,1°C), ogólne osłabienie oraz obrzęk węzłów chłonnych podżuchwowych [5, 26, 86]. Objawy kliniczne ze strony układu oddechowego z reguły ustępują po około dwóch tygodniach [67], jednakże przez cały ten okres ma miejsce siewstwo EHV-1 wraz z wydzielinami z górnych dróg oddechowych [26].

9. Poronienia

EHV-1 jest uznawany za jeden z najczęstszych czynników zakaźnych powodujących poronienia u klaczy [70]. W większości przypadków do poronienia dochodzi w III trymestrze ciąży (7–11 miesiąc) u jednej – dwóch klaczy w stadzie, jednakże niekiedy wskaźnik ten może osiągać wartość 50% [5, 86]. Wydalenie płodu może nastąpić w okresie od szóstego dnia [27] do czwartego miesiąca od momentu zakażenia [47]. U ciężarnych klaczy, często nie stwierdza się objawów zwiastunowych świadczących o zbliżającym się poronieniu, natomiast niekiedy obserwowane są słabo wyrażone objawy chorobowe ze strony górnych dróg oddechowych [69]. Płody nie wykazują cech autolizy, w odróżnieniu od przypadków w których poronienie nastąpiło przed 6 miesiącem ciąży. Natomiast w większości przypadków można u nich stwierdzić zmiany anatomopatologiczne, sugerujące zakażenie na tle EHV-1 [5]. U klaczy nie obserwuje się zmian w układzie rozrodczym mających negatywny wpływ na ich przydatność do rozrodu [66].

10. Zakażenia nowo narodzonych źrebiąt

Infekcja płodu może nastąpić w okresie tuż przed porodem. W takich przypadkach, źrebięta rodzą się apatyczne i osłabione z objawami ostrej niewydolności układu oddechowego. Bardzo często dochodzi do wtórnych zakażeń bakteryjnych, co znacznie pogarsza rokowanie. U zakażonych źrebiąt, pomimo szybko podjętej interwencji lekarsko-weterynaryjnej, dochodzi do zejścia śmiertelnego w okresie od kilku do kilkunastu dni [48, 59].

11. Zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego

Zespół objawów chorobowych wywołanych przez EHV-1, które swoim zasięgiem obejmują centralny układ nerwowy, nosi nazwę herpeswirusowej mieloencefalopatii. Mogą one występować zarówno u pojedyn-

czych osobników jak również u grupy koni w danym stadzie. Objawy nerwowe pojawiają się nagle i najczęściej są poprzedzone podwyższeniem temperatury wewnętrznej. W większości przypadków klinicznych, odstęp pomiędzy pierwszym pojawieniem się gorączki, a rozwojem objawów neurologicznych trwa od 6 do 10 dni [30, 87, 90]. Natomiast ich rodzaj i nasilenie zależą od lokalizacji oraz rozmiaru uszkodzeń centralnego układu nerwowego. Szczególnie narażone na infekcję są odcinki: piersiowy, lędźwiowy, krzyżowy i ogonowy rdzenia kręgowego. Wśród zaburzeń neurologicznych obserwuje się okresową ataksję, niedowład kończyn miednicznych oraz ich porażenia. Niekiedy porażenia mogą także obejmować kończyny piersiowe. U chorych koni może dochodzić do utraty napięcia mięśni ogona, odbytu i nietrzymania moczu. Rokowanie zależy od postaci choroby. W przypadkach o ciężkim przebiegu, kiedy pomimo intensywnego leczenia konie zalegają dłużej niż 2 dni jest ono nieopimne [43, 87].

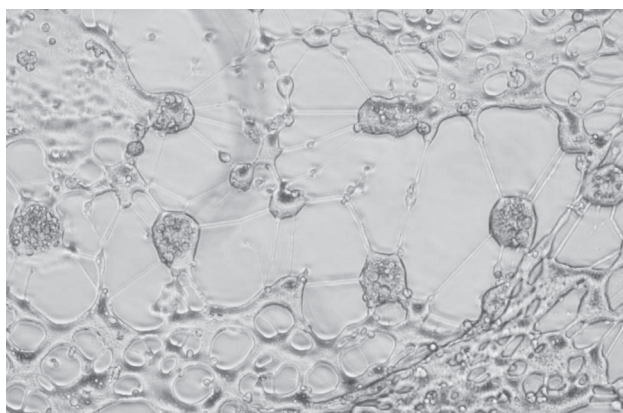
12. Zakażenia u innych gatunków zwierząt

EHV-1 posiada zdolność pokonywania bariery międzygatunkowej, co potwierdzają przypadki zakażeń jakie miały miejsce na terenie ogrodów zoologicznych w Niemczech. Obecność sekwencji DNA charakterystycznych dla EHV-1 stwierdzono w próbkach narządów wewnętrznych pochodzących od niedźwiedzi czarnych, u których rozwinęły się ostre objawy neurologiczne będące przyczyną zejścia śmiertelnego; gazeli Thomsona, także dotkniętych zaburzeniami neurologicznymi i świnek morskich, u których oprócz postaci nerwowej, dodatkowo występowały poronienia [96]. Zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego na tle EHV-1, zostało również potwierdzone u nosorożca indyjskiego [1]. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że zakażenia wywołane przez herpeswirus koni typu 1 u tych grup zwierząt nie były wcześniej notowane.

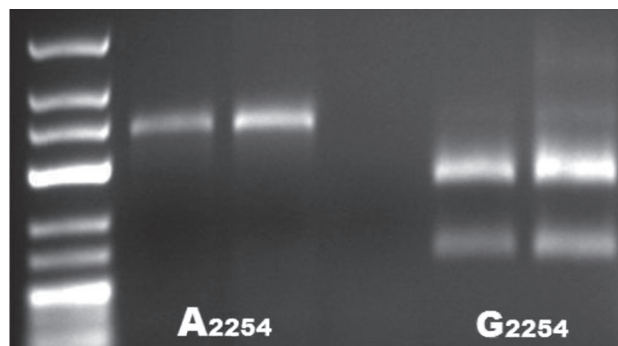
13. Diagnostyka laboratoryjna

Zakażenie EHV-1 można stwierdzić zarówno bezpośrednio: drogą wykrycia zjadliwego wirusa w teście izolacji lub jego materiału genetycznego (test PCR i real-time PCR) w narządach wewnętrznych i płynach ustrojowych, a także pośrednio: poprzez wykrycie specyficznych przeciwciał w teście seroneutralizacji, teście immunoenzymatycznym (ELISA), odczynie wiązania dopełniacza oraz od niedawna przy użyciu odczynu immunodifuzji w żelu agarozowym (AGID) [25, 97].

Pomimo coraz częstszego zastosowania technik biologii molekularnej – za złoty standard uznaje się test izolacji wirusa przy użyciu hodowli komórkowej.



Rys. 1. Efekt cytopatyczny EHV-1 w hodowli komórkowej RK-13 (materiały własne)



Rys. 2. Wynik testu PCR-RFLP z zastosowaniem enzymu restrykcyjnego *Sall* (materiały własne)

Materiałem biologicznym, w którym można wykryć obecność EHV-1 są: wymazy z nozdrzy, popłuczyny z drzewa oskrzelowego, narządy wewnętrzne poronionych płodów końskich (płuca, wątroba, śledziona), leukocyty krwi obwodowej, czy też tkanki pochodzące z centralnego układu nerwowego. W diagnostyce znalazły zastosowanie przede wszystkim linie komórkowe ciągłe: *rabbit kidney-13* (RK-13), *equine dermis* (ED), *Madin-Darby bovine kidney* (MDBK), *baby hamster kidney-21* (BHK-21), a także *pig kidney-15* (PK-15) [97] (rys. 1).

Metodami, które ze względu na swoją wysoką czułość, specyficzność i szybkość wykonania usprawniły diagnostykę zakażeń na tle EHV-1 są test PCR i real time-PCR. Pozwalają one na różnicowanie zakażeń EHV-1 i EHV-4 [15, 36]. W rutynowej diagnostyce zakażeń, oprócz wysoce konserwatywnego genu ORF33, kodującego glikoproteinę B – nieco mniejsze zastosowanie znalazły startery amplifikujące fragmenty genów takich jak ORF16 (glikoproteina C) oraz ORF72 (glikoproteina D).

Największy współczynnik zmienności genetycznej w genomie EHV-1 posiada gen ORF68. Przyczyną takiego stanu rzeczy jest obecność pojedynczych substytucji we fragmencie liczącym około 600 nukleotydów. Badania dotyczące polimorfizmu wyżej wspomnianego fragmentu genu pozwoliły na wyodrębnienie pod względem pochodzenia geograficznego – początkowo sześciu, a następnie dziesięciu grup izolatów EHV-1 [52, 39]. Warto dodać, że w jednej z publikacji wyszczególniono dwa izolaty, w przypadku których lokalizacja mutacji uniemożliwia ich sklasyfikowanie do opisanych grup geograficznych, tym samym wskazując na jeszcze większe zróżnicowanie terytorialne szczepów EHV-1 [52].

Kolejną metodą stosowaną w praktyce laboratoryjnej jest analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (PCR-RFLP). Dzięki niej istnieje możliwość różnicowania zakażeń wywołanych wariantami

neuropatogennym EHV-1 (G_{2254}) i nie-neuropatogennym (A_{2254}). Metoda RFLP wykorzystuje enzym *Sall* do analizy ampliconu genu ORF30 o wielkości 380 par zasad. W przypadku infekcji wywołanej typem G_{2254} następuje restrykcja ampliconu, czego efektem jest powstanie dwóch produktów o mniejszej wielkości podczas gdy amplicon genotypu A_{2254} nie ulega trawieniu enzymem restrykcyjnym (rys. 2). Inną metodą pozwalającą na różnicowanie zakażeń między poszczególnymi wariantami EHV-1 jest test real-time PCR, gdzie typy wirusa są wykrywane i identyfikowane za pomocą dwóch specyficznych sond molekularnych [2, 72].

W celu wykrycia obecności przeciwciał EHV-1 w surowicy koni, powszechnie stosuje się test seroneutralizacji oraz test immunoenzymatyczny ELISA, którego dodatkową zaletą jest możliwość zróżnicowania przeciwciał powstałych wskutek infekcji wywołanej przez blisko spokrewniony EHV-4. Duże znaczenie w diagnostyce serologicznej ma badanie par surowic, które pobiera się w trakcie trwania fazy ostrej zakażenia i następnie 3–4 tygodnie później t.j. z okresu rekonwalescencji. Co najmniej 4-krotny wzrost miana przeciwciał będzie wskazywał na zakażenie EHV-1 [97]. W praktyce, badanie takie może być przydatne w trakcie monitorowania całego stada wolnego od EHV-1, lub po kontakcie z wirusem. Badanie serologiczne ma jednak ograniczone zastosowanie u klaczy, które poroniły i u osobników z EHM. Dzieje się tak dlatego, że podczas trwania tych epizodów, surowica zawiera już wysokie miano przeciwciał i kolejne jej pobranie w fazie rekonwalescencji nie wykaże znaczącego wzrostu [10].

14. Immunoprofilaktyka

Ze względu na powszechne występowanie wirusa w środowisku, a także na łatwość rozprzestrzeniania się zakażeń zarówno drogą horyzontalną jak i werty-

kalną nie jest możliwa pełna ochrona przed kontaktem z tym patogenem. W profilaktyce stosowane są szczepionki pierwszej generacji zawierające wirusy zabite (szczepionki inaktywowane) lub o osłabionej wirulencji (szczepionki żywe, atenuowane). Prowadzenie immunoprofilaktyki przeciwko zakażeniom EHV-1 przy użyciu wyżej wymienionych preparatów, pomimo indukowania przez nie stosunkowo wysokiego miana specyficznych przeciwciał nie prowadzi do całkowitego wyeliminowania siewstwa, nie zapobiega wirerii, która może prowadzić do poronienia a także EHM. Szczepionki inaktywowane słabo stymulują odpowiedź immunologiczną typu komórkowego, wymagają częstych rewakcytacji i mogą przyczyniać się do wystąpienia lokalnych odczynów zapalnych [45].

Stosowanie szczepionek żywych, atenuowanych powoduje, że po ich jednokrotnym użyciu odporność pojawia się szybciej i utrzymuje się przez dłuższy okres czasu. Jednak w przypadku ich zastosowania, istnieje ryzyko rewersji wirusa szczepionkowego do pełnej zjadliwości [45, 56].

W profilaktyce zakażeń na tle EHV-1, oprócz ograniczania siewstwa zarazka, niezwykle ważne jest zapobieganie powstawaniu wirerii i dlatego też kluczową rolę w procesie infekcji odgrywa odpowiedź typu komórkowego ze strony limfocytów T cytotoksycznych (Tc). Badania nad potencjalną słuszością tej hipotezy dowiodły, że limfocyty Tc występujące u koni wykazujących ekspresję haplotypu MHC I-A3/B2 (ELA-A3/B2) wykrywają komponenty bezpośrednio wczesnego transkryptu (Immediate Early) EHV-1, który jako pierwszy ulega ekspresji w cyklu replikacyjnym wirusa [75, 74]. Mając na uwadze ten istotny fakt, udowodniono że u tej grupy koni, immunizacja szczepionką wektorową zawierającą gen ORF64, kodujący wyżej wymieniony transkrypt (IE) EHV-1 spowodowała znaczące obniżenie poziomu wirerii [74].

Należy podkreślić, że opracowanie złożonych szczepionek wektorowych w przypadku których, obiecującymi kandydatami oprócz genu IE mogłyby także być geny kodujące poszczególne glikoproteiny. Szczepionki takie stymulując indukcję zarówno silnej odpowiedzi humoralnej jak i komórkowej mogłyby przyczynić się do eliminacji siewstwa EHV-1, ograniczenia zainfekowanych leukocytów, a także do zapobiegania poronieniom u klaczy i występowania przypadków mieloencefalopatii.

Dla potrzeb immunoprofilaktyki zakażeń EHV-1 opracowano również szczepionki tzw. drugiej generacji, jednakże w chwili obecnej pozostają w sferze badań i nie są dostępne komercyjnie. W tej grupie szczepionek znajdują się oprócz wyżej wymienionych szczepionek wektorowych także szczepionki delecyjne i szczepionki DNA [41, 46, 64].

15. Podsumowanie

Wzrost zainteresowania zakażeniami wywołanymi przez herpeswirus koni typu 1 nastąpił w pierwszej połowie XX wieku co miało ścisły związek z częstymi przypadkami masowych poronień u klaczy rejestrowanych w Stanach Zjednoczonych, jak i pozostałych częściach świata. Infekcje u koni, stosunkowo często ograniczające się do zapalenia górnych dróg oddechowych mogą mieć znacznie poważniejsze następstwa, do których zalicza się: poronienia, śmierć nowonarodzonych źrebiąt oraz zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego. Zakażenia na tle EHV-1, nierzadko o ciężkim przebiegu kończącym się zejściem śmiertelnym mogą wystąpić u innych gatunków zwierząt niż konie.

Diagnostyka laboratoryjna oparta jest zazwyczaj na izolacji wirusa przy użyciu hodowli komórkowych, stwierdzeniu obecności przeciwciał w teście seroneutralizacji lub immunoenzymatycznym ELISA. Ponadto do wykrywania zakażenia na tle EHV-1 stosuje się testy PCR i real-time PCR.

Prowadzenie regularnych szczepień za pomocą preparatów komercyjnych nie jest w stanie wyeliminować siewstwa wirusa ani zapobiec wirerii, dlatego też celem zapewnienia możliwie jak największej ochrony przeciwko zakażeniom EHV-1 konieczne jest wdrożenie i przestrzeganie zasad bioasekuracji, dezynfekcja sprzętu i pomieszczeń.

Piśmiennictwo

1. Abdelgawad A., Azab W., Damiani A.M., Baumgartner K., Will H., Osterrieder N., Greenwood A.D.: Zebra-borne equine herpesvirus type 1 (EHV-1) infection in non-African captive mammals. *Vet. Microbiol.* **169**, 102–106 (2014)
2. Allen G.P.: Development of a real-time polymerase chain reaction assay for rapid diagnosis of neuropathogenic strains of equine herpesvirus-1. *J. Vet. Diagn. Invest.* **19**, 69–72 (2007)
3. Allen G.P.: Epidemic disease caused by equine herpesvirus-1: recommendations for prevention and control. *Equine Vet. Educ.* **177**, 136–142 (2002)
4. Allen G.P., Breathnach C.C.: Quantification by real-time PCR of the magnitude and duration of leucocyte-associated viraemia in horses infected with neuropathogenic vs. non-neuropathogenic strains of EHV-1. *Equine Vet. J.* **38**, 252–257 (2006)
5. Allen G.P., Bryans J.T.: Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. *Prog. Vet. Microbiol. Immunol.* **2**, 78–144 (1986)
6. Andoh K., Hattori S., Mahmoud H.Y., Takasugi M., Shimoda H., Bannai H., Maeda K.: The haemagglutination activity of equine herpesvirus type 1 glycoprotein C. *Virus Res.* **195**, 172–176 (2015)
7. Azab W., Gramatica A., Herrmann A., Osterrieder N.: Binding of alphaherpesvirus glycoprotein H to surface $\alpha 4\beta 1$ -integrins activates calcium-signaling pathways and induces phosphatidylserine exposure on the plasma membrane. *mBio*, **6**, e01552–15 (2015)
8. Azab W., Lehmann M.J., Osterrieder N.: Glycoprotein H and $\alpha 4\beta 1$ integrins determine the entry pathway of alphaherpesviruses. *J. Virol.* **87**, 5937–5948 (2013)

9. Baker T.S., Newcomb W.W., Booy F.P., Brown J.C., Steven A.C.: Three-dimensional structures of maturable and abortive capsids of equine herpesvirus 1 from cryoelectron microscopy. *J. Virol.* **64**, 563–573 (1990)
10. Balasuriya U.B.R., Crossley B.M., Timoney P.J.: A review of traditional and contemporary assays for direct and indirect detection of equid herpesvirus 1 in clinical samples. *J. Vet. Diagn. Invest.* **27**, 673–687 (2015)
11. Bryant N.A., Davis-Poynter N., Vanderplasschen A., Alcamí A.: Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins. *EMBO J.* **22**, 833–846 (2003)
12. Chesters P.M., Allsop R., Purewal A., Edington N.: Detection of latency-associated transcripts of equid herpesvirus 1 in equine leukocytes but not in trigeminal ganglia. *J. Virol.* **71**, 3437–3443 (1997)
13. Csellner H., Walker C., Wellington J.E., McLure L.E., Love D.N., Whalley J.M.: EHV-1 glycoprotein D (EHV-1 gD) is required for virus entry and cell-cell fusion, and an EHV-1 gD deletion mutant induces a protective immune response in mice. *Arch. Virol.* **145**, 2371–2385 (2000)
14. Damiani A.M., de Vries M., Reimers G., Winkler S., Osterrieder N.: A severe equine herpesvirus type 1 (EHV-1) abortion outbreak caused by a neuropathogenic strain at a breeding farm in northern Germany. *Vet. Microbiol.* **172**, 555–562 (2014)
15. Diallo I.S., Hewitson G., Wright L.L., Kelly M.A., Rodwell B.J., Corney B.G.: Multiplex real-time PCR for the detection and differentiation of equid herpesvirus 1 (EHV-1) and equid herpesvirus 4 (EHV-4). *Vet. Microbiol.* **123**, 93–103 (2007)
16. Dimock W.W., Edwards P.R.: Is there a filterable virus of abortion in mares. *Bulletin: Kentucky Agriculture Experiment Station*, **333**, 291–301 (1933)
17. Doll E.R., Bryans J.T., McCollum W.H.: Isolation of a filterable agent causing arteritis of horses and abortion by mares. Its differentiation from the equine abortion (influenza) virus. *Cornell Vet.* **47**, 3–41 (1957)
18. Doll E.R., McCollum W.H., Wallace M.E., Bryans J.T., Richards M.G.: Complement-fixation reactions in equine virus abortion. *Am. J. Vet. Res.* **14**, 40–45 (1953)
19. Doll E.R., Richards M.G., Wallace M.E.: Adaptation of the equine abortion virus to suckling Syrian hamsters. *Cornell Vet.* **43**, 551–558 (1953)
20. Doll E.R., Wallace M.E.: Cultivation of equine abortion and equine influenza viruses on the chorioallantoic membrane of chicken embryos. *Cornell Vet.* **44**, 453–461 (1954)
21. Doll E.R., Wallace E., Richards M.G.: Thermal, hematological, and serological responses of weanling horses following inoculation with equine abortion virus: its similarity to equine influenza. *Cornell Vet.* **44**, 181–190 (1954)
22. Edington N., Bridges C.G., Patel J.R.: Endothelial cell infection and thrombosis in paralysis caused by equid herpesvirus-1: equine stroke. *Arch. Virol.* **90**, 111–124 (1986)
23. Frampton A.R., Uchida H., Von Einem J., Goins W.F., Grandi P., Cohen J.B., Glorioso J.C.: Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) utilizes microtubules, dynein, and ROCK1 to productively infect cells. *Vet. Microbiol.* **141**, 12–21 (2010)
24. Fritsche A.K., Borchers K.: Detection of neuropathogenic strains of equid herpesvirus 1 (EHV1) associated with abortions in Germany. *Vet. Microbiol.* **147**, 176–180 (2011)
25. Fuentealba N., Sguazza G., Scrochi M., Bravi M., Zanuzzi C., Corva S., Galosi C.: Production of equine herpesvirus 1 recombinant glycoprotein D and development of an agar gel immunodiffusion test for serological diagnosis. *J. Virol. Methods.* **202**, 15–18 (2014)
26. Gibson J.S., Slater J.D., Awan A.R., Field H.J.: Pathogenesis of equine herpesvirus-1 in specific pathogen-free foals: primary and secondary infections and reactivation. *Arch. Virol.* **123**, 351–366 (1992)
27. Gleeson L.J., Coggins L.: Response of pregnant mares to equine herpesvirus 1 (EHV1). *Cornell Vet.* **70**, 391–400 (1980)
28. Gryspeerdt A.C., Vandekerckhove A.P., Garré B., Barbé F., Van de Walle G.R., Nauwynck H.J.: Differences in replication kinetics and cell tropism between neurovirulent and non-neurovirulent EHV1 strains during the acute phase of infection in horses. *Vet. Microbiol.* **142**, 242–253 (2010)
29. Hebia-Fellah I., Bruyas J.F. i wsp.: Evaluation of the presence of equine viral herpesvirus 1 (EHV-1) and equine viral herpesvirus 4 (EHV-4) DNA in stallion semen using polymerase chain reaction (PCR). *Theriogenology*, **71**, 1381–1389 (2009)
30. Henninger R.W., Reed S.M., Saville W.J., Allen G.P., Hass G.F., Kohn C.W., Sofaly C.: Outbreak of neurologic disease caused by equine herpesvirus-1 at a University Equestrian Center. *J. Vet. Intern. Med.* **21**, 157–165 (2007)
31. Henry B.E., Robinson R.A., Dauenhauer S.A., Atherton S.S., Hayward G.S., O'Callaghan D. J.: Structure of the genome of equine herpesvirus type 1. *Virology*, **115**, 97–114 (1981)
32. Hussey G.S., Ashton L.V., Quintana A.M., Lunn D.P., Goehring L.S., Annis K., Landolt G.: Innate immune responses of airway epithelial cells to infection with equine herpesvirus-1. *Vet. Microbiol.* **170**, 28–38 (2014)
33. Hussey G.S., Ashton L.V., Quintana A.M., Van de Walle G.R., Osterrieder N., Lunn D.P.: Equine herpesvirus type 1 pUL56 modulates innate responses of airway epithelial cells. *Virology*, **464**, 76–86 (2014)
34. Hussey S.B., Clark R., Lunn K.F., Breathnach C., Soboll G., Whalley J.M., Lunn D.P.: Detection and quantification of equine herpesvirus-1 viremia and nasal shedding by real-time polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* **18**, 335–342 (2006)
35. International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV Masters Species List 2014 v4, http://talk.ictvonline.org/files/ictv_documents/m/msl/5208.aspx (29.11.2015)
36. Kirisawa R., Endo A., Iwai H., Kawakami Y.: Detection and identification of equine herpesvirus-1 and -4 by polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* **36**, 57–67 (1993)
37. Kurtz B.M., Singletary L.B., Kelly S.D., Frampton A.R.: Equus caballus major histocompatibility complex class I is an entry receptor for equine herpesvirus type 1. *J. Virol.* **84**, 9027–9034 (2010)
38. Kydd J.H., Smith K.C., Hannant D., Livesay G.J., Mumford J.A.: Distribution of equid herpesvirus-1 (EHV-1) in the respiratory tract of ponies: implications for vaccination strategies. *Equine Vet. J.* **26**, 466–469 (1994)
39. Malik P., Balint A., Dan A., Palfi V.: Molecular characterisation of the ORF68 region of equine herpesvirus-1 strains isolated from aborted fetuses in Hungary between 1977 and 2008. *Acta Vet. Hung.* **60**, 175–187 (2012)
40. Manninger R., Csontos J.: Virusabortus der Stuten. *Deutsche Tierärztlich Wochenschrift*, **49**, 105–111 (1941)
41. Matsumura T., Kondo T., Sugita S., Damiani A.M., O'Callaghan D.J., Imagawa H.: An equine herpesvirus type 1 recombinant with a deletion in the gE and gI genes is avirulent in young horses. *Virology*, **242**, 68–79 (1998)
42. McBrearty K.A., Murray A., Dunowska M.: A survey of respiratory viruses in New Zealand horses. *New Zeal. Vet. J.* **61**, 254–261 (2013)
43. McCartan C.G., Russell M.M., Wood J.L., Mumford J.A.: Clinical, serological and virological characteristics of an outbreak of paresis and neonatal foal disease due to equine herpesvirus-1 on a stud farm. *Vet. Rec.* **136**, 7–12 (1995)

44. McCollum W.H., Doll E.R., Wilson J.C., Johnson C.B.: Isolation and propagation of equine rhinopneumonitis virus in primary monolayer kidney cell cultures of domestic animals. *Cornell Vet.* **52**, 164–173 (1962)
45. Minke J.M., Audonnet J.C., Fisher L.: Equine viral vaccines: the past, present and future. *Vet. Res.* **35**, 425–443 (2004)
46. Minke J.M., Fischer L., Baudu P., Guigal P.M., Sindle T., Mumford J.A., Audonnet J.C.: Use of DNA and recombinant canarypox viral (ALVAC) vectors for equine herpes virus vaccination. *Vet. Immun. Immunopathol.* **111**, 47–57 (2006)
47. Mumford J.A., Rosedale P.D., Jessett D.M., Gann S.J., Ousey J., Cook R.F.: Serological and virological investigations of an equid herpesvirus 1 (EHV-1) abortion storm on a stud farm in 1985. *J. Reprod. Fertil. Sup.*, **35**, 509–518 (1986)
48. Murray M.J., Piero F., Jeffrey S.C., Davis M.S., Furr M.O., Dubovi E.J., Mayo J.A.: Neonatal equine herpesvirus type 1 infection on a thoroughbred breeding farm. *J. Vet. Intern. Med.* **12**, 36–41 (1998)
49. Neubauer A., Braun B., Brandmüller C., Kaaden O. R., Osterrieder N.: Analysis of the contributions of the equine herpesvirus 1 glycoprotein gB homolog to virus entry and direct cell-to-cell spread. *Virology*, **227**, 281–294 (1997)
50. Neubauer A., Osterrieder N.: Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) glycoprotein K is required for efficient cell-to-cell spread and virus egress. *Virology*, **329**, 18–32 (2004)
51. Newcomb W.W., Brown J.C., Booy F.P., Steven A.C.: Nucleocapsid mass and capsomer protein stoichiometry in equine herpesvirus 1: scanning transmission electron microscopic study. *J. Virol.* **63**, 3777–3783 (1989)
52. Nugent J., Birch-Machin I., Smith K.C., Mumford J.A., Swann Z., Newton J. R., Davis-Poynter N.: Analysis of equid herpesvirus 1 strain variation reveals a point mutation of the DNA polymerase strongly associated with neuropathogenic versus nonneuropathogenic disease outbreaks. *J. Virol.* **80**, 4047–4060 (2006)
53. Osterrieder N.: Construction and characterization of an equine herpesvirus 1 glycoprotein C negative mutant. *Virus Res.* **59**, 165–177 (1999)
54. Osterrieder N., Neubauer A., Brandmüller C., Braun B., Kaaden O.R., Baines J.D.: The equine herpesvirus 1 glycoprotein gp21/22a, the herpes simplex virus type 1 gM homolog, is involved in virus penetration and cell-to-cell spread of virions. *J. Virol.* **70**, 4110–4115 (1996)
55. Osterrieder N., Van de Walle G.R.: Pathogenic potential of equine alphaherpesviruses: the importance of the mononuclear cell compartment in disease outcome. *Vet. Microbiol.* **143**, 21–28 (2010)
56. Paillot R., Case R., Ross J., Newton R., Nugent J.: Equine herpes virus-1: virus, immunity and vaccines. *Open Vet. Sci. J.* **2**, 68–91 (2008)
57. Pellett P.E., Roizman, B.: The family Herpesviridae: a brief introduction. *Fields virology*, **2**, 2479–2497 (2001)
58. Perdue M.L., Cohen J.C., Kemp M.C., Randall C.C., O'Callaghan D.J.: Characterization of three species of nucleocapsids of equine herpesvirus type-1 (EHV-1). *Virology*, **64**, 187–204 (1975)
59. Perkins G., Ainsworth D.M., Erb H.N., Piero F., Miller M., Wilkins P.A., Frazer M.: Clinical, haematological and biochemical findings in foals with neonatal Equine herpesvirus-1 infection compared with septic and premature foals. *Equine Vet. J.* **31**, 422–426 (1999)
60. Perkins G.A., Goodman L.B., Tsujimura K., Van de Walle G.R., Kim S.G., Dubovi E.J., Osterrieder N.: Investigation of the prevalence of neurologic equine herpes virus type 1 (EHV-1) in a 3-year retrospective analysis (1984–2007). *Vet. Microbiol.* **139**, 375–378 (2009)
61. Pronost S., Cook R.F., Fortier G., Timoney P.J., Balasuriya U.B.R.: Relationship between equine herpesvirus-1 myeloencephalopathy and viral genotype. *Equine Vet. J.* **42**, 672–674 (2010)
62. Rudolph J., Osterrieder N.: Equine herpesvirus type 1 devoid of gM and gp2 is severely impaired in virus egress but not direct cell-to-cell spread. *Virology*, **293**, 356–367 (2002)
63. Rudolph J., Seyboldt C., Granzow H., Osterrieder N.: The gene 10 (UL49.5) product of equine herpesvirus 1 is necessary and sufficient for functional processing of glycoprotein M. *J. Virol.* **76**, 2952–2963 (2002)
64. Ruitenberg K.M., Walker C., Wellington J.E., Love D.N., Whalley J.M.: DNA – mediated immunization with glycoprotein D of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in a murine model of EHV-1 respiratory infection. *Vaccine*, **17**, 237–244 (1999)
65. Sabine M., Robertson G.R., Whalley J.M.: Differentiation of sub-types of equine herpesvirus I by restriction endonuclease analysis. *Aust. Vet. J.* **57**, 148–149 (1981)
66. Schulman M.L., Kass P.H., Becker A., Van der Merwe B.: A predictive model for reproductive performance following abortion in Thoroughbred mares. *Vet. Rec.* **172**, doi: 10.1136/vr.100670 (2013)
67. Slater J.: Equine herpesviruses. *Equine Infectious Diseases. St. Louis: Saunders Elsevier*, 134–152 (2007)
68. Slater J.D., Borchers K., Thackray A.M., Field H.J.: The trigeminal ganglion is a location for equine herpesvirus 1 latency and reactivation in the horse. *J. Gen. Virol.* **75**, 2007–2016 (1994)
69. Smith K.C.: Herpesviral abortion in domestic animals. *Vet. J.* **153**, 253–268 (1997)
70. Smith K.C., Blunden A.S., Whitwell K.E., Dunn K.A., Wales A.D.: A survey of equine abortion, stillbirth and neonatal death in the UK from 1988 to 1997. *Equine Vet. J.* **35**, 496–501 (2003)
71. Smith K.C., Borchers K.: A study of the pathogenesis of equid herpesvirus-1 (EHV-1) abortion by DNA in-situ hybridization. *J. Comp. Pathol.* **125**, 304–310 (2001)
72. Smith K.L., Li Y., Breheny P., Cook R.F., Henney P.J., Sells S., Balasuriya U.B.: New real-time PCR assay using allelic discrimination for detection and differentiation of equine herpesvirus-1 strains with A2254 and G2254 polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 1981–1988 (2012)
73. Snowden B.W., Kinchington P.R., Powell K.L., Halliburton I.W.: Antigenic and biochemical analysis of gB of herpes simplex virus type 1 and type 2 and of cross-reacting glycoproteins induced by bovine mammillitis virus and equine herpesvirus type 1. *J. Gen. Virol.* **66**, 231–247 (1985)
74. Soboll G., Breathnach C.C., Kydd J.H., Hussey S.B., Mealey R.M., Lunn D.P.: Vaccination of ponies with the IE gene of EHV-1 in a recombinant modified live vaccinia vector protects against clinical and virological disease. *Vet. Immun. Immunopathol.* **135**, 108–117 (2010)
75. Soboll G., Whalley J.M., Koen M.T., Allen G.P., Fraser D.G., Macklin M.D., Lunn D.P.: Identification of equine herpesvirus-1 antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J. Gen. Virol.* **84**, 2625–2634 (2003)
76. Stasiak K., Rola J., Ploszay G., Socha W., Zmudzinski J.F.: Detection of the neuropathogenic variant of equine herpesvirus 1 associated with abortions in mares in Poland. *BMC Vet. Res.* **11**, doi:10.1186/s12917-015-0416-7 (2015)
77. Stokes A., Alber D.G., Greensill J., Amellal B., Carvalho R., Taylor L.A., Meredith D.M.: The expression of the proteins of equine herpesvirus 1 which share homology with herpes simplex virus 1 glycoproteins H and L. *Virus Res.* **40**, 91–107 (1996)
78. Studdert M.J., Simpson T., Roizman B.: Differentiation of respiratory and abortigenic isolates of equine herpesvirus 1 by restriction endonucleases. *Science*, **214**, 562–564 (1981)

79. Sun Y., MacLean A.R., Aitken J.D., Brown S.M.: The role of the gene 71 product in the life cycle of equine herpesvirus 1. *J. Gen. Virol.* **77**, 493–500 (1996)
80. Telford E.A., Watson M.S., McBride K., Davison A.J.: The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology*, **189**, 304–316 (1992)
81. Tsujimura K., Oyama T., Katayama Y., Muranaka M., Bannai H., Nemoto M., Matsumura T.: Prevalence of equine herpesvirus type 1 strains of neuropathogenic genotype in a major breeding area of Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **73**, 1663–1667 (2011)
82. Turtinen L.W., Allen G.P., Darlington R.W., Bryans J.T.: Serologic and molecular comparisons of several equine herpesvirus type 1 strains. *Am. J. Vet. Res.* **42**, 2099–2104 (1981)
83. Van de Walle G.R., May M.L., Sukhumavasi W., von Einem J., Osterrieder N.: Herpesvirus chemokine-binding glycoprotein G (gG) efficiently inhibits neutrophil chemotaxis in vitro and in vivo. *J. Immunol.* **179**, 4161–4169 (2007)
84. Van de Walle G.R., Peters S.T., Van der Ven B.C., O'Callaghan D.J., Osterrieder N.: Equine herpesvirus 1 entry via endocytosis is facilitated by αV integrins and an RSD motif in glycoprotein D. *J. Virol.* **82**, 11859–11868 (2008)
85. Van de Walle G.R., Sakamoto K., Osterrieder N.: CCL3 and viral chemokine-binding protein gG modulate pulmonary inflammation and virus replication during equine herpesvirus 1 infection. *J. Virol.* **82**, 1714–1722 (2008)
86. Van Maanen C.: Equine herpesvirus 1 and 4 infections: an update. *Vet. Q.* **24**, 57–78 (2002)
87. Van Maanen C.V., Oldruitenborgh-Oosterbaan M.S., Damen E.A., Derksen A.G.P. Neurological disease associated with EHV-1 infection in a riding school: clinical and virological characteristics. *Equine Vet. J.* **33**, 191–196 (2001)
88. Vissani M.A., Becerra M.L., Perglione C.O., Tordoya M.S., Miño S., Barrandeguy M.: Neuropathogenic and non-neuropathogenic genotypes of equid herpesvirus type 1 in Argentina. *Vet. Microbiol.* **139**, 361–364 (2009)
89. Walter J., Balzer H.J., Seeh C., Fey K., Bleul U., Osterrieder N.: Venereal shedding of equid herpesvirus-1 (EHV-1) in naturally infected stallions. *J. Vet. Intern. Med.* **26**, 1500–1504 (2012)
90. Walter J., Seeh C., Fey K., Bleul U., Osterrieder N.: Clinical observations and management of a severe equine herpesvirus type 1 outbreak with abortion and encephalomyelitis. *Acta Vet. Scand.* **55**, 19 (2013)
91. Wellington J.E., Lawrence G.L., Love D.N., Whalley J.M.: Expression and characterization of equine herpesvirus 1 glycoprotein D in mammalian cell lines. *Arch. Virol.* **141**, 1785–1793 (1996)
92. Wellington J.E., Love D.N., Whalley J.M.: Evidence for involvement of equine herpesvirus 1 glycoprotein B in cell-cell fusion. *Arch. Virol.* **141**, 167–175 (1996)
93. Whittaker G.R., Taylor L.A., Elton D.M., Giles L.E., Bonass W.A., Halliburton I.W., Meredith D.M.: Glycoprotein 60 of equine herpesvirus type 1 is a homologue of herpes simplex virus glycoprotein D and plays a major role in penetration of cells. *J. Gen. Virol.* **73**, 801–809 (1992)
94. Wilsterman S., Soboll-Hussey G., Lunn D.P., Ashton L.V., Callan R.J., Hussey S.B., Goehring L.S.: Equine herpesvirus-1 infected peripheral blood mononuclear cell subpopulations during viremia. *Vet. Microbiol.* **149**, 40–47 (2011)
95. Wimer C.L., Damiani A., Osterrieder N., Wagner B.: Equine herpesvirus type-1 modulates CCL2, CCL3, CCL5, CXCL9, and CXCL10 chemokine expression. *Vet. Immun. Immunopathol.* **140**, 266–274 (2011)
96. Wohlsein P., Lehmbecker A., Spitzbarth I., Algermissen D., Baumgärtner W., Böer M., Grummer B.: Fatal epizootic equine herpesvirus 1 infections in new and unnatural hosts. *Vet. Microbiol.* **149**, 456–460 (2011)
97. World Organization for animal Health (OIE), Chapter 2.5.9. Equine rhinopneumonitis(w) OIE Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.09_EQUINE_RHINO.pdf (21.03.2016)

Paulina Roszkowska^{1*}, Stefania Giedrys-Kalemba², Katarzyna Galant³,
Agata Pruss³, Iwona Wojciechowska-Koszek¹

¹ Zakład Diagnostyki Immunologicznej, Katedra Mikrobiologii, Immunologii i Diagnostyki Immunologicznej,
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

² ALAB Laboratoria Sp. z o.o.

³ Zakład Medycyny Laboratoryjnej, Katedra Mikrobiologii, Immunologii i Diagnostyki Immunologicznej,
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Wpłynęło w lutym 2016 r.

Zaakceptowano w sierpniu 2016 r.

1. Rys historyczny. 2. Taksonomia. 3. Podsumowanie

The history and the current taxonomy of *Campylobacter* species

Abstract: The first mentions of unknown pathogenic Gram-negative curved rods date back to the 1880s. Initially, these bacteria were regarded only as a pathogen of animals, however, their clinical significance increased with the development of methods used in microbiological diagnostics. In recent decades, systematics and taxonomy of *Campylobacter*, initially belonging to the genus *Vibrio*, have undergone many transformations and modifications. *Campylobacter* is a separate genus since 1963 and, currently, it counts 27 species, 9 subspecies and 3 biovars. 19 species are considered to be pathogenic for humans and 9 for the animals. Nowadays, the significance of *Campylobacter* in the pathogenesis of infections in humans and animals is unquestionable.

1. Historical background. 2. Taxonomy. 3. Summary

Słowa kluczowe: *Campylobacter*, rys historyczny, taksonomia

Keywords: *Campylobacter*, history, taxonomy

1. Rys historyczny

Pierwsze informacje dotyczące rodzaju *Campylobacter* sięgają roku 1886, kiedy to drobnoustroj ten został po raz pierwszy zaobserwowany przez niemieckiego naukowca Theodora Eschericha w okrężnicy zmarłych na skutek biegunki noworodków. Bakterie te nie dawały wzrostu na stosowanych uprzednio podłożach hodowlanych, a przyczynę śmierci określono jako „cholera noworodków” [3, 42].

Na początku XX wieku odnotowywano sukcesywnie rosnącą liczbę przypadków zakażeń powodowanych przez zakrzywione pałeczki Gram-ujemne u zwierząt. W 1905 roku miały miejsce liczne przypadki poronień w stadach bydła i owiec. Rok później John McFadyean i Steward Stockman po raz pierwszy wyizolowali spiralne bakterie ze śluzu macicy ciężarnej owcy [42].

W 1918 roku Smith i Taylor zaproponowali nazwę *Vibrio fetus* (obecnie *Campylobacter fetus*) dla bakterii izolowanych z przypadków poronień w stadach bydła i owiec. U tych pierwszych źródłem zakażenia były byki (bezobjawowi nosiciele), stąd chorobę uznawano jako przenoszoną drogą płciową, zaś u owiec transmisja była nieco odmienna, za źródło drobnoustroju uznano nie barana, ale jedzenie lub wodę [43].

W latach 30. XX wieku bakterie o bardzo podobnym kształcie wyizolowano z jelita czczego (łac. *jejunum*)

cięt z biegunką i nazwano je *Vibrio jejuni* (obecnie *Campylobacter jejuni*), a w latach 40. z kału biegunkowego świń i pierwotnie określono jako *Vibrio coli* (obecnie *Campylobacter coli*). Ponadto pojawiły się wzmianki o bakteriach będących przyczyną zapalenia wątroby u ptaków, określanych mianem „related vibrios” [20, 8].

Campylobacter spp. zyskał znaczenie kliniczne, gdy w 1938 roku Levy zauważył spiralne mikroorganizmy podobne do *V. jejuni*, odpowiedzialne za zapalenie żołądka i jelit u 151 pacjentów w stanie Illinois w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej (USA), zaś domniemanym źródłem zakażenia było zanieczyszczone drobnoustrojami mleko [27].

V. fetus początkowo także nie był uznawany za mikroorganizm patogenny dla człowieka, aż do 1947 roku, kiedy to Vincent i wsp. opisali pierwszy przypadek infekcyjnego poronienia u kobiety o etiologii *V. fetus*, a przenoszone drogą płciową zakrzywione bakterie uznano za czynnik sprawczy poronień i niepłodności. Prawdopodobnie były to szczepy obecnie należące do podgatunku *Campylobacter fetus* subsp. *veneralis* [3].

Ważnego postępu w diagnostyce bakteriologicznej *Campylobacter* spp. dokonała na przełomie lat 50. i 60. XX wieku King, która wysunęła prawidłową, jak się później okazało hipotezę, iż są dwa typy zakrzywionych pałeczek powodujących infekcje u ludzi: *V. fetus* oraz

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii i Diagnostyki Immunologicznej, Wydział Lekarski z Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, al. Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin; tel. 91 466 16 69; fax: 91 466 16 59; e-mail: paulinaroszkowska@poczta.fm

pokrewne im inne zakrzywione pałeczki, określane jako „related vibrios”. Przeprowadzone badania pozwoliły na różnicowanie tych bakterii na podstawie ich wzrostu w odmiennych temperaturach. Po raz pierwszy spiralne, mikroaerofilne pałeczki wyhodowano w temperaturze 42°C, jak również zaobserwowano zdolność wzrostu szczepów *V. fetus* w temperaturze 25°C i 37°C, nie zaś w temperaturze 42°C, zapoczątkowując tym samym podział na termofilne i nietermofilne pałeczki *Campylobacter*. Ponadto King w pracy opublikowanej w 1962 roku wykazała, iż zakażenia o etiologii *V. fetus* dotyczą pacjentów „osłabionych” nie mających kontaktów ze zwierzętami, wykluczając tym samym to źródło zakażenia, zaś infekcje powodowane przez „related vibrios” dotyczyły przede wszystkim niemowląt i dzieci, pozostających w dobrym stanie zdrowia przed wystąpieniem pierwszych objawów. Z drugiej strony, King zwróciła także uwagę na przypadek zakażenia spowodowanego przez „related vibrios” u dorosłego pacjenta z alkoholową marskością wątroby i nadciśnieniem, rolnika będącego jednocześnie hodowcą drobiu, u którego podczas obfitej biegunki doszło do zgonu na skutek skrajnego odwodnienia. W autopsji wykazano zmiany krwotoczne w obrębie jelita czczego, nie zaś w obrębie okrężnicy. Zmiany te były niemalże tożsame ze zmianami patologicznymi opisanymi w 1931 roku przez Jones’a i wsp. występującymi u bydła cierpiącego na „zimową czerwone” o etiologii *V. jejuni*. Ponadto King wysunęła prawidłową hipotezę, iż znaczna liczba przypadków zakażeń u ludzi o etiologii zakrzywionych pałeczek Gram-ujemnych jest niediagnozowana, zwracając tym samym uwagę na nieoszacowany w owym czasie problem epidemiologiczny [20, 24, 25].

Na początku lat 60. poprzedniego stulecia zaproponowano wyodrębnienie bakterii o charakterystycznym spiralnym kształcie, rosnących w warunkach mikroaerofilnych oraz niemetabolizujących węglowodanów, z rodzaju *Vibrio* i utworzenie nowego rodzaju *Campylobacter* [40].

Zastosowanie metod filtracji używanych w mikrobiologii weterynaryjnej pozwoliło Butzlerowi i wsp., na początku lat 70. XX wieku na wyizolowanie *Campylobacter* spp. z kału od pacjentów z biegunką [7, 4]. Jednakże dopiero opisanie przez Skirrow’a i wsp. selektywnego suplementu składającego się z wankomycyny, polimyksyny B i trimetoprimu, dodawanego do podłoża bakteriologicznych, okazało się momentem przełomowym w rozwoju diagnostyki mikrobiologicznej pałeczek z rodzaju *Campylobacter* i ustaleniu ich klinicznej roli [41].

Dzięki nowym możliwościom diagnostycznym, na początku lat 80. XX wieku zaczęto izolować coraz to nowe gatunki określane mianem *Campylobacter*-podobnych (*Campylobacter*-like organisms, CLOs) z bardzo różnorodnych materiałów klinicznych, środowiskowych, a także odzwierzęcych [14, 30, 12].

Choć pierwszych źródeł o pałeczkach z rodzaju *Campylobacter* możemy doszukiwać się już pod koniec XIX wieku, to patogen ten za istotny czynnik chorobotwórczy został uznany dopiero po upływie niespełna kolejnego stulecia [17].

2. Taksonomia

Wyodrębnienie rodzaju *Campylobacter* z rodzaju *Vibrio* zaproponował w 1963 roku Sebald i Véron. Do nowo utworzonej jednostki taksonomicznej przeniesiono dwa gatunki: *Vibrio fetus* oraz *Vibrio bubulus* – były to odpowiednio *Campylobacter fetus* i *Campylobacter bubulus* (obecnie *Campylobacter sputorum*) [40]. W 1973 Véron i Chatelain opublikowali obszerniejszą taksonomię *Vibrio*-podobnych (*Vibrio*-like) mikroorganizmów, gdzie do rodzaju *Campylobacter* zaliczono cztery odrębne gatunki: *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus* i *C. sputorum* [55].

Rozwój metod diagnostycznych w mikrobiologii w latach 80. XX wieku oraz rosnące zainteresowanie znaczeniem klinicznym znanych gatunków z rodzaju *Campylobacter*, a także tych należących do grupy CLOs, doprowadziły na przestrzeni kilkunastu lat do licznych zmian w obrębie systematyki *Campylobacter*. Od 1974 do 1988 roku zidentyfikowano 12 nowych gatunków i podgatunków. W 1983 roku do rodzaju *Campylobacter* dołączył gatunek: *C. hyointestinalis*, który następnie został podzielony na dwa podgatunki: *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* oraz *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii*. Rok później dodano nowy gatunek nazwany początkowo *C. pyloridis*, następnie nazwę zmodyfikowano na *C. pylori*, jednakże pięć lat później gatunek ten został przeniesiony do nowo powstałego rodzaju *Helicobacter* [13, 32, 16].

W 1985 roku z *C. sputorum* subsp. *mucosalis* został wyodrębniony nowy gatunek *C. mucosalis*. Pozostałe podgatunki *C. sputorum*: *C. sputorum* subsp. *sputorum*, *C. sputorum* subsp. *bubulus* oraz *C. fecalis* zostały sklasyfikowane jako biowary (biovar, bv.) *C. sputorum* [36, 37]. Pierwszy podział tego gatunku uwzględniał źródła, z których izolowano poszczególne biowary, następny został dokonany w oparciu o cechy biochemiczne, takie jak zdolność wytwarzania katalazy oraz ureazy. Na podstawie tego ostatniego kryterium ustalono obecną klasyfikację: *C. sputorum* bv. *sputorum* (niewytwarzający katalazy ani ureazy), *C. sputorum* bv. *fecalis* (wytwarzający katalazę, niewytwarzający ureazy) oraz *C. sputorum* bv. *paraureolyticus* (wytwarzający ureazę, niewytwarzający katalazy) [31, 54]. Zakwestionowano także zasadność istnienia odrębnej jednostki taksonomicznej dla *C. sputorum* bv. *bubulus* gdyż analiza profili białkowych tych szczepów wykazywała wysoką homologię ze szczepami *C. sputorum* bv. *sputorum*. W 2001 roku

Tabela I
Rezerwuary i chorobotwórczość szczepów *Campylobacter* spp.

Gatunek		Rezerwuar	Pierwsze doniesienie	Chorobotwórczość dla ludzi	Chorobotwórczość dla zwierząt
<i>C. fetus</i>	ssp. <i>fetus</i>	bydło, konie, kangury, owce	Smith i Taylor, 1919	+	+
	ssp. <i>veneralis</i>	bydło	Florent, 1959	+	+
	ssp. <i>testudinum</i>	gady, człowiek	Fitzgerald i wsp., 2014	+	?
<i>C. jejuni</i>	ssp. <i>jejuni</i>	dzikie ptactwo, bydło, trzoda chlewna, kurczaki, psy, króliki, owady, woda	Jones i wsp., 1931	+	+
	ssp. <i>doylei</i>	człowiek	Steel i Owen, 1988	+	?
<i>C. coli</i>		dzikie ptactwo, bydło, trzoda chlewna, kurczaki, kozy, owce	Doyle, 1948	+	+
<i>C. sputorum</i>	bv. <i>sputorum</i>	człowiek	Prévot, 1940	+	?
	bv. <i>faecalis</i>	bydło, owce	Firehammer, 1965	+	?
	bv. <i>paraureolyticus</i>	owce	On i wsp., 1998	+?	?
<i>C. mucosalis</i>		psy, trzoda chlewna	Lawson i Rowland, 1974	?	+
<i>C. urealyticus</i>		konie, człowiek	Jackson i Goodman, 1978	+	?
<i>C. concisus</i>		psy, koty, człowiek	Tanner i wsp., 1981	+	?
<i>C. gracilis</i>		psy, człowiek	Tanner i wsp., 1981	+	?
<i>C. rectus</i>		człowiek	Tanner i wsp., 1981	+	?
<i>C. curvus</i>		psy, człowiek	Tanner i wsp., 1984	+	?
<i>C. hyointestinalis</i>	ssp. <i>hyointestinalis</i>	bydło, trzoda chlewna, owce, renifery, psy, chomiki	Gebhart i wsp., 1985	?	?
	ssp. <i>lawsonii</i>	trzoda chlewna	On i wsp., 1995	+	+
<i>C. upsaliensis</i>		psy, koty, człowiek	Sandstet i Ursing, 1991	+	+
<i>C. helveticus</i>		koty, psy	Stanley i wsp., 1992	+	+
<i>C. showae</i>		psy, człowiek	Etoh i wsp., 1993	+	?
<i>C. lanienae</i>		bydło, trzoda chlewna, owce, człowiek	Logan i wsp., 2000	?	?
<i>C. hominis</i>		człowiek	Lawson i wsp., 2001	+	?
<i>C. lari</i>	ssp. <i>lari</i>	dzikie ptactwo, kurczaki, bydło, konie, małpy, małże, woda	Benjamin i wsp., 2003	+	+
	ssp. <i>concheus</i>	małże, człowiek	Debruyne i wsp., 2009	?	?
<i>C. insulaenigrae</i>		słonie morskie, lwy morskie, morświny, foki, człowiek	Foster i wsp., 2004	+	?
<i>C. canadensis</i>		żurawie	Inglis i wsp., 2007	?	?
<i>C. avium</i>		drób	Rossi i wsp., 2009	?	?
<i>C. cuniculorum</i>		króliki	Zanoni i wsp., 2009	?	?
<i>C. peloridis</i>		skorupiaki, człowiek	Debruyne i wsp., 2009	?	?
<i>C. subantarcticus</i>		pingwiny białobrewy i żłotoczupe, albatrosy czarnobrewy i szarogłowe	Debruyne i wsp., 2009	?	?
<i>C. volucris</i>		mewy śmieszki	Debruyne i wsp., 2010	?	?
<i>C. troglodytis</i>		szympansy	Kaur i wsp., 2011	?	?
<i>C. corcagiensis</i>		makaki wanderu (<i>Macaca silenus</i>)	Koziel i wsp., 2014	?	?
<i>C. iguaniorum</i>		jaszczurki, żółwie	Gilbert i wsp., 2015	?	?

zmieniono nazwę biowaru *C. sputorum* bv. *faecalis* na *C. sputorum* bv. *faecalis* [54].

W latach 80. ubiegłego stulecia zaobserwowano także różnice w obrębie gatunku *C. jejuni*. W 1985 roku po raz pierwszy wyizolowano szczepy, określone jako „nietypowe” *C. jejuni*, od dzieci poniżej 5 roku życia, mieszkańców centralnej Australii, hospitalizowanych z powodu biegunki [46]. Podobne pod względem biochemicznym szczepy wyizolowano z kału biegunkowego dzieci będących rdzennymi mieszkańcami południowej

i zachodniej Australii oraz dzieci hospitalizowanych z powodu zapalenia żołądka i jelit (łac. *gastroenteritis*) lub sepsy w jednym ze szpitali w Republice Południowej Afryki, a także z biopłatów żołądka osób dorosłych, mieszkańców Niemiec oraz Wielkiej Brytanii [22, 33]. Wszystkie te szczepy słabo rosły w temperaturze 37°C, nie rosły zaś w 42°C, co było pierwszą cechą odmienną od typowych *C. jejuni*, które należą do gatunków termofilnych. Wszystkie „nietypowe” szczepy, jak większość gatunków należących do rodzaju *Campylobacter*,

wytwarzały katalazę, choć w niektórych przypadkach reakcja z nadtlenkiem wodoru była słabo widoczna. Ponadto szczepy te, tak jak typowe szczepy *C. jejuni*, hydrolizowały hipuran, ale w odróżnieniu od nich nie posiadały zdolności redukcji azotanów do azotynów, a także wykazywały większą wrażliwość na działanie cefalotyny i polimyksyny. Uwzględniając także różnice genotypowe wykazane podczas hybrydyzacji DNA-DNA, w 1988 roku zaproponowano nową jednostkę taksonomiczną – *C. jejuni* subsp. *doylei* [34, 45].

W 1991 roku do rodzaju *Campylobacter* dołączono nowy gatunek: *C. upsaliensis*, rok później *C. helveticus*, a w 1993 roku *C. showae* [39, 44, 10].

Na uwagę zasługuje również taksonomia *C. fetus*. Gatunek ten powoduje sporadyczne infekcje oportunistyczne, zwykle o ciężkim przebiegu, pod postacią bakteriemii lub zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, u pacjentów ze skrajnych grup wiekowych, a także u kobiet w ciąży. W obrębie tego gatunku wyróżniamy dwa podgatunki: *C. fetus* subsp. *fetus* i *C. fetus* subsp. *veneralis* [55, 21, 1]. Zakażenia u ludzi najczęściej powoduje pierwszy podgatunek, drugi zaś jest przyczyną kampylobakteriozy narządów płciowych bydląt i choć był już izolowany od ludzi, jego znaczenie kliniczne nie jest wyjaśnione [2, 49]. W obrębie tych dwóch podgatunków, na podstawie różnic w budowie lipopolisacharydu i składu białek powierzchniowych (*surface layer protein*, SLP), wyróżniamy serotypy A i B. *C. fetus* subsp. *veneralis* jest zawsze serotypu A, a *C. fetus* subsp. *fetus* może być zarówno serotypu A jak i B, rzadko obu (AB) [29, 9].

W 1984 roku *C. fetus* został po raz pierwszy wyizolowany także od gadów, najpierw z odchodów żółwia przechowywanego w warunkach domowych, a następnie także od zdrowego węża z gatunku *Heterodon nasicus* oraz z kału o luźnej konsystencji od tracącej na wadze jaszczurki z gatunku *Tiliqua nigrolutea*. Badając różnorodność genetyczną *C. fetus* w obrębie podgatunków (*C. fetus* subsp. *fetus* i *C. fetus* subsp. *veneralis*) oraz serotypów (A i B), poprzez wykorzystanie takich metod jak: losowa amplifikacja polimorficznego DNA (*Random Amplification of Polymorphic DNA*, RAPD), elektroforezy DNA w zmiennym polu elektrycznym (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*, PFGE) oraz hybrydyzacja DNA-DNA, a także uwzględniając źródła izolowanych szczepów, wykazano znaczne różnice pomiędzy szczepami izolowanymi od ssaków i gadów, istotnie większe aniżeli w przypadku różnic pomiędzy podgatunkami i serotypami, wskazując tym samym na odmienne pochodzenie genetyczne szczepów izolowanych od gadów [18, 48]. W 2004 roku odnotowano pierwszy przypadek zakażenia u człowieka szczepem *C. fetus* posiadającym markery charakterystyczne dla szczepów izolowanych od gadów [50]. W późniejszych latach odnotowano kolejne przypadki zakażeń u ludzi, a szczepy je powodujące określono mianem *C. fetus*-podobne (*C. fetus*-

-like). Stąd w 2013 roku, uwzględniając szczegółową charakterystykę genotypową i fenotypową tych szczepów, wykazano ich powiązanie z gatunkiem *C. fetus* oraz wyraźne odróżnienie od obecnie znanych podgatunków i ustanowiono nową jednostkę taksonomiczną – *C. fetus* subsp. *testudinum* [35, 11].

Na podstawie rybotypowania drobnoustrojów dokonano reklasyfikacji niektórych gatunków: *Wolinella curva* włączono do rodzaju *Campylobacter* jako *C. curvus* (znany także jako *C. curva*), *Wolinella rectus* jako *C. rectus* (znany jako *C. recta*), także *Bacteroides gracilis* został włączony do rodzaju *Campylobacter* jako *C. gracilis* [53, 51]. W 1991 roku niektóre gatunki, dotychczas należące do rodzaju *Campylobacter*, zostały przeniesione do nowo utworzonych rodzajów: *Arcobacter* i *Helicobacter*. Reklasyfikacji do *Arcobacter* uległy gatunki: *C. cryaerophila* (obecnie *A. cryaerophila*) oraz *C. nitrofigilis* (obecnie *A. nitrofigilis*). Do rodzaju *Helicobacter* oprócz *C. pylori* (obecnie *H. pylori*), zostały włączone gatunki: *C. fennelliae* (obecnie *H. fennelliae*), a także *C. cinaedi* (obecnie *H. cinaedi*) [53].

W kolejnych latach rodzaj *Campylobacter* został wzbogacony o kolejne gatunki, m.in. w 2000 roku z kału pracowników rzeźni bez objawów infekcji wyizolowano nowy gatunek *C. lanienae* [28].

Zmiany w taksonomii rodzaju *Campylobacter* zostały przeprowadzone w oparciu o analizę sekwencji podjednostki 16S rybosomalnego RNA (rRNA). Na tej podstawie *Campylobacter* spp. został umiejscowiony w klasie VI rRNA tzw. ϵ -*Proteobacteria*, która została podzielona na trzy grupy: I – *Campylobacter* oraz *Bacteroides ureolyticus*, II – *Arcobacter*, III – *Helicobacter* oraz *Wolinella succinogenes*. Ze względu na wysoką homologię rRNA grupa I i II utworzyły rodzinę *Campylobacteriaceae*.

Obecnie systematyka *Campylobacter* spp. jest następująca:

Dział: *Proteobacteria*
Klasa: ϵ -*Proteobacteria*
Rząd: *Campylobacterales*
Rodzina: *Campylobacteraceae*
Rodzaj: *Campylobacter* [47].

W 2006 roku rodzaj *Campylobacter* liczył 17 gatunków, 6 podgatunków i 3 biowary. Rok później opisano nowy gatunek wyizolowany od żyjących w niewoli, dorosłych osobników żurawi krzykliwych – *C. canadensis* [19]. Trzy lata później wyizolowano od królików *C. cuniculorum* [56], a z drobiu *C. avium* [38]. W tym samym roku Debruyne i wsp., zaproponowali zmodyfikowaną taksonomię szczepów wyizolowanych od ludzi oraz z owoców morza, określanych dotychczas jako *C. lari*-podobnych (*C. lari*-like). Utworzyli dwa podgatunki: *C. lari* subsp. *lari* oraz *C. lari* subsp. *concheus* oraz wyodrębnili nowy gatunek, oksydazo-ujemny i katalazo-dodatni – *C. peloridis* [6]. W 2010 roku do rodzaju *Campylobacter* dołączono *C. volucris* wyizolo-

wany od osobników mewy śmieszki oraz *C. subantarcticus* wyizolowany od dzikich ptaków żyjących w regionie subantarktyki (pingwinów białobrewych i żłotoczubych oraz albatrosów czarnobrewych i szarogłowych) [5].

W 2010 roku dokonano także reklasyfikacji *Bacteroides ureolyticus*, początkowo na *C. ureolyticus* [52]. W 2014 roku wyizolowano od makaków wanderu szczepy, które ze względu na zdolność rozkładu ureazy przypominały *C. ureolyticus*. Wprawdzie analiza sekwencji nukleotydowych genów kodujących podjednostkę 16S rRNA oraz genu *hsp60* potwierdziła ich przynależność do rodzaju *Campylobacter*, jednakże ujawniła znaczące różnice pomiędzy wyhodowanymi szczepami, a wszystkimi dotychczas odkrytymi gatunkami należącymi do tego rodzaju, więc dla nowo odkrytego gatunku zaproponowano nazwę *C. corcagiensis* [26]. W 2011 roku opisano nowy gatunek *C. troglodytis* wyizolowany od dziko żyjących, oswojonych z ludźmi szympanów, a w 2015 *C. iguaniorum* wyizolowany od gadów [23, 15].

3. Podsumowanie

Pałeczki z rodzaju *Campylobacter* stanowią obecnie najczęstszy bakteryjny czynnik etiologiczny zakażeń przewodu pokarmowego u ludzi, zarówno w krajach rozwijających się jak i rozwiniętych, także w krajach Unii Europejskiej. Choć drobnoustroj ten został zauważony już w XIX wieku, głównie jako patogen zwierząt, będący przyczyną poronień w stadach owiec i bydła, jego znaczenie kliniczne zostało docenione niespełna sto lat później wraz z rozwojem metod stosowanych w diagnostyce mikrobiologicznej. Rodzaj *Campylobacter* został wyodrębniony w 1963 roku z rodzaju *Vibrio* i początkowo liczył tylko dwa gatunki – *C. fetus* i *C. bubulus*. Na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat taksonomia tych drobnoustrojów ulegała licznym modyfikacjom. Od 2000 roku do rodzaju *Campylobacter* włączono 13 nowo odkrytych gatunków i 3 podgatunki. Obecnie rodzaj *Campylobacter* został umiejscowiony w klasie ϵ -Proteobacteria, rząd *Campylobacteriales*, rodzina *Campylobacteraceae*. Liczy 27 gatunków, 9 podgatunków i 3 biowary, 19 gatunków jest patogennych dla człowieka, 9 dla zwierząt. Postęp i rozwój mikrobiologicznych technik diagnostycznych pozwoliły na wyizolowanie oraz identyfikację nowych gatunków *Campylobacter*, jednakże sama obecność drobnoustroju nie jest równoznaczna z wystąpieniem zakażenia, stąd znaczenie kliniczne, a także chorobotwórczość dla zwierząt, wielu z nich, zwłaszcza tych zidentyfikowanych po 2007 roku (t.j.: *C. canadensis*, *C. avium*, *C. cuniculorum*, *C. peloridis*, *C. subantarcticus*, *C. troglodytis*, *C. corcagiensis*, *C. iguaniorum*) nie jest jasna i wymaga dalszych badań.

Piśmiennictwo

1. Berg R.L., Jutila J.W., Firehammer B.D.: A revised classification of *Vibrio fetus*. *Am. J. Vet. Res.* **32**, 11–22 (1971)
2. Blaser, M.J.: *Campylobacter fetus* emerging infection and model system for bacterial pathogenesis at mucosal surfaces. *Clin. Infect. Dis.* **27**, 256–258 (1998)
3. Butzler J.P., Dekeyser P., Detrain M., Dehaen F.: Related vibrio in stools. *J. Pediatr.* **82**, 493–495 (1973)
4. Butzler J.P.: *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 868–876 (2004)
5. Debruyne L., Broman T., Bergström S., Olsen B., On S.L.W., Vandamme P.: *Campylobacter volucris* sp. nov., isolated from black-headed gulls (*Larus ridibundus*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 1870–1875 (2010)
6. Debruyne L., On S.L.W., De Brandt E., Vandamme P.: Novel *Campylobacter lari*-like bacteria from humans and molluscs: description of *Campylobacter peloridis* sp. nov., *Campylobacter lari* subsp. *concheus* subsp. nov. and *Campylobacter lari* subsp. *lari* subsp. nov.. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 1126–1132 (2009)
7. Dekeyser P., Gossuin-Detrain M., Butzler J.P., Sternon J.: Acute enteritis due to related vibrio: first positive stool cultures. *J. Infect. Dis.* **125**, 390–392 (1972)
8. Doyle L.P.: A vibrio associated with swine dysentery. *Am. J. Vet. Res.* **5**, 3–5 (1944)
9. Dworkin J., Tummuru M.K.R., Blaser M.J.: Segmental conservation of *sapA* sequences in type B *Campylobacter fetus* cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 15093–15101 (1995)
10. Etoh Y., Dewhirst F.E., Paster B.J., Yamamoto A., Goto N.: *Campylobacter showae* sp. nov., isolated from the human oral cavity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 631–639 (1993)
11. Fitzgerald C., Tu Z.C., Patrick M., Stiles T., Lawson A.J., Santovonia M., Gilbert M.J., van Bergen M., Joyce K., Pruckler J., Stroika S., Duim B., Miller W.G., Loparev V., Sinnige J.C., Fields P.I., Tauxe R.V., Blaser M.J., Wagenaar J.A.: *Campylobacter fetus* subsp. *testudinum* subsp. nov., isolated from humans and reptiles. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**, 2944–2948 (2014)
12. Fox J.G., Chilvers T., Goodwin C.S., Taylor N.S., Edmonds P., Sly L.I., Brenner D.J.: *Campylobacter mustelae* a new species resulting from the elevation of *Campylobacter pylori* subsp. *mustelae* to species status. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**, 301–303 (1989)
13. Gebhart C.J., Ward G.E., Chang K., Kurtz H.J.: *Campylobacter hyointestinalis* (new species) isolated from swine with lesions of proliferative ileitis. *Am. J. Vet. Res.* **44**, 361–367 (1983)
14. Gebhart C.J., Edmonds P., Ward G.E., Kurtz H.J., Brenner D.J.: *Campylobacter hyointestinalis* sp. nov.: a new species of *Campylobacter* found in the intestines of pigs and other animals. *J. Clin. Microbiol.* **21**, 715–720 (1985)
15. Gilbert M.J., Kik M., Miller W.G., Duim B., Wagenaar J.A.: *Campylobacter iguaniorum* sp. nov., isolated from reptiles. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**, 975–982 (2015)
16. Goodwin C.S., Armstrong J.A., Chilvers T., Peters M., Collins M.D., Sly L., McConnel W., Harper W.E.S.: Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**, 397–405 (1989)
17. Grabowska A., Wyszynska A., Jagusztyn-Krynica E.K.: Powrót chorób infekcyjnych: *Campylobacter* – nowy groźny ludzki enteropatogen. *Mikrobiol. Med.* **2**, 8–15 (2004)
18. Harvey S., Greenwood J.R.: Isolation of *Campylobacter fetus* from a pet turtle. *J. Clin. Microbiol.* **21**, 260–261 (1985)
19. Inglis G.D., Hoar B.M., Whiteside D.P., Morck D.W.: *Campylobacter canadensis* sp. nov., from captive whooping cranes in Canada. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 2636–2644 (2007)

20. Jones F.S., Orcutt M., Little R.B.: Vibrios (*V. jejunii*, n.sp.) associated with intestinal disorders in cows and calves. *J. Exp. Med.* **53**, 853–863 (1931)
21. Kahler R.L., Sheldon H.: *Vibrio fetus* infection in man. *New Engl. J. Med.* **262**, 1218–1222 (1960)
22. Kasper G., Dickgiesser N.: Isolation from gastric epithelium of *Campylobacter*-like bacteria that are distinct from "*Campylobacter pyloridis*". *Lancet*, **325**, 111–112 (1985)
23. Kaur T., Singh J., Huffman M.A., Petrželková K.J., Taylor N.S., Xu S., Dewhirst F.E., Paster B.J., Debruyne L., Vandamme P., Fox J.G.: *Campylobacter troglodytis* sp. nov., isolated from feces of human-habituated wild chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) in Tanzania. *Appl. Environ. Microb.* **77**, 2366–2373 (2011)
24. King E.O.: Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related vibrio. *J. Infect. Dis.* **101**, 119–128 (1957)
25. King E.O.: The laboratory recognition of *Vibrio fetus* and a closely related vibrio isolated from cases of human vibriosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **98**, 700–711 (1962)
26. Koziel M., O'Doherty P., Vandamme P., Corcoran G.D., Sleator R.D., Lucey B.: *Campylobacter corcagiensis* sp. nov., isolated from faeces of captive lion-tailed macaques (*Macaca silenus*). *Int. J. Syst. Evol. Microb.* **64**, 2878–2883 (2014)
27. Levy A.J.: A gastro-enteritis outbreak probably due to a bovine strain of *Vibrio*. *Yale J. Biol. Med.* **18**, 243–258 (1946)
28. Logan J.M.J., Burnens A., Linton D., Lawson A.J., Stanley J.: *Campylobacter lanienae* sp. nov., a new species isolated from workers in an abattoir. *Int. J. Sys. Evol. Microb.* **50**, 865–872 (2000)
29. Moran A.P., O'Malley D.T., Kosunen T.U., Helander I.M.: Biochemical characterization of *Campylobacter fetus* lipopolysaccharides. *Infect. Immun.* **62**, 3922–3929 (1994)
30. Neill S.D., Campbell J.N., O'Brien J.J., Weatherup S.T.C., Ellis W.A.: Taxonomic position of *Campylobacter cryaerophila* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**, 342–356 (1985)
31. On S.L.W., Atabay H.I., Corry J.E.L., Harrington C.S., Vandamme P.: Emended description of *Campylobacter sputorum* and revision of its infrasubspecies (biovar) divisions, including *C. sputorum* bv. paraureolyticus, a urease-producing variant from cattle and humans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 195–206 (1998)
32. On S.L.W., Holmes B.: Classification and identification of *Campylobacter* and *Helicobacter* and allied taxa by numerical analysis of phenotypic characters. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**, 374–390 (1995)
33. Owen R.J., Beck A., Borman P.: Restriction endonuclease digest patterns of chromosomal DNA from nitrate-negative *Campylobacter jejuni*-like organisms. *Eur. J. Epidemiol.* **1**, 281–287 (1985)
34. Owen R.J., Dawson C.: DNA base compositions and base sequence relatedness of atypical *Campylobacter jejuni* strains from clinical material. *FEMS Microbiol. Lett.* **35**, 283–287 (1986)
35. Patrick M.E., Gilbert M.J., Blaser M.J., Tauxe R.V., Wagenaar J.A., Fitzgerald C.: Human infections with new subspecies of *Campylobacter fetus*. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 1678–1680 (2013)
36. Roop R.M., Simbert R.M., Johnson J.L., Krieg N.R.: *Campylobacter mucosalis* (Lawson, Leaver, Pettigrew, and Rowland 1981) comb. nov.: emended description. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**, 189–192 (1985)
37. Roop R.M., Simbert R.M., Johnson J.L., Krieg N.R.: DNA homology studies of the catalase-negative campylobacters and *Campylobacter fecalis*, an emended description of *Campylobacter sputorum*, and proposal of the neotype strain of *Campylobacter sputorum*. *Can. J. Microbiol.* **31**, 823–831 (1985)
38. Rossi M., Debruyne L., Zanoni R.G., Manfreda G., Revez J., Vandamme P.: *Campylobacter avium* sp. nov., a hippurate-positive species isolated from poultry. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* **59**, 2364–2369 (2009)
39. Sandstedt K., Ursing J.: Description of *Campylobacter upsaliensis* sp. nov. previously known as the CNW group. *Syst. Appl. Microbiol.* **14**, 39–45 (1991)
40. Sebald M., Véron M.: Base DNA content and classification of vibrios. *Ann. Inst. Pasteur.* **105**, 897–910 (1963)
41. Skirrow M.B.: *Campylobacter enteritis*: a "new" disease. *Br. Med. J.* **2**, 9–11 (1977)
42. Skirrow M.B.: John McFadyean and the centenary of the first isolation of *Campylobacter* species. *Clin. Infect. Dis.* **43**, 1213–1217 (2006)
43. Smith T., Taylor M.S.: Some morphological and biochemical characters of the spirilla (*Vibrio fetus*, n. sp.) associated with disease of the fetal membranes in cattle. *J. Exp. Med.* **30**, 299–311 (1917)
44. Stanley J., Burnens A.P., Linton D., On S.L.W., Costas M., Owen R.J.: *Campylobacter helveticus* sp. nov., a new thermophilic species from domestic animals: characterization, and cloning of a species-specific DNA probe. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 2293–2303 (1992)
45. Steele T.W., Owen R.J.: *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei* subsp. nov., a subspecies of nitrate-negative *Campylobacter* isolated from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**, 316–318 (1988)
46. Steele T.W., Sangster N., Lanser J.A.: DNA relatedness and biochemical features of *Campylobacter* spp. isolated in Central and South Australia. *J. Clin. Microbiol.* **22**, 71–74 (1985)
47. Szweczyk E.M.: *Campylobacter i Helicobacter* (w) Diagnostyka bakteriologiczna, red. E.M. Szweczyk, Wyd. 2, Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2013, s. 162–167
48. Tu Z.C., Eisner W., Kreiswirth B.N., Blaser M.J.: Genetic divergence of *Campylobacter fetus* strains of mammal and reptile origins. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 3334–3340 (2005)
49. Tu Z.C., Gaudreau C., Blaser M.J.: Mechanisms underlying *Campylobacter fetus* pathogenesis in humans: surface-layer protein variation in relapsing infections. *J. Infect. Dis.* **191**, 2082–2089 (2005)
50. Tu Z.C., Zeitlin G., Gagner J.P., Keo T., Hanna B.A., Blaser M.J.: *Campylobacter fetus* of reptile origin as a human pathogen. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 4405–4407 (2004)
51. Vandamme P., Daneshwar M.I., Dewhirst F.E., Paster B.J., Kersters K., Goossens H., Moss C.W.: Chemotaxonomic analyses of *Bacteroides gracilis* and *Bacteroides ureolyticus* and reclassification of *B. gracilis* as *Campylobacter gracilis* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 145–152 (1995)
52. Vandamme P., Debruyne L., De Brandt E., Falsen E.: Reclassification of *Bacteroides ureolyticus* as *Campylobacter ureolyticus* comb. nov., and emended description of the genus *Campylobacter*. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* **60**, 2016–2022 (2010)
53. Vandamme P., Falsen E., Rossau R., Hoste B., Segers P., Tytgat R., De Ley J.: Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**, 88–103 (1991)
54. Vandamme P., On S.L.W.: Recommendations of the Subcommittee on the taxonomy of *Campylobacter* and related bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* **51**, 719–721 (2001)
55. Véron M., Chatelain R.: Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Véron and designation of the neotype strain for the type species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **23**, 122–134 (1973)
56. Zanoni R.G., Debruyne L., Rossi M., Revez J., Vandamme P.: *Campylobacter cuniculorum* sp. nov., from rabbits. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* **59**, 1666–1671 (2009)

Joanna Pawlicka-Kaczorowska^{1*}, Katarzyna Czaczyk¹

¹ Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Wpłynęło w lutym 2016 r.
Zaakceptowano w czerwcu 2016 r.

1. Wstęp. 2. Ogólna charakterystyka klasycznych bakterii propionowych. 2.1. Taksonomia. 2.2. Ekologia. 2.3. Morfologia i metabolizm. 2.4. Wymagania hodowlane. 3. Zastosowanie klasycznych bakterii propionowych. 3.1. Przemysłowe wykorzystanie i kierunki badań. 3.2. Kwas propionowy. 3.2. Witaminy z grupy B. 3.3. Trehaloza. 3.4. Sprężone dieny kwasu linolowego. 3.5. Czynniki bifidogenne. 3.6. Kwas 5-aminolewulinowy. 3.7. Bakteriocyny. 3.8. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe. 3.9. Właściwości probiotyczne. 4. Podsumowanie

Dairy propionibacteria – taxonomy, culture conditions and application

Abstract: The objective of this review paper was to present the current state of knowledge about dairy propionibacteria and demonstrate their potential application in industry. Propionibacteria are Gram-positive, non-spore-forming, non-motile, facultative anaerobic, pleomorphic rods – belonging to the genus *Propionibacterium*. Traditionally, they are used as starters in the manufacture of Swiss-type cheeses. These bacteria produce an interestingly wide range of bioactive compounds, like B group vitamins, trehalose, conjugated linoleic acid, propionic acid, bacteriocins, bifidogenic factors. Furthermore, they are able to improve the health of humans and animals by modulation of gut microbiota, regulation of the immune system, induction of colorectal carcinoma cells apoptosis or alleviation of lactose intolerance. Due to documented probiotic properties and the ability to synthesize functional biomolecules, a growing number of studies focuses on dairy propionibacteria and their utilization as a microbial bioresource.

1. Introduction. 2. General characteristics of dairy propionibacteria. 2.1. Taxonomy. 2.2. Ecology. 2.3. Morphology and metabolism. 2.4. Growth requirements. 3. Application of dairy propionibacteria. 3.1. Industrial applications and research directions. 3.2. Propionic acid. 3.2. B group vitamins. 3.3. Trehalose. 3.4. Conjugated linoleic acid. 3.5. Bifidogenic factors. 3.6. 5-aminolevulinic acid. 3.7. Bacteriocins. 3.8. Antimicrobial properties. 3.9. Probiotic properties. 4. Summary

Słowa kluczowe: kwas propionowy, *Propionibacterium* spp., trehaloza, właściwości probiotyczne, witaminy z grupy B

Key words: B group vitamins, probiotic properties, *Propionibacterium* spp., propionic acid, trehalose

1. Wstęp

Klasyczne bakterie propionowe są drobnoustrojami, które od stuleci mają swoje zastosowanie w przemyśle spożywczym i żywieniu zwierząt. Na początku jednak nie było wiadomo, że to właśnie te mikroorganizmy odpowiedzialne są za przeprowadzanie fermentacji propionowej. Ich istnienie zostało odkryte dopiero około 150 lat temu. Charakteryzowana grupa ma olbrzymi potencjał aplikacyjny, lecz jest mało znana społeczeństwu [98].

Badania dotyczące prozdrowotnych właściwości klasycznych bakterii propionowych związane są z ich możliwościami modulacji składu mikroflory jelitowej. Jak się obecnie uważa mikrobiom układu pokarmowego ma bardzo istotne znaczenie dla funkcjonowania całego organizmu. Klasyczne bakterie propionowe badane są w aspektach projektowania nowej funkcjonalnej żywności, która mogłaby być stosowana prewencyjnie lub leczniczo w walce z wieloma chorobami cywilizacyjnymi np. otyłością, nowotworami [15, 16, 98].

Poznanie szlaków metabolicznych ukrytych w genomie tych interesujących mikroorganizmów predyspo-

nuje je do stosowania ich jako bakteryjnych “fabryk” związków o przemysłowym znaczeniu np. kwasu propionowego, witamin z grupy B, trehalozy, czynników bifidogennych. Prace optymalizacyjne nad bioprocessami prowadzonymi z ich udziałem, wpisują się w koncepcję zielonej chemii, zakładającej zastępowanie toksycznych dla środowiska syntez chemicznych, procesami mikrobiologicznymi [16, 31, 73, 98].

Niniejsza praca ma na celu usystematyzować wiedzę dotyczącą klasycznych bakterii propionowych oraz zaprezentować fakty, które mogą mieć wpływ na ich lepsze zrozumienie i wykorzystanie praktyczne.

2. Ogólna charakterystyka klasycznych bakterii propionowych

2.1. Taksonomia

Historia badań nad klasycznymi bakteriami propionowymi sięga 1861 r., kiedy Pasteur udowodnił, że przebieg procesów dojrzewania serów jest wynikiem aktywności mikroorganizmów. W 1879 r. Fitz opisał przebieg

* Autor korespondencyjny: Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań; tel. 61 848 60 16, e-mail: joannap@up.poznan.pl

fermentacji prowadzonej przez bakterie w serach typu szwajcarskiego. Zaobserwował, że cukier mlekowy (laktoza) jest przekształcany do kwasu propionowego, kwasu octowego i dwutlenku węgla. Na początku XX w., w 1906 r. von Freudenreich i Orla-Jensen po raz pierwszy wyizolowali z sera Emmental bakterie *Propionibacterium freudenreichii* [39, 98]. W 1928 r. van Niel zaklasyfikował bakterie mające zdolność do syntezy kwasu propionowego do oddzielnego, nowego rodzaju *Propionibacterium*. Do nowo utworzonego rodzaju zaliczył osiem gatunków: *P. freudenreichii*, *P. pentosaceum*, *P. peterssonii*, *P. shermanii*, *P. rubrum*, *P. thoenii*, *P. technicum*, *P. jensenii* i jeden podgatunek: *P. jensenii* var. *raffinoseum*. W 1930 r. opisywany rodzaj mikroorganizmu został uwzględniony w 3. edycji Bergey Manual of Determinative Bacteriology. W kolejnych latach Werkman and Kendall podnieśli odmianę *P. jensenii* var. *raffinoseum* do rangi gatunku. Utworzyli dziewiąty gatunek o nazwie: *P. raffinoseum*. Następnie Hitchner, pomiędzy 1932 a 1934 r., zaklasyfikował do rodzaju *Propionibacterium* kolejne dwa gatunki: *P. zeae* i *P. arabinosum*. W 1941 r. Sakaguchi i wsp. zaproponowali jeszcze pięć gatunków: *P. globosum*, *P. amylaceum*, *P. japonicum*, *P. orientum*, *P. coloratum*, i jeden podgatunek: *P. amylaceum* var. *aurantium*. Następnie do 16 gatunków klasyfikowanych w tamtym czasie do klasycznych bakterii propionowych Janoschek dodał kolejne trzy: *P. casei*, *P. pituitosum* i *P. sanguineum*. W 1972 r., Johnson i Cummins na podstawie analizy: budowy peptydoglikanu, składu zasad azotowych budujących nić DNA i podobieństwa wybranych sekwencji nukleotydowych wyznaczyli cztery grupy (gatunki) należące do klasycznych bakterii propionowych: *P. acidipropionici*, *P. freudenreichii*, *P. jensenii* i *P. thoenii*. Utworzona klasyfikacja została uwzględniona w 8. edycji Bergey Manual of Determinative Bacteriology [39]. W kolejnych latach wyizolowano kolejne 2 gatunki, przynależące do grupy klasycznych bakterii propionowych: *P. cyclohexanum*, *P. microaerophilum* [48, 53, 65, 73, 98].

Obecnie pozycja taksonomiczna bakterii propionowych przedstawia się następująco: Typ – Actinobacteria, Klasa – Actinobacteria, Podklasa – Actinobacteridae, Rząd – Actinomycetales, Podrząd – Propionibacterineae, Rodzina – Propionibacteriaceae, Rodzaj – *Propionibacterium* [98]. Umownie bakterie propionowe dzieli się na dwie grupy:

I – „klasyczne” lub „mleczne” [19, 73, 77, 98]

II – „skórne” lub „acnes” [12, 98]

Wyróżnia się 13 gatunków należących do rodzaju *Propionibacterium*, w tym 6 przynależących do grupy nazywanej klasycznymi bakteriami propionowymi. Nazwy gatunków zamieszczono w tabeli I. Najlepiej poznane szczepy należące do mlecznych bakterii propionowych to: *P. freudenreichii*, *P. acidipropionici*, *P. jensenii* i *P. thoenii*.

Tabela I
Gatunki należące do rodzaju *Propionibacterium*

Klasyczne bakterie propionowe	Skórne bakterie propionowe
<i>P. acidipropionici</i>	<i>P. acidifaciens</i>
<i>P. freudenreichii</i>	<i>P. acnes</i>
<i>P. jensenii</i>	<i>P. australiensis</i>
<i>P. thoenii</i>	<i>P. avidum</i>
	<i>P. granulosum</i>
<i>P. cyclohexanum</i> *	<i>P. humerusii</i>
<i>P. microaerophilum</i> *	<i>P. propionicus</i>

* Gatunki, których typowym siedliskiem nie jest mleko, ani jego przetwory; należące jednak do klasycznych bakterii propionowych. Opracowanie własne na podst.: [73, 77, 86, 98]

Tabela II
Wybrane cechy biochemiczne gatunków należących do rodzaju *Propionibacterium*

Mikroorganizm	Produkcja katalazy	Fermentacja laktozy	Redukcja azotanów
<i>P. acidipropionici</i>	+/-	+	+
<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>freudenreichii</i>	+	-	+
<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	+	+	-
<i>P. jensenii</i>	+/-	+/-	-
<i>P. thoenii</i>	+	-/+	-
<i>P. cyclohexanum</i>	-	+	-
<i>P. microaerophilum</i>	-	-	+

–, 90% szczepów daje wynik negatywny; +, 90% i więcej daje wynik pozytywny; +/-, 10 do 40% daje wynik pozytywny; +/-, 40 do 90% daje wynik pozytywny. Opracowanie własne na podst.: [48, 53, 66]

Do identyfikacji klasycznych bakterii propionowych i ich różnicowania do poziomu rodzaju, gatunku i podgatunku wykorzystywane są metody fenotypowe (analiza cech biochemicznych), metody genotypowe oraz metody instrumentalne. Cechy biochemiczne stosowane w identyfikacji gatunków należących do klasycznych bakterii propionowych zamieszczono w tabeli II. Oficjalnie gatunek *P. freudenreichii* dzieli się na dwa podgatunki: *P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii* i *P. freudenreichii* ssp. *shermanii*. Wyniki uzyskane przez Dalmaso i wsp. [19] wskazują jednak na występowanie czterech podgatunków gatunku *P. freudenreichii*: *freudenreichii*, *shermanii* i „pheno+” i „pheno-”, różniących się między sobą zdolnością do utylizacji laktozy i azotanów (tab. III) [19].

Genotypowanie *Propionibacterium* spp. umożliwiło badanie różnic molekularnych i struktury populacyjnej opisywanej grupy bakterii. Wykorzystywano również techniki bazujące na hybrydyzacji kwasów nukleinowych badanych mikroorganizmów [39, 68].

W typowaniu klasycznych bakterii propionowych stosowano różne metody oparte na łańcuchowej reak-

Tabela III
Cechy biochemiczne nowopropionowanych podgatunków
dla gatunku *Propionibacterium freudenreichii*

Podgatunek	Fermentacja laktozy	Redukcja azotanów
<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>freudenreichii</i>	–	+
<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>	+	–
<i>P. freudenreichii</i> „pheno+”	+	+
<i>P. freudenreichii</i> „pheno–”	–	–

Opracowanie własne na podst.: [19, 73]

cji polimerazy – PCR (Polymerase Chain Reaction) np. MLST (Multilocus Sequence Typing), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis), qPCR (Quantitative PCR), RT-qPCR (Reverse Transcription Quantitative PCR) [19, 31, 68, 93].

Z analizy sekwencji genów 16S rRNA wynika, że *P. cyclohexanicum* jest spokrewniony z *P. freudenreichii*, podczas gdy *P. microaerophilum* wykazuje filogenetyczne pokrewieństwo do szczepu *P. acidipropionici* [48, 59, 61]. W ostatnich latach zsekwencjonowano całe genomy: *P. acnes*, *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* CIRM-BIA^T, *P. freudenreichii* ssp. *freudenreichii* DSM 20271^T i *P. acidipropionici* [12, 31, 44, 64]. Bakterie z rodzaju *Propionibacterium* charakteryzują się wysokim udziałem molowym par G+C (guaniny i cytozyny) w materiale genetycznym (53–68%), który w komórkach występuje w postaci chromosomu bakteryjnego oraz plazmidów [31, 73].

Alternatywę od ww. metod identyfikacji *Propionibacterium* spp. stanowią nowoczesne metody instrumentalne np. spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) czy jonizacja próbki połączona z pomiarem jej masy w spektrometrze masowym (MALDI-TOF MS) [26, 27, 93].

2.2. Ekologia

Typowym siedliskiem występowania *P. acidipropionici*, *P. freudenreichii*, *P. jensenii*, *P. thoenii* są zwierzęta gospodarskie (przeżuwacze np. bydło), mleko oraz jego przetwory. W serach typu szwajcarskiego (Emmental, Leerdammer©), w trakcie dojrzewania masy serowej osiągnięta jest duża gęstość komórek *P. freudenreichii*, na poziomie 10⁹ jtk/g. Klasyczne bakterie propionowe izolowane są również z kiszonek [10, 19, 31, 66, 86].

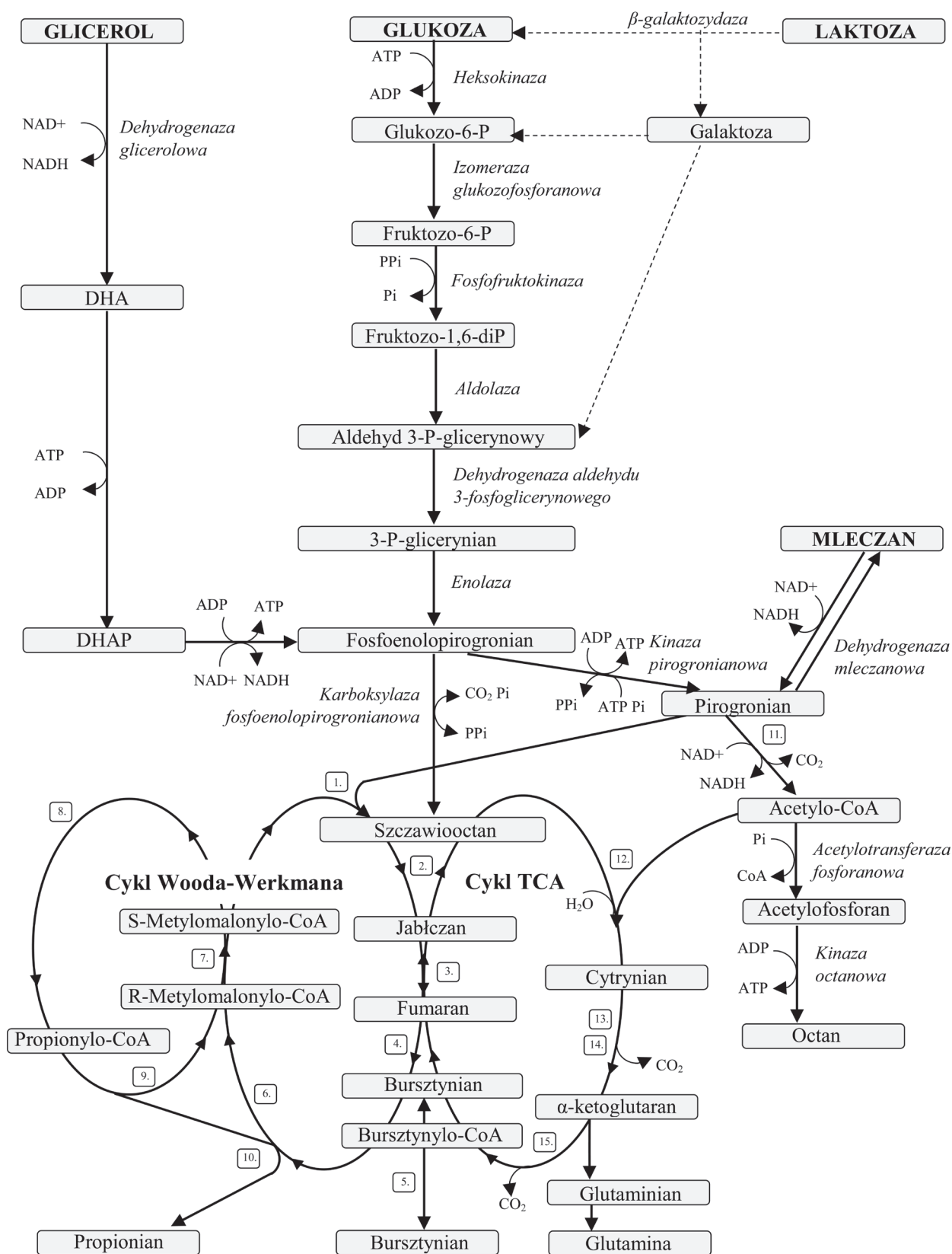
Gatunki *P. cyclohexanicum*, *P. microaerophilum* pochodzą z nowych biotopów niezwiązanych ze środowiskiem mleczarskim. *P. cyclohexanicum* wyizolowano z zepsutego soku z pomarańczy, natomiast *P. microaerophilum* wyizolowano ze ścieków po produkcji oliwy z oliwek [48, 53].

2.3. Morfologia i metabolizm

Klasyczne bakterie propionowe są to Gram-dodatnie, nieprzetrwalnikujące, niewykazujące zdolności do ruchu, względnie beztlenowe pałeczki. W obrazie mikroskopowym opisywane bakterie propionowe obserwuje się jako komórki występujące pojedynczo, w skupiskach lub łańcuszkach. Typowym zjawiskiem dla tych bakterii jest zmienność kształtów komórek (tzw. pleomorfizm). Mogą one przybierać kształty od bardzo drobnych i krótkich pałeczek (w warunkach beztlenowych), po twory kształtem przypominające litery Y lub V (w obecności tlenu) [66, 73].

Poszczególne gatunki zaliczane do klasycznych bakterii różnią się właściwościami biochemicznymi. Niektórzy przedstawiciele rodzaju *Propionibacterium* (*P. freudenreichii* i *P. thoenii*) wytwarzają katalazę, odpowiedzialną za proces rozkładu nadtlenu wodoru, co jest cechą nietypową dla bakterii Gram-dodatnich (tab. II) [48, 53, 66, 73]. Klasyczne bakterie propionowe wytwarzają również wewnątrzkomórkowe lipazy wykazujące aktywność w stosunku trójglicerydów mleka oraz enzymy proteolityczne uczestniczące w katabolizmie np. izoleucyny, leucyny czy proliny [10, 25, 61, 97]. Główny metabolit wytwarzany przez klasyczne bakterie propionowe – kwas propionowy, powstaje na drodze fermentacji propionowej. Pozostałymi charakterystycznymi produktami tej fermentacji są kwas octowy, kwas bursztynowy i dwutlenek węgla (Rys. 1). Należy podkreślić, że klasyczne bakterie propionowe (choć nie wszyscy przedstawiciele) potrafią wykorzystywać jako źródło węgla oprócz np. glukozy, glicerolu czy kwasu mlekowego również laktozę. Laktoza występuje w dużych ilościach (~50 g/l) w mleku i serwatce. Zdolność do fermentacji laktozy jest szczepozależna i wynika z obecności genu *Lac*, odpowiedzialnego za syntezę enzymu – β -galaktozydazy [98].

W komórce substrat może zostać włączony do następujących szlaków przemian: Embdena-Meyerhofa-Parnasa, pentozofosforanowego lub Entnera-Doudoroffa. Na podanych szlakach dochodzi do przekształcenia substratu w pirogronian [61, 71, 98]. Kwas propionowy jest produkowany na drodze redukcji pirogronianu. Zaangażowanych jest w ten proces wiele reakcji chemicznych składających się na cykl Wooda-Werkmana. W pierwszym etapie, w wyniku transkarboksylacji z pirogronianu powstaje kwas szczawiooctowy. Na drodze redukcji szczawiooctan jest przekształcany w jabłczan. Następnie z jabłczanu powstaje fumaran, który przekształcany jest w bursztynian. W końcowym etapie przemian z kwasu bursztynowego powstaje kwas propionowy [22, 71, 98]. Szlaki przemian oraz enzymy biorące udział w fermentacji propionowej zostały zamieszczone na Rys. 1. Teoretycznie, z 1 mola glukozy powstają 4/3 mola kwasu propionowego (C3),



Rys. 1. Przebieg fermentacji propionowej prowadzonej przez *Propionibacterium* spp., w hodowlach na glukozie, glicerolu, laktozie lub mleczanie (kwasie mlekowym); opracowanie własne na podstawie: [22, 31, 61, 71, 86]

(- - -) – linią przerywaną zaznaczono szlaki metaboliczne dotyczące konwersji laktozy. Nie wszyscy przedstawiciele rodzaju *Propionibacterium* mają zdolność do utylizacji laktozy

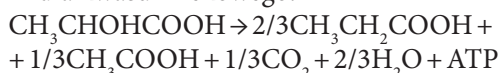
1. transkARBOKSYLAZA zależna od witaminy B₇, 2. dehydrogenaza jablczanowa, 3. hydrataza fumarowa, 4. dehydrogenaza bursztynianowa, 5. syntaza bursztynylo-CoA, 6. mutaza metylomalonylo-CoA zależna od witaminy B₁₂, 7. epimeraza metylomalonylo-CoA, 8. karboksylaza metylomalonylo-CoA, 9. karboksylaza propionylo-CoA, 10. CoA-transferaza propionianowa, 11. dehydrogenaza pirogronianowa, 12. syntaza cytrynianowa, 13. akonitaza, 14. dehydrogenaza izocytrynianowa, 15. dehydrogenaza α-ketoglutaranowa

2/3 mola kwasu octowego (C2) i 2/3 mola CO₂. Natomiast z 1 mola kwasu mlekowego powstaje 2/3 mola kwasu propionowego (C3), 1/3 mola kwasu octowego (C2) oraz 1/3 mola CO₂. Wyższy zysk energetyczny bakterie z rodzaju *Propionibacterium* osiągają na drodze fermentacji cukrów prostych niż kwasu mlekowego. W zależności od zastosowanego substratu przebieg fermentacji propionowej można zapisać następującymi równaniami chemicznymi:

– dla glukozy:



– dla kwasu mlekowego:



Praktycznie wydajności tych procesów są niższe, z powodu powstawania biomasy bakteryjnej [61, 71, 98].

2.4. Wymagania hodowlane

Uznaje się, że klasyczne bakterie propionowe mogą rozwijać się w szerokim zakresie temperatur od 15°C do 40°C, a także w temperaturach chłodniczych do 3,8°C, choć zdolność do rozwoju w tak niskich temperaturach jest szczepozależna [20, 73]. Zaobserwowano, że szczepy wykazujące wzrost w niższych temperaturach produkują w tych warunkach więcej CO₂. Bakterie propionowe tolerują szeroki zakres pH od 4,5 do 8,5. Jednak za optymalne warunki wzrostu uznaje się temperaturę ok. 30°C oraz pH ~7 [16, 67].

Propionibacterium spp. charakteryzowane są jako względne beztlenowce, dlatego w wielu eksperymentach jednym z etapów przygotowania pożywki jest jej przegazowywanie np. N₂ lub CO₂, celem usunięcia O₂ ze środowiska hodowli [47]. W zależności jednak od ukierunkowania fermentacji *Propionibacterium* spp. na konkretny metabolit wymagane są różne warunki gazowe np. maksymalną wydajność produkcji kwasu propionowego uzyskiwano w warunkach bezwzględnie beztlenowych, w przeciwieństwie do hodowli ukierunkowanych na produkcję witaminę B₁₂, gdzie najwyższe stężenia uzyskiwano w warunkach tlenowych [75].

Na wzrost bakterii z rodzaju *Propionibacterium* ma również wpływ aktywność wody (Aw) oraz intensywność światła. Zatrzymanie metabolizmu opisywanych bakterii ma miejsce, gdy wartość Aw jest mniejsza/równa 0,955 lub intensywność światła jest wyższa niż 60 × 10² erg/m² (2000–2500 Lx) [51]. Klasyczne bakterie propionowe wykazują dużą tolerancję na wysokie zasolenie (do 7,6% NaCl), obecność soli żółci czy procesy zamrażania-rozmrażania [16].

W literaturze znaleźć można różne składy pożywek stosowane do izolacji bakterii propionowych ze środowiska [14, 69, 78]. Istnieje również możliwość zakupu dostępnych komercyjnie podłoży umożliwia-

jających wzrost bakterii propionowych np. Pal Propio-bac® medium. W hodowlach *Propionibacterium* spp. najczęściej stosowanymi źródłami węgla są: glukoza, glicerol, laktoza, kwas mlekowy lub jego sole [14, 31, 38, 67, 72, 98, 99]. W badaniach prowadzonych na różnych szczepach *Propionibacterium* jako pożywki do hodowli stosowane są także mleko lub serwatka poddane wcześniejszej fermentacji przez bakterie fermentacji mlekowej, które z laktozy biosyntetyzują kwas mlekowy [31]. Stwierdzono, że klasyczne bakterie propionowe w obecności cukrów i mleczanów w pożywce, najpierw jako substrat metabolizują kwas mlekowy [61, 70]. Jako źródło azotu stosowane są sole amonowe, aminy, aminokwasy lub peptydy. Do wzrostu potrzebują również soli mineralnych (jonów kobaltu, magnezu, manganu, miedzi, żelaza) oraz witamin. Bakterie należące do rodzaju *Propionibacterium* wymagają dodatku pantotenianu oraz biotyny. W hodowli niektórych szczepów należy stosować tiaminę lub kwas p-aminobenzoowy. Pożywki syntetyczne wzbogacane są często w hydrolizaty kazeiny lub drożdży, celem dostarczenia odpowiednich związków stymulujących *Propionibacterium* spp. do wzrostu [9, 31, 50, 98].

W celu ograniczenia wzrostu innych bakterii do pożywek stosowany jest dodatek soli litu, kadmu, arsenu czy antybiotyków [50, 88, 98]. Problem stanowi długi okres wzrostu tych bakterii na podłożach stałych, aby otrzymać kolonie np. wymagane do wyznaczania liczebności oznaczanej metodą płytkową, hodowle trwają ponad 6 dni [10, 98].

3. Zastosowanie klasycznych bakterii propionowych

3.1. Przemysłowe wykorzystanie i kierunki badań

Klasyczne bakterie propionowe posiadają długą historię stosowania w przemyśle rolno-spożywczym. Stosowane są w przemyśle paszowym do wytwarzania kiszzonek, suplementów witaminowo-białkowych i fermentowanego mleka dla zwierząt gospodarskich np. bydła [10, 21, 35, 51, 72]. W serowarstwie bakterie z rodzaju *Propionibacterium*, w szczególności gatunek: *P. freudenreichii*, używane są jako kultury starterowe, do produkcji twardych serów podpuszczkowych, tj. sery szwajcarskie: Emmental, Gruyère, Appenzeller, Raclettes; sery francuskie: Comté; sery dunskie: Leerdammer, Maasdammer; sery norweskie: Jarlsberg. W drugiej fazie dojrzewania odpowiadają za proces oczkowania oraz wytworzenie właściwego aromatu produktu końcowego [55, 61, 65, 73, 97].

Wybrane gatunki zostały wpisane na listę względnego domniemania bezpieczeństwa QPS (Qualified Presumption of Safety) Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności EFSA (European Food Safety Authority)

oraz posiadają status GRAS (Generally Recognized As Safe) przyznawany przez Federalny Urząd Żywności i Leków Stanów Zjednoczonych FDA (Food and Drug Administration). EFSA i FDA zajmują się gromadzeniem i analizą danych naukowych dotyczących bezpieczeństwa żywności i pasz [28, 62]

Bezpieczeństwo stosowania opisywanej grupy bakterii umożliwia badania nad nowymi produktami spożywczymi powstającymi przy wykorzystaniu klasycznych bakterii propionowych. Wyniki wskazują, że dodatek *Propionibacterium* spp. korzystnie wpływa na

jakość końcową projektowanych artykułów, poprzez podniesienie bezpieczeństwa mikrobiologicznego oraz wniesienie do ich składu substancji o działaniu prozdrowotnym [6, 29, 85]. Na skalę przemysłową *Propionibacterium* spp. stosowane są do produkcji witaminy B₁₂, której synteza chemiczna jest zbyt kosztowna [47, 72]. Klasyczne bakterie propionowe potrafią również wytwarzać inne związki o przemysłowym znaczeniu np. kwas propionowy, witaminę B₂, foliany, trehalozę, sprzężony kwas linolowy, czynniki bifidogenne, kwas 5-aminolewulinowy, bakteriocyny (tab. IV).

Tabela IV
Związki bioaktywne produkowane przez klasyczne bakterie propionowe

Substancja bioaktywna	Funkcje / zastosowanie	Literatura
Kwas propionowy	– konserwacja żywności i pasz	[4, 15, 16, 24, 45, 73, 79, 89, 98]
	– działanie przeciwgrzybicze	
	– substrat dla przemysłu chemicznego	
	– potencjalne zastosowanie w profilaktyce i leczeniu chorób cywilizacyjnych np. nowotworów, otyłości	
	– wpływ na proces powstawania cholesterolu	
Witamina B ₁₂	– koenzym (witamina egzogenna)	[45, 58, 73, 74, 75, 87]
	– udział w wielu kluczowych reakcjach metabolicznych	
	– utrzymanie homeostazy w organizmie	
Witamina B ₉	– koenzym (witamina egzogenna)	[7, 18, 54, 73, 92]
	– udział w wielu kluczowych reakcjach metabolicznych	
	– utrzymanie homeostazy w organizmie	
Witamina B ₂	– koenzym (witamina egzogenna)	[7, 13, 73]
	– udział w wielu kluczowych reakcjach metabolicznych	
	– utrzymanie homeostazy w organizmie	
Trehaloza	– substytut sacharozy	[14, 23, 37, 78, 81]
	– środek zabezpieczający i stabilizujący (np. enzymy, błony, narządy, produkty spożywcze)	
	– potencjalne zastosowanie w profilaktyce i leczeniu chorób cywilizacyjnych np. osteoporozy oraz chorób degeneracyjnych	
CLA	– potencjalne zastosowanie w profilaktyce i leczeniu chorób cywilizacyjnych np. chorób układu sercowo-naczyniowego, cukrzycy, otyłości, osteoporozy, nowotworów	[9, 76, 91, 95, 98]
	– wpływ na przyrost masy ciała	
	– działanie przeciwdrobnoustrojowe	
DHNA	– czynnik bifidogeny	[32, 40, 98]
	– prekursor witaminy K	
	– potencjalne zastosowanie w profilaktyce i leczeniu osteoporozy	
	– potencjalne zastosowanie w leczeniu alergii	
ACNQ	– czynnik bifidogeny	[40, 96, 98]
	– potencjalne zastosowanie w leczeniu alergii	
ALA	– prekursor porfiryn	[42, 73, 83]
	– leczenie nowotworów	
	– produkcja herbicydów, insektycydów	
	– stymulator wzrostu u roślin	
Bakteriocyny	– działanie bakteriostatyczne i/lub bakteriobójcze	[33, 34, 73, 98]
	– konserwacja żywności	

CLA – sprzężone dieny kwasu linolowego; DHNA – kwas 1,4-dihydroxy-2-naftoesowy; ACNQ – 2-amino-3-karboksy-1,4-naftochinon, ALA – kwas 5-aminolewulinowy

W kolejnych podrozdziałach opisano metabolity, właściwości przeciwdrobnoustrojowe i probiotyczne klasycznych bakterii propionowych, które mają znaczenie dla świata nauki i przemysłu.

3.2. Kwas propionowy

Kwas propionowy i jego sole: wapnia, sodu czy potasu, mają bardzo silne działanie inhibitujące w stosunku do pleśni. Bardzo często są dodawane do żywności oraz pasz dla zwierząt, jako środki konserwujące. Kwas propionowy stosowany jest również przy wytwarzaniu celulozy, plastików, herbicydów, perfum oraz leków (tab. IV) [46, 73]. Dowiedziono, że kwas propionowy wytwarzany przez bakterie propionowe ma właściwości immunostymulujące organizm do walki z komórkami raka żołądka, czy okrężnicy [15, 16, 98]. Udowodniono, że kwas propionowy może indukować apoptozę w komórkach rakowych. Cousin i wsp. [15] wykazali, że ilości kwasu propionowego produkowane przez klasyczne bakterie propionowe są wystarczające, aby wywołać śmierć różnych linii komórek nowotworowych jelit. Badacze zaprojektowali produkt spożywczy – napój mleczny, powstały na drodze fermentacji propionowej prowadzonej wyłącznie przez szczep *P. freudenreichii* ITG P9, z przeznaczeniem do stosowania w diecie prewencyjnej, mającej na celu zapobiegać pojawieniu się raka jelit lub wspomagająco w leczeniu tego typu nowotworów [15]. Kwas propionowy wpływa na zwiększenie absorpcji wapnia ze światła jelita [16, 89]. Badania z zastosowaniem radioaktywnych izotopów wykazały, że kwas propionowy może hamować syntezę cholesterolu i kwasów tłuszczowych [24]. Co więcej, udowodniono, że spożywanie kwasu propionowego lub jego soli wapniowych wpływa na zwiększenie stężenia leptyny we krwi – hormonu odpowiedzialnego za regulację pobierania pokarmu oraz równowagę energetyczną w organizmie człowieka. Prowadzone są badania nad wykorzystaniem kwasu propionowego oraz bakterii z rodzaju *Propionibacterium* w walce z otyłością [4, 79].

Obecnie kwas propionowy pozyskiwany jest na drodze procesów petrochemicznych – w 2006 r. roczna światowa produkcja tego związku wynosiła około 350 tys. ton. Ze względu jednak na wysoką cenę procesów chemicznych, stosowanie substratu, który jest surowcem nieodnawialnym, przy dodatkowo rosnącym zainteresowaniu konsumentów produktami naturalnymi i ekologicznymi, coraz więcej uwagi zwraca się na możliwość biosyntezy kwasu propionowego na drodze mikrobiologicznej [46, 72, 73, 90]. W typowej fermentacji okresowej wydajność procesu wynosi ok. 0,4 g/g glukozy, przy końcowym stężeniu kwasu propionowego na poziomie oscylującym w granicach 20 g/l [99]. Próby uzyskania lepszych wydajności procesu i wyższych stężeń końcowych zaowocowały opracowaniem szeregu

nowych bioprocessów oraz pozyskaniem mikroorganizmów o lepszych zdolnościach produkcyjnych [38, 46, 47, 73, 99]. Jiang i wsp. [38] w hodowli okresowo-dolewowej z immobilizowanymi komórkami *P. acidipropionici*, uzyskali stężenie ~135 g/l kwas propionowego [38].

3.3. Witaminy z grupy B

Człowiek nie potrafi sam syntetyzować witamin np. B₁₂, B₉ czy B₂. Substancje te muszą być dostarczane do organizmu z pożywieniem. Dienne zapotrzebowanie dorosłego człowieka na witaminy B₁₂, B₉ i B₂ przedstawiono w tabeli V. Naturalnymi producentami tych witamin są bakterie z rodzaju *Propionibacterium*. Klasyczne bakterie propionowe posiadają zdolność do syntezy wybranych witamin z grupy B w ilościach, które pokrywają dzienne zapotrzebowanie ludzkiego organizmu (tab. V) [7, 13, 47, 54, 72, 73, 74, 75].

Tabela V
Dienne zapotrzebowanie dorosłego człowieka na witaminy B₂, B₉ i B₁₂ oraz ilości tych witamin produkowane przez *Propionibacterium* spp.

Witamina	Zalecana dzienna dawka*	Stężenie uzyskiwane przez <i>Propionibacterium</i> spp.	Literatura
B ₁₂	2–3 µg	33–34,8 mg/l	[7, 45, 47]
B ₉	200–400 (600**) µg	211,3 µg/l	[7, 54, 92]
B ₂	~1,2 mg	~3,2 mg/l	[7, 13, 73]

* dla dorosłego człowieka; ** dla kobiet w ciąży

Witamina B₁₂ jest wymagana przez organizm ludzki do prawidłowego jego funkcjonowania. Pełni funkcję koenzymu takich enzymów jak: syntaza metioninowa i mutaza metylenomalonylo-CoA. Uczestniczy w wielu reakcjach metabolicznych np. metylacji homocysteiny do metioniny; syntezie DNA i RNA, syntezie erytrocytów w szpiku kostnym, a także bierze udział w powstawaniu i funkcjonowaniu otoczki mielinowej neurocytów oraz w wytwarzaniu neuroprzekazników (tab. IV) [7, 47, 73]. Dostępna komercyjnie witamina B₁₂ otrzymywana jest na drodze procesów mikrobiologicznych z wykorzystaniem między innymi gatunków należących do *Propionibacterium* spp. (Tabela V) [47, 74, 75]. Opisane bakterie, spośród wszystkich poznanych do tej pory naturalnych producentów B₁₂, jako jedyne posiadają status GRAS [45, 73]. Od wielu lat prowadzi się badania mające na celu zwiększenie biosyntezy witaminy B₁₂ przez klasyczne bakterie propionowe. Próby skupiały się na wpływie źródła węgla, soli mineralnych czy prekursorów witaminy B₁₂ [17, 45, 57, 74, 75, 87]. Kośmider i wsp. [45] przy zastosowaniu planu eliminacyjnego Placketta-Burmana oraz planu centralnego kompozycyjnego zbadali wpływ wielu składników

pożywki hodowlanej na produkcję witaminy B₁₂. Prace optymalizacyjne umożliwiły wskazanie składników cechujących się najwyższym wpływem na badany proces i doprowadziły do zwiększenia końcowego stężenia witaminy B₁₂ o 93%, w stosunku do stężenia uzyskiwanego na wyjściowym składzie pożywki [45].

Bakterie z rodzaju *Propionibacterium* syntetyzują również foliany, do których zalicza się około 40 związków. Foliiany są bardzo ważnym składnikiem ludzkiej diety. Związki te zalicza się do witamin z grupy B, rozpuszczalnych w wodzie. Uczestniczą w wielu szlakach metabolicznych, tj. replikacja, naprawa i metylacja DNA, synteza/przekształcenie nukleotydów, witamin, fosfolipidów, aminokwasów. Komórki ssaków nie posiadają zdolności do syntezy folianów, dlatego związki te muszą być spożywane z żywnością lub suplementami diety (tab. IV) [7, 18, 92]. Ich syntetyczną formą jest kwas foliowy (witamina B₉), który dostępny jest w sprzedaży, stosowany jest do fortyfikacji żywności [18, 54, 73, 92]. Kwas foliowy jest jednak słabiej przyswajalny niż naturalne formy tej witaminy. Zdolność do produkcji folianów przez *Propionibacterium* spp. jest szczepozależna. Van Wyk i Britz [92] w hodowli szczepu *P. freudenreichii* J16 uzyskali ponad 200 µg/l folianów (tab. V) [92].

Inną witaminą, którą syntetyzują *Propionibacterium* spp. jest witamina B₂ (ryboflawina). Pomimo, że jest ona obecna w wielu produktach spożywczych: produktach mleczarskich, mięsie, jajach oraz w roślinach zielonych, w populacji ludzi nadal występuje problem awitaminozy powodowany jej zbyt małym spożywaniem (tab. IV). Niedobór witamin B₂ powoduje zaburzenia funkcjonowania układu nerwowego (parestezje, zawroty głowy, osłabienie), krwionośnego (niedokrwistość), osłabienie wzroku, występowanie zaćmy, stany zapalne błon śluzowych np. trądzik; łuszczenie skóry, łzawienie oczu i pęknięcie warg [13, 73]. Burgess i wsp. [13] zaproponowali metodę otrzymywania i selekcji szczepów należących do *Propionibacterium* spp., zdolnych do biosyntezy ryboflawiny. Stresowanie dzikich szczepów analogiem ryboflawiny (rozoflawiną) przyczyniło się do wyselekcjonowania szczepów wytwarzających dużo wyższe ilości witaminy B₂. Najwyższe uzyskiwane stężenie ryboflawiny wynosiło ponad 3 mg/l i były ponad 10-krotnie wyższe od stężenia otrzymanego dla szczepu *P. freudenreichii* B374 przed etapem stresowania (tab. V) [13].

Bakterie propionowe stosowano w pracach nad zwiększeniem zawartości witamin z grupy B w produktach spożywczych. Badano wpływ bakterii propionowych w produkcji sera typu twaróg, którego mikroflorę starterową stanowią wyłącznie bakterie fermentacji mlekowej [51, 100]. Dodatek wpłynął na wzrost zawartości witaminy B₁₂ w masie serowej średnio o 80%, jednocześnie umożliwił uzyskanie twarogu o lepszym smaku, konsystencji i wydłużonym czasie przydatności

do spożycia w porównaniu z kontrolą [51]. Podobne wyniki uzyskano w doświadczeniach nad stosowaniem dodatku *P. jensenii* T118 do kultur bakterii fermentacji mlekowej wykorzystywanych do kiszenia warzyw. Wyniki wskazują, że obecność bakterii z rodzaju *Propionibacterium* zwiększa zawartości B₁₂ i folianów w tego typu produktach [6]. Właściwa selekcja i zastosowanie szczepów należących do klasycznych bakterii propionowych otwiera nowe możliwości suplementacji żywności witaminami, których formy chemiczne naturalnie występują w przyrodzie [54, 73].

3.4. Trehaloza

W latach 60. XX wieku dowiedziono, że klasyczne bakterie propionowe wytwarzają trehalozę. Trehaloza posiada unikatowe właściwości ochrony makromolekuł przed działaniem stresów środowiskowych [37, 81]. Udowodniono, że trehaloza zapobiega agregacji czy tworzeniu patologicznych konformacji białek ludzkich, a tym samym otwiera nowe sposoby walki z takimi chorobami jak: choroba Creutzfeldta-Jakoba, Huntingtona, amyloidoza czy mukowiscydoza [81]. Spożywanie trehalozy może również wywierać korzystny wpływ na stan kości i tym samym może być stosowana w profilaktyce i leczeniu osteoporozy (tab. IV) [37]. Stwierdzono, że bakterie propionowe zwiększają akumulację trehalozy pod wpływem stresów środowiskowych, tj. niska temperatura, zmiany wartości pH czy wysokie ciśnienie osmotyczne [14, 38, 67, 78]. Wewnętrzna komórkowa akumulacja trehalozy przez szczepy należące do klasycznych bakterii propionowych jest zależna od szczepu i warunków hodowli [14]. Deborde i in. (1996) w hodowli szczepu *P. acidipropionici* ATCC 4875 uzyskali 1,52 g/l trehalozy [23]. Ruhal i Choudhury [78] wykazali, że szczep *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* NCIM 5137 jest zdolny do akumulacji trehalozy w ilościach do około 0,4 g/g suchej masy [78].

3.4. Sprzężone dieny kwasu linolowego

Wiele badań dowodzi, że sprzężone dieny kwasu linolowego (CLA) wykazują wszechstronne prozdrowotne działanie, znajdując zastosowanie w walce z takimi chorobami jak: choroby układu sercowo-naczyniowego, miażdżyca, cukrzyca, otyłość, osteoporoza, insulinooporność, stany zapalne i różne typy nowotworów [9, 91]. Bakterie propionowe posiadają izomerazę kwasu linolowego, umożliwiającą wytwarzanie CLA. Szczep *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* JS hodowany na pożywce z dodatkiem kwasu linolowego (LA) jest zdolny przeprowadzać reakcję izomerizacji LA do CLA. Wysokie stężenia CLA uzyskiwano w hodowlach, gdy dodatek LA był na poziomie 2 g/l. Współczynnik konwersji LA do CLA wynosił

wtedy 80–87%. [76, 98]. Wang i wsp. [95] testowali dwa szczepy *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* i *P. freudenreichii* pod względem ich przydatności do wytwarzania CLA na trzech różnych podłożach: De Man-Rogosa-Sharpe (MRS), mleczanowym i odtłuszczonym mleku, suplementowanych olejem ze słonecznika. Do badań wybrali mikroorganizmy stosowane jako kultury starterowe w przemyśle mleczarskim. Badacze wykazali, że oba szczepy posiadają zdolność przekształcania oleju słonecznikowego do CLA, a na uzyskane stężenia miał wpływ zastosowany szczep oraz skład pożywki. Najwyższe stężenie, 78,8 mg/l CLA, uzyskano dla *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* na pożywce MRS [95].

3.5. Czynniki bifidogenne

Czynniki bifidogenne (BGS – bifidogenic growth stimulator) promują wzrost bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*, stymulują ich rozwój w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt, jak również umożliwiają namnożenie tych mikroorganizmów w produktach spożywczych [49]. Właściwości klasycznych bakterii propionowych do stymulacji rozwoju *Bifidobacterium* spp. potwierdzono *in vivo*, przeprowadzając badania na ludziach, sprawdzając wpływ spożycia namnożonej biomasy wybranych szczepów *Propionibacterium*, supernatantu po ich hodowli, jak również czystych preparatów czynników bifidogennych. U wolontariuszy stwierdzono zwiększenie liczby jelitowych *Bifidobacterium* spp., dodatkowo zaobserwowano spadek liczby bakterii z rodzaju *Clostridium* oraz odnotowano przywrócenie równowagi fizjologicznej wypróżnień [98] (tab. IV). Związki o właściwościach bifidogennych wyizolowane z hodowli klasycznych bakterii propionowych zidentyfikowano jako: 2-amino-3-karboksy-1,4-naftochinon (ACNQ) i kwas 1,4-dihydroxy-2-naftoesowy (DHNA – prekursor witaminy K). ACNQ i DHNA pełnią funkcję mediatorów pośredniczących w procesach regeneracji NADP u bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* [96, 98]. ACNQ i DHNA mają również potencjał jako związki przeciw alergiczne [40]. Optymalizacja parametrów prowadzenia hodowli pozwala na zwiększenie produkcji tych związków przez *Propionibacterium* spp. W hodowlach *P. freudenreichii* ET-3 prowadzonych w zmiennych warunkach gazowych (na początku – warunki beztlenowe, a następnie tlenowe) uzyskano 0,23 mM DHNA. Uzyskane stężenie DHNA było 1,3 razy wyższe, od stężenia DHNA uzyskanego w hodowlach całkowicie beztlenowych [32].

3.6. Kwas 5-aminolewulinowy

Bakterie z rodzaju *Propionibacterium* syntetyzują kwas 5-aminolewulinowy (ALA), pierwszy stabilny intermediat w szlaku biosyntezy pochodnych tetra-

rolu (hemu, chlorofilii i witaminy B₁₂) [73, 83]. ALA może być wykorzystany np. w rolnictwie do produkcji selektywnych i biodergadawalnych herbicydów, bezpiecznych dla roślin uprawnych oraz nietoksyczny dla zwierząt i ludzi. Działa jako stymulator wzrostu na wiele roślin uprawnych oraz dodatkowo zwiększa ich wytrzymałość na stresy środowiskowe (niskie temperatury, wysokie zasolenie) [83]. ALA znalazł również zastosowanie w medycynie jako środek używany w terapii fotodynamicznej stosowanej w leczeniu chorób nowotworowych (tab. IV) [42]. Chemiczna synteza tego związku jest niewydajna i zbyt kosztowna, co hamuje jego komercyjne wykorzystanie. Wiele nadziei wiąże się z biosyntezą tego związku przez żywe organizmy. Kiatpapan i wsp. [42] w hodowli szczepu *P. acidipropionici* TISTR442, suplementowanej glicyną, uzyskali 405 mg/l ALA [42]. Inna grupa badaczy, Sonhom i wsp. [83], uzyskała dużo wyższe stężenie ALA, równe 7,7 g/l, w tym przypadku biosyntezę ALA prowadzono dla szczepu *P. acidipropionici*, w hodowlach zawierających jako źródło węgla 3% mleczanu sodu, dodatek glicerolu i glukozy [83]. Wyniki uzyskane dla hodowli bakterii z rodzaju *Propionibacterium* wydają się obiecujące i najprawdopodobniej pozwolą na obniżenie ceny tego związku, co przełoży się na komercjalizację produktów powstałych na jego bazie [31, 83].

3.7. Bakteriocyny

Bakterie propionowe potrafią syntetyzować bakteriocyny, wśród których wymienić należy: propionicynę PLG-1, GBZ-1, T1, jenseninę G oraz treonicynę 447 wytwarzane przez *P. thoenii*; propionicynę SM1, SM2, jenseninę G oraz białka aktywowane enzymatycznie tzw. PAMP (Protease-Activated Antimicrobial Peptides) wytwarzane przez *P. jensenii*; propionicynę F wytwarzaną przez *P. freudenreichii* [33, 34, 73, 98]. Metabolity te posiadają szeroki zakres aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec Gram-dodatnich i Gram-ujemnych bakterii, drożdży oraz pleśni [33, 34, 73, 98]. Stwierdzono, że jensenina G wykazuje działanie antibakteryjne, wpływające na rozwój przetrwalników *Clostridium botulinum* typu A, B i E. Propionicyna GBZ-1 i thoenicyna 447 hamują rozwój innych klasycznych bakterii fermentacji propionowej oraz chorobotwórczego szczepu *P. acnes*. Jednak związki te wykazują silniejsze oddziaływanie w stosunku do bakterii fermentacji mlekowej np. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* ATCC 4797, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LMG 13551, niż wobec innych gatunków należących do rodzaju *Propionibacterium* [33]. Wydaje się, że znajdują one zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym np. przy opracowywaniu preparatów przeciwtwardzikowych oraz w przemyśle spożywczym jako czynniki hamujące rozwój niepożądaną mikroflory w produktach

spożywczych jak i na poziomie układu pokarmowego poprzez spożywanie nowych funkcjonalnych produktów lub jako czynniki przeciw bakteriom fermentacji mlekowej, zapobiegające przekwaszaniu fermentowanych produktów mleczarskich, tj. jogurty, sery [33, 73].

3.8. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe

Liczne badania wskazują, że klasyczne bakterie propionowe wykazują właściwości przeciwdrobnoustrojowe w stosunku do wielu grup mikroorganizmów. Za działanie antagonistyczne odpowiadają metabolity wytwarzane przez *Propionibacterium* spp., między innymi: kwas propionowy i bakteriocyny [5, 11, 21, 30, 33, 43, 51, 60, 82, 84]. Związki te są alternatywą dla stosowania chemicznych konserwantów przy zabezpieczaniu żywności przed psuciem. Wykazano, że dodatek suszonej serwatki propionowej (serwatki po fermentacji propionowej) wpływa hamująco na rozwój pleśni oraz *Bacillus* sp. podczas przechowywania chleba mieszanego, żytniego i typu Graham [51]. Suomalainen i Mäyrä-Mäkinen [84] testując wpływ kultur mieszanych bakterii mlekowych i bakterii propionowych na jakość zakwasu chlebowego oraz jakość i trwałość chleba potwierdzili, że kombinacja dwóch szczepów *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* JS i *Lactobacillus rhamnosus* LC70S skutecznie chroni chleb przed rozwojem pleśni, drożdży oraz bakterii z rodzaju *Bacillus*. Pozwala to na zastępowanie chemicznych środków konserwujących np. kwasu benzoowego i sorbowego oraz ich soli przez odpowiednio dobrane do wytwarzania zakwasu szczepy. Badacze stwierdzili, że kombinacja metabolitów naturalnie wytwarzanych przez te mikroorganizmy skutecznie hamuje rozwój mikroorganizmów odpowiedzialnych za procesy psucia się pieczywa [84]. Doświadczenia Babuchowskiego i wsp. [6] nad stosowaniem dodatku *P. jensenii* T118 do kultur bakterii fermentacji mlekowej wykorzystywanych do kiszenia warzyw dostarczają informacji o tym, że obecność bakterii z rodzaju *Propionibacterium* wpływa na ograniczenie wzrostu mikroflory niepożądaną w tego typu produktach oraz dodatkowo wywiera pozytywny wpływ na ocenę sensoryczną produktu końcowego [6]. Inna grupa badaczy zaproponowała dodatek zliofilizowanego płynu pofermentacyjnego z hodowli *P. thoenii* P-127 do sera Domiati. W doświadczeniu udowodnili, że liofilizat komórek i metabolitów z hodowli pozwala skutecznie przedłużyć trwałość sera oraz wpływa na podniesienie walorów organoleptycznych produktu [85]. Podobne wyniki stosowania *P. thoenii* P-127 jako naturalnego dodatku konserwującego uzyskano przy produkcji sera Kareish [30]. Schwenninger i Meile [82], po przebadaniu 197 szczepów *Propionibacterium* spp. i wielu szczepów należących do rodzaju *Lactobacillus*, opracowali 3 kultury ochronne składające się z:

P. jensenii SM11 i jednego z trzech szczepów *L. paracasei* ssp. *paracasei*: SM20, SM29 oraz SM63. Wybrane przez badaczy kultury ochronne wyróżniały się dużo wyższym inhibującym działaniem przeciw pleśniom i drożdżom niż pozostałe szczepy czy inne kultury mieszane. Z powodzeniem chroniły one przed rozwojem drożdży (*Candida pulcherrima*, *Candida magnoliae*, *Candida parapsilosis* i *Zygosaccharomyces bailii*) w produktach mleczarskich, tj. jogurty i sery, przechowywanych w warunkach chłodniczych [82]. Ponadto, Ekinci i Gurel [29] potwierdzili, że stosowanie *P. jensenii* i *P. thoenii* w połączeniu z komercyjnymi kulturami wpływa korzystnie na jakość końcową jogurtu, wnosząc dodatek prozdrowotnych metabolitów pochodzących z fermentacji propionowej oraz dając możliwość produkcji nowego typu jogurtów [29].

Doświadczenia prowadzone nad przeciwdrobnoustrojowymi właściwościami klasycznych bakterii propionowych przyczyniły się do pojawienia wielu patentów oraz konkretnych, dostępnych komercyjnie na rynku produktów powstałych na bazie opisywanych mikroorganizmów np. HOLDBAC™ YM-B i Microguard (Danisco, DuPont) [5, 8, 11, 35, 43, 58, 60]. Produkt HOLDBAC™ YM-B – wcześniejsza nazwa „Bio Profit”, stanowi liofilizowaną kulturę mieszaną: *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* i *Lactobacillus rhamnosus* wykazują podwyższoną aktywność przeciw pleśniom, drożdżom [30, 58, 82]. Innym przykładem jest Microguard, otrzymywany na drodze fermentacji odtłuszczonego mleka przez *P. freudenreichii* ssp. *shermanii*. Został on dopuszczony do użytku przez FDA. Produkt ten stosowany jest jako konserwant serów typu „cottage”, innych przetworów mleczarskich oraz znajduje zastosowanie w wielu innych gałęziach przemysłu spożywczego do wyrobu np. pieczywa, wędlin, dresingów, zup, sałatek owocowych. Działa hamująco na rozwój bakterii Gram-ujemnych oraz niektórych pleśni i drożdży [3, 30].

Badania przeprowadzone na ludziach potwierdzają korzystne działanie przeciwdrobnoustrojowe wybranych szczepów należących do *Propionibacterium* spp. Spożywanie *P. freudenreichii* ET-3 wpływa na skład mikrobiomu układu pokarmowego, poprzez wywołanie spadku liczebności np. bakterii *Clostridium perfringens* czy *Bacteroides* spp. [16]. Hatakka i wsp. [36] wykazali, że spożycie sera zawierającego szczepy bakterii: *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* JS, *Lactobacillus rhamnosus* GG i LC705, wpływa u starszych osób na redukcję w jamie ustnej liczebności drożdży, w szczególności z rodzaju *Candida* [36].

3.9. Właściwości probiotyczne

Probiotyki definiuje się jako: „żywe mikroorganizmy, które spożywane w określonych ilościach, wpływają korzystnie na zdrowie gospodarza” (FAO i WHO, 2002).

Obecnie ocena szczepów bakteryjnych pod względem ich potencjału probiotycznego opiera się na sprawdzeniu zgodności z takimi kryteriami jak: 1. bezpieczeństwo stosowania, 2. zdolności do przeżycia w trudnych warunkach technologicznych i panujących w układzie pokarmowym; 3. zdolności adherencji do komórek nabłonka jelitowego; 4. pochodzenie od gospodarza [16, 56]. Namnożona biomasa wybranych szczepów należących do *Propionibacterium* spp. stosowana jest jako probiotyki lub preparaty białkowo-witaminowe dla zwierząt np. bydła, trzody chlewnej, drobiu. Stosowanie tych mikroorganizmów w żywieniu zwierząt wpływa na utrzymanie ich dobrego stanu zdrowia, zwiększenie masy ciała oraz podnosi efektywność wykorzystania paszy [10, 35, 98]. Ponadto, doniesienia naukowe potwierdzają, że badane szczepy należące do klasycznych bakterii propionowych spożywane przez człowieka mogą wpływać korzystnie na jego zdrowie. Bezpieczeństwo stosowania klasycznych bakterii propionowych jest oczywiste, ze względu na fakt spożywania serów typu szwajcarskiego. We Francji w ciągu roku jedna osoba spożywa średnio 4 kg sera Emmental, gdzie zawartość komórek *Propionibacterium* spp. wynosi blisko 10^9 bakterii na 1 g produktu [16]. Dodatkowo, wybrane gatunki najczęściej stosowane w przemyśle rolno-spożywczym posiadają certyfikaty bezpieczeństwa przyznawane przez odpowiednio do tego uprawnione instytucje (FDA i EFSA). Jednym z kryteriów bezpieczeństwa mikroorganizmów jest nieobecność, na elementach niestabilnych, genów odporności na działanie antybiotyków. Klasyczne bakterie propionowe posiadają odporność na niektóre antybiotyki, ale nie są one kodowane na plazmidach. Opisywane bakterie nie posiadają żadnego ze znanych genów kodujących czynniki wirulencji. *Propionibacterium* spp. wykazują odporność na trudne technologiczne i trawienne warunki [1]. Wykazują wysoką przeżywalność w niskim pH i w wysokich stężeniach soli żółci. Klasyczne bakterie propionowe mają zdolność do adherencji do błony śluzowej i komórek nabłonkowych jelit [16, 55, 98].

Istnieje wiele doniesień naukowych potwierdzających ich korzystny wpływ na fizjologię i zdrowie gospodarza, również człowieka. Opisywane mikroorganizmy poprzez wytwarzane przez siebie związki – DHNA, ACNQ, potrafią modulować skład mikroflory jelit np. poprzez rozwój *Bifidobacterium* spp. Ich obecność w układzie pokarmowym powoduje redukcję ilości mikroflory patogennej, w tym może w kombinacji z innymi szczepami probiotycznymi inhibować adhezję *Helicobacter pylori* do nabłonka jelitowego [63].

Klasyczne bakterie propionowe wykazują aktywność β -galaktozydazy, enzymu odpowiedzialnego za rozkład laktozy. Enzym pozostaje aktywny nawet po zastosowaniu wysokich temperatur w czasie produkcji sera typu szwajcarskiego. Ta aktywność enzymatyczna

może posłużyć do zmniejszenia dolegliwości wynikających z nietolerancji laktozy przez niektórych ludzi. Badania wskazują również na możliwości regulowania poziomu wchłaniania lipidów, w tym cholesterolu, z układu pokarmowego gospodarza przy użyciu bakterii z rodzaju *Propionibacterium* [16, 80].

Niektóre szczepy mogą wykazywać aktywność przeciwmutageną poprzez redukcję aktywności enzymów prokancerogennych np. β -glukozydazy lub unieczynnienie egzogennych mutagenów np. aflatoksyn, N-metylo-N-nitro-N-nitrozoguanidyny (MNNG) czy 9-aminoakrydyny. MNNG stosowany jest do badania mutacji punktowych, a 9-aminoakrydyna umożliwia badanie uszkodzenia DNA na zasadzie mutacji przesunięcia ramki odczytu. W badaniach wykazano, że ochronne działanie wykazują zarówno żywe jak i martwe komórki *P. freudenreichii* oraz płyn hodowlany [94, 98].

Dodatkowo, przypisuje się im działanie prewencyjne i lecznicze w przypadku nowotworów układu pokarmowego. Wybrane szczepy z gatunku *P. freudenreichii* i *P. acidipropionici* wywołują apoptozę komórek rak jelita grubego, który w Europie jest na drugim miejscu wśród nowotworów z największym odsetkiem śmiertelności. Za przeciwnowotworowe właściwości odpowiedzialne są między innymi produkowane przez klasyczne bakterie propionowe *in situ* krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, przede wszystkim kwas propionowy [15, 16].

Wykazano również, że *Propionibacterium* spp. mogą wywierać immunomodulacyjny wpływ przejawiający się oddziaływaniem na aktywność układu immunologicznego [2, 41, 55, 98]. Doświadczenie przeprowadzone na 62 zdrowych wolontariuszach potwierdza, że klasyczne bakterie propionowe wykazują właściwości przeciwzapalne. Wolontariusze codziennie przez trzy tygodnie spożywali napój mleczny zawierający komórki *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* JS. W jednej porcji tego produktu znajdowało się $3,3 \times 10^{10}$ jtk ww. szczepu. Spożywanie takiego napoju wpłynęło na obniżenie poziomu białka C-reaktywnego (CRP), które jest markerem stanów zapalnych u człowieka [41]. W eksperymencie przeprowadzonym na myszach, po doustnym podaniu im antygeny mykobakterii wraz z *P. jensenii* 702 obserwowano wyraźny wzrost liczby limfocytów T. Wyniki dowodzą, że badany szczep może spełniać funkcję adiuwantu, powodującego wzmocnienie/pojawienie się poszczepiennej odpowiedzi odpornościowej na podany doustnie antygen np. prątków gruźlicy [2, 98].

Inne wyniki z badania wpływu spożywania preparatu probiotycznego zawierającego w swoim składzie komórki: *Bifidobacterium breve* Bb99, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* LC-705 i *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* JS, przez noworodki obciążone wysokim ryzykiem wystąpienia chorób alergicznych

wskazują, że dwa lata po narodzeniu dzieci, które suplementowano między innymi *P. freudenreichii* ssp. *shermanii* JS, wykazywały mniejszą podatność na choroby oddechowe, przez to rzadziej poddawane były antybiotykoterapii. W tej grupie zdiagnozowano również mniejszą ilość przypadków wystąpienia atopowego zapalenia skóry. Wyniki sugerują negatywną korelację pomiędzy chorobami skóry a stopniem kolonizacji układu pokarmowego przez podawane w trakcie eksperymentu szczepy bakterii [52].

4. Podsumowanie

Wzrost świadomości wpływu mikroorganizmów na funkcjonowanie organizmu człowieka, rozwój biotechnologii i idei nowej funkcjonalnej żywności powodują, że wzrasta zainteresowanie potencjałem aplikacyjnym rodzaju *Propionibacterium*. Bakterie z rodzaju *Propionibacterium* mogą być stosowane w procesach biosyntezy związków np. witamin z grupy B, kwasu propionowego, trehalozy, CLA, czynników bifidogennych czy bakteriocyn. Ponadto, obecnie prowadzone badania dowodzą, że mikroorganizmy te wykazują właściwości prozdrowotne. Tradycyjne stosowanie klasycznych bakterii propionowych w żywieniu ludzi i zwierząt, brak doniesień o ich szkodliwości i wywołanych przez nie infekcjach, wpływa na fakt akceptowania nowych możliwości ich stosowania w przemyśle.

Piśmiennictwo

1. Aburjaile F.F., Madec M.N., Parayre S., Miyoshi A., Azevedo V., Le Loir Y., Falentin H.: The long-term survival of *Propionibacterium freudenreichii* in a context of nutrient shortage. *J. Appl. Microbiol.* **120**, 432–440 (2016)
2. Adams M., Lean M., Hitchick N., Beagley K.: The efficacy of *Propionibacterium jensenii* 702 to stimulate a cell-mediated response to orally administered soluble *Mycobacterium tuberculosis* antigens using a mouse model. *Lait*, **85**, 75–84 (2005)
3. Al-Zoreky N., Ayres J., Sandine W.: Antimicrobial activity of Microgard™ against food spoilage and pathogenic microorganisms. *J. Dairy Sci.* **7**, 758–763 (1991)
4. Arora T., Sharma R., Frost G.: Propionate. Anti-obesity and satiety enhancing factor? *Appetite*, **56**, 511–515 (2011)
5. Ayres J., Sandine W., Weber G.: Preserving foods using metabolites of propionibacteria other than propionic acid. US 5096718A (1992)
6. Babuchowski A., Łaniewska-Moroz L., Warmińska-Radyko I.: Propionibacteria in fermented vegetables. *Lait*, **79**, 113–124 (1999)
7. Bellows L., Moore R.: Water-soluble vitamins: B-complex and vitamin C. Colorado State University Extension, Food and Nutrition Series, Health, **3**, fact sheet: 9.312 (2012)
8. Benfeldt C., Morgenstern H.: Strains of *propionibacterium*. WO 2013174793A1 (2013)
9. Białek A., Tokarz A.: Sprężone dieny kwasu linolowego jako potencjalny czynnik prewencyjny w profilaktyce nowotworów piersi. *Postep. Hig. Med. Dosw.* **67**, 6–14 (2013)
10. Borawska J., Warmińska-Radyko I., Darewicz M.: Charakterystyka i znaczenie bakterii rodzaju *Propionibacterium* w produkcji żywności i pasz. *Med. Weter.* **66**, 534–537 (2010)
11. Boudreaux D., Lingle M., Vedamuthu E., Gonzales C.: Method for the preservation of creamed cottage cheese. US 4728516A (1988)
12. Brüggemann H., Henne A., Hoster F., Liesegang H., Wiezer A., Strittmatter A., Hujer S., Dürre P., Gottschalk G.: The complete genome sequence of *Propionibacterium acnes*, a commensal of human skin. *Science*, **30**, 671–673 (2004)
13. Burgess C.M., Smid E.J., Rutten G., Van Sinderen D.: A general method for selection of riboflavin-overproducing food grade micro-organisms. *Microb. Cell Fact.* DOI: 10.1186/1475–2859–5–24 (2006)
14. Cardoso F.S., Gaspar P., Hugenholtz J., Ramos A., Santos H.: Enhancement of trehalose production in dairy propionibacteria through manipulation of environmental conditions. *Int. J. Food Microbiol.* **91**, 195–204 (2004)
15. Cousin F., Jouan-Lanhuet S., Dimanche-Boitrel M.-T., Corcos L., Jan G.: Milk fermented by *Propionibacterium freudenreichii* induces apoptosis of HGT-1 human gastric cancer cells. *PLoS one*, **7**, e31892 (2012)
16. Cousin F., Mater D., Foligne B., Jan G.: Dairy propionibacteria as human probiotics: A review of recent evidence. *Dairy Sci. Technol.* DOI: 10.1051/dot/2010031 (2010)
17. Czaczyk K., Trojanowska K., Grajek W.: The influence of a specific microelemental environment in alginate gel beads on the course of propionic acid fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 630–635 (1997)
18. Czeczot H.: Kwas foliowy w fizjologii i patologii. *Postep. Hig. Med. Dosw.* **62**, 405–419 (2008)
19. Dalmaso M., Nicolas P., Falentin H., Valence F., Tanskanen J., Jätilä H., Salusjärvi T., Thierry A.: Multilocus sequence typing of *Propionibacterium freudenreichii*. *Int. J. Food Microbiol.* **145**, 113–120 (2011)
20. Daly D., McSweeney P., Sheehan J.: Split defect and secondary fermentation in Swiss-type cheeses – A review. *Dairy Sci. Technol.* **90**, 3–26 (2010)
21. Dawson T., Rust S., Yokoyama M.: Improved fermentation and aerobic stability of ensiled, high moisture corn with the use of *Propionibacterium acidipropionici*. *J. Dairy Sci.* **81**, 1015–1021 (1998)
22. Deborde C., Boyaval P.: Interactions between pyruvate and lactate metabolism in *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*: in vivo ¹³C nuclear magnetic resonance studies. *Appl. Environ. Microb.* **66**, 2012–2020 (2000)
23. Deborde C., Corre C., Rolin D.B., Nadal L., De Certaines J.D., Boyaval P.: Trehalose biosynthesis in dairy *Propionibacterium*. *J. Magn. Reson. Anal.* **2**, 297–304 (1996)
24. Demigné C., Morand C., Levrat M.-A., Besson C., Moundras C., Remesy C.: Effect of propionate on fatty acid and cholesterol synthesis and on acetate metabolism in isolated rat hepatocytes. *Brit. J. Nutr.* **74**, 209–219 (1995)
25. Dherbécourt J., Maillard M., Catheline D., Thierry A.: Production of branched-chain aroma compounds by *Propionibacterium freudenreichii*: links with the biosynthesis of membrane fatty acids. *J. Appl. Microbiol.* **105**, 997–985 (2008)
26. Dziuba B.: Identification of Propionibacteria to the species level using Fourier transform infrared spectroscopy and artificial neural networks. *Pol. J. Vet. Sci.* **16**, 351–357 (2013)
27. Edourd S., Couderc C., Raoult D., Fournier P.-E.: Mass spectrometric identification of *Propionibacterium* isolates requires database enrichment. *Adv. Microbiol.* **2**, 497–504 (2012)
28. EFSA: Scientific opinion of the panel of biological hazards on the maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed. *EFSA J.* **7**, 1–11 (2009)

29. Ekinci F., Gurel M.: Effect of using propionic acid bacteria as an adjunct culture in yogurt production. *J. Dairy Sci.* **91**, 892–899 (2008)
30. El-Shafei K., Abd El-Gawad M., Dabiza N., Sharaf O., Effat B.: A mixed culture of *Propionibacterium thoenii* P-127, *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus plantarum* as protective cultures in kareish cheese. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **58**, 433–443 (2008)
31. Falentin H., Lortal S. i wsp.: The complete genome of *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1^T, a hardy *Actinobacterium* with food and probiotic applications. *PLoS one*, **5**, e11748 (2010)
32. Furuichi K., Hojo K., Katakura Y., Ninomiya K., Shioya S.: Aerobic culture of *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 can increase production ratio of 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid to menaquinone. *J. Biosci. Bioeng.* **101**, 464–470 (2006)
33. Gwiazdowska D.: Biochemiczna i molekularna charakterystyka bakteriocyn wytwarzanych przez bakterie z rodzaju *Propionibacterium*. *Biotechnologia*, **90**, 75–93. (2010)
34. Gwiazdowska D., Trojanowska K.: Antimicrobial activity and stability of partially purified bacteriocins produced by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *freudenreichii* and ssp. *shermanii*. *Lait*, **86**, 141–154 (2006)
35. Hagawa Y., Yoda N., Orihashi, T., Kanbe M.: Feeding stuff composition comprising proliferation promoting agent for bifidus bacteria and use of the same. US 20090214695A1 (2009)
36. Hatakka K., Ahola A., Yli-Knuuttila H., Richardson M., Poussa T., Meurman J., Korpela R.: Probiotics reduce the prevalence of oral *Candida* in elderly – a randomized controlled trial. *J. Dent. Res.* **86**, 125–130 (2007)
37. Higashiyama T.: Novel functions and applications of trehalose. *Pure Appl. Chem.* **74**, 1263–1269 (2002)
38. Jiang L., Cui H., Zhu L., Hu Y., Xu X., Li S., Huang H.: Enhanced propionic acid production from whey lactose with immobilized *Propionibacterium acidipropionici* and the role of trehalose synthesis in acid tolerance. *Green Chem.* **17**, 250–259 (2015)
39. Johnson J., Cummins C.S.: Cell wall composition and deoxyribonucleic acid similarities among the anaerobic coryneforms, classical propionibacteria, and strains of *Arachnia propionica*. *J. Bacteriol.* **109**, 1047–1066 (1972)
40. Kano H., Ikegami S.: Anti-allergic agent. US 8093301B2 (2012)
41. Kekkonen R., Lummela N., Karjalainen H., Latvala S., Tynkynen S., Jarvenpaa S., Kautiainen H., Julkunen I., Vapaatalo H., Korpela R.: Probiotic intervention has strain-specific anti-inflammatory effects in healthy adults. *World J. Gastroenterol.* **14**, 2029–2036 (2008)
42. Kiatpapan P., Phonghatsabun M., Yamashita M., Murooka Y., Panbangred W.: Production of 5-aminolevulinic acid by *Propionibacterium acidipropionici* TISTR442. *J. Biosci. Bioeng.* **111**, 425–428 (2011)
43. King W., Ming X., Weber G.: Foods and animal feeds including antimycotic agent comprising a propionibacteria metabolite. WO 1998016124A1 (1998)
44. Koskinen P., Deptula P., Smolander O-P., Tamene F., Kammonen I., Savijoki K., Paulin L., Piironen V., Auvinen P., Varmanen P.: Complete genome sequence of *Propionibacterium freudenreichii* DSM 20271^T. *Stand. Genomic. Sci.* DOI 10.1186/s40793-015-0082-1 (2015)
45. Kośmider A., Białas W., Kubiak P., Drożdżyńska A., Czaczyk K.: Vitamin B₁₂ production from crude glycerol by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*: optimization of medium composition through statistical experimental designs. *Biore-source Technol.* **105**, 128–133 (2012)
46. Kośmider A., Czaczyk K.: Perspektywy wykorzystania glicerolu w procesach biotechnologicznych. *Post. Mikrobiol.* **48**, 277–287 (2009)
47. Kośmider A., Czaczyk K.: Witamina B₁₂ – budowa, biosynteza, funkcje i metody oznaczania. *Zywn-Nauk. Technol. Ja.* **5**, 17–32 (2010)
48. Koussémon M., Combet-Blanc Y., Patel B., Cayol J.-L., Thomas P., Garcia J.-L., Ollivier B.: *Propionibacterium microaerophilum* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from olive mill wastewater. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **51**, 1373–1382 (2001)
49. Koziol J., Skrzypczak K., Gustaw W., Waśko A.: Wpływ preparatów białek mleka na wzrost bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*. *Zywn-Nauk. Technol. Ja.* **3**, 83–98 (2013)
50. Kujawski M., Rymaszewski J., Cichosz G.: The effect of supplementation of selected metal ions on propionibacteria biomass field and production of volatile fatty acids. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **3**, 27–36 (1992)
51. Kujawski M., Rymaszewski M., Łaniewska-Moroz Ł., Cichosz G.: Możliwości zastosowania bakterii fermentacji propionowej w przemyśle spożywczym. *Przem. Spoż.* **6**, 35–37 (1996)
52. Kukkonen K., Savilahti E., Haahtela T., Juntunen-Backman K., Korpela R., Poussa T., Tuure T., Kuitunen M.: Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Allergy Clin. Immunol.* **119**, 192–198 (2007)
53. Kusano K., Yamada H., Niwa M., Yamasato K.: *Propionibacterium cyclohexanicum* sp. nov., a new acid-tolerant ω-cyclohexyl fatty acid-containing *Propionibacterium* isolated from spoiled orange juice. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **47**, 825–831 (1997)
54. LeBlanc J. G., Savoy de Giori G., Smid E. J., Hugenholtz J., Sesma F.: Folate production by lactic acid bacteria and other food-grade microorganisms (w) Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, red. A. Méndez-Vilas, FORMATEX, Badajoz, 2007, s. 329–339
55. Le Maréchal C., Jan G. i wsp.: Surface proteins of *Propionibacterium freudenreichii* are involved in its anti-inflammatory properties. *J. Proteomics*, **113**, 447–461 (2015)
56. Libudzisz Z.: Mikroflora jelitowa a probiotyki. *Zakażenia*, **6**, 49–51 (2004)
57. Marwaha S., Sethi R., Kennedy J.: Influence of 5,6-dimethylbenzimidazole (DMB) on vitamin B₁₂ biosynthesis by strains of *Propionibacterium*. *Enz. Microb. Technol.* **5**, 361–364 (1983)
58. Mäyrä-Mäkinen A., Suomalainen T.: A novel microorganism strain, bacterial preparations comprising said strain, and use of said strain and preparations for the controlling of yeasts and moulds. EP 0576780A2 (1994)
59. Meile L., Dasen G., Miescher S., Stierli M., Teuber M.: Classification of propionic acid bacteria and approaches to applied genetics. *Lait*, **79**, 71–78 (1999)
60. Meile L., Miescher Schwenninger S.: Mixtures of *Propionibacterium jensenii* and *Lactobacillus* sp. with antimicrobial activities for use as a natural preservation system. EP 1308506A1 (2003)
61. Mikš-Krajnik M.H.: Rola paciorkowców mlekowych i pałeczek propionowych w procesie dojrzewania sera typu szwajcarsko-holenderskiego. *Zywn-Nauk. Technol. Ja.* **1**, 45–59 (2012)
62. Mogensen G., Zink R. i wsp.: Inventory of microorganisms with a documented history of use in food. *Bull. Int. Dairy Fed.* **377**, 10–19 (2002)
63. Myllyluoma E., Ahonen A., Korpela R., Vapaatalo H., Kankuri E.: Effects of multispecies prebiotic combination on *Helicobacter pylori* infection in vitro. *Clin. Vaccine Immunol.* **15**, 1472–1482 (2008)
64. Parizzi L., Pereira G. i wsp.: The genome sequence of *Propionibacterium acidipropionici* provides insights into its biotechnological and industrial potential. *BMC Genomics*, **13**, 1–20 (2012)

65. Paściak M., Mordarska H.: Rodzaj *Propionibacterium* – heterogenność taksonomiczna i biologiczna. *Post. Mikrobiol.* **38**, 245–256 (1999)
66. Patrick S., McDowell A.: Family I. *Propionibacteriaceae* (w) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 5, The Actinobacteria, red. W. Whitman, M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.-J. Busse, M. Trujillo, W. Ludwig, K. Suzuki, Springer, New York, 2012, s. 1138–1155
67. Pawlicka J., Drożdżyńska A., Kośmider A., Czaczyk K.: The effect of phosphate buffer on biomass, propionic acid and trehalose production by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. *EPISTEME. Czasopismo Naukowo-Kulturalne*, **26**, 85–93 (2015)
68. Peng M., Smith A., Rehberger T.: Quantification of *Propionibacterium acidipropionici* P169 bacteria in environmental samples by use of strain-specific primers derived by suppressive subtractive hybridization. *Appl. Environ. Microb.* **77**, 3898–3902 (2011)
69. Pędziwilk F.: A simple plating method for the isolation and enumeration of *Propionibacteria*. *Acta Alim. Pol.* **25**, 127–130 (1975)
70. Picard C., Fioramonti J., Francois A., Robinson T., Neant F., Matuchansky C.: Review article: bifidobacteria as probiotic agents – physiological effects and clinical benefits. *Aliment. Pharm. Ther.* **22**, 495–512 (2005)
71. Piveteau P.: Metabolism of lactate and sugars by dairy propionibacteria: A review. *Lait*, **79**, 23–41 (1999)
72. Piwowarek K., Lipińska E.: Bakterie propionowe użyteczne w przemyśle spożywczym. *Przem. Spoż.* **69**, 26–30 (2015)
73. Poonam, S., Sudhir K., Sachinandan D., Rameshwar S.: Multifaceted attributes of dairy propionibacteria: a review. *World J. Microb. Biot.* **28**, 3081–3095 (2012)
74. Quesada-Chanto A., Afschar A.S., Wagner F.: Microbial production of propionic acid and vitamin B₁₂ using molasses or sugar. *Appl. Microbiol. Biot.* **41**, 378–383 (1994)
75. Quesada-Chanto A., Afschar A.S., Wagner F.: Optimization of a *Propionibacterium acidipropionici* continuous culture utilizing sucrose. *Appl. Microbiol. Biot.* **42**, 16–21 (1994)
76. Rainio A., Vahvaselka M., Suomalainen T., Laakso S.: Production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii* spp. *shermanii*. *Lait*, **82**, 91–101 (2002)
77. Rossi F., Dellaglio F., Torriani S.: Evaluation of *recA* gene as a phylogenetic marker in the classification of dairy propionibacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **29**, 463–469 (2006)
78. Ruhul R., Choudhury B.: Use of an osmotically sensitive mutant of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* for the simultaneous productions of organic acids and trehalose from biodiesel waste based crude glycerol. *Bioresource Technol.* **109**, 131–139 (2012)
79. Ruijschop R., Boelrijk A., Giffel M.: Satiety effects of a dairy beverage fermented with propionic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **18**, 945–950 (2008)
80. Samkuti G., Johnson T.: Cholesterol uptake by *Propionibacterium freudenreichii*. *Curr. Microbiol.* **20**, 305–309 (1990)
81. Schiraldi C., Di Lernia I., De Rosa M.: Trehalose production: exploiting novel approaches. *Trends Biotechnol.* **20**, 420–425 (2002)
82. Schwenninger S.M., Meile L.: A mixed culture of *Propionibacterium jensenii* and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* inhibits food spoilage yeasts. *System. Appl. Microbiol.* **27**, 229–237 (2004)
83. Sonhom R., Thepsithar C., Jongsareejit B.: High level production of 5-amninolevulinic acid by *Propionibacterium acidipropionici* grown in low-cost medium. *Biotechnol. Lett.* **34**, 1667–1672 (2012)
84. Suomalainen T., Mäyrä-Mäkinen A.: Propionic acid bacteria as protective cultures in fermented milks and breads. *Lait*, **79**, 165–174 (1999)
85. Tawfik N., Sharaf O., Effat B., Mahanna N.: Preserving Domiati cheese using metabolites of *Propionibacterium thoenii* P-127. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **54**, 269–272 (2004)
86. Thierry A., Deutsch S.M., Falentin H., Dalmasso M., Cousin F.J., Jan G.: New insights into physiology and metabolism of *Propionibacterium freudenreichii*. *Int. J. Food Microbiol.* **149**, 19–27 (2011)
87. Thirupathaiah Y., Rani C., Reddy M., Rao L.: Effect of chemical and microbial vitamin B₁₂ analogues on production of vitamin B₁₂. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 2267–2271 (2012)
88. Tómes N., Henderick C., Glatz B.: Selective medium for propionibacterium growth. US 5026647A (1991)
89. Trinidad T., Wolever T., Thompson L.: Effects of calcium concentration, acetate, and propionate on calcium absorption in human distal colon. *Nutrition*, **15**, 529–533 (1999)
90. Trojanowska K., Czaczyk K.: The effect of Co⁺⁺, Mg⁺⁺, Zn⁺⁺, Mn⁺⁺, Fe⁺⁺ ions on the course of propionic acid fermentation. *Ann. Univ. Poznan.* **20**, 2534 (1996)
91. Van Nieuwenhove C.P., Terán V., González S.N.: Conjugated linoleic and linolenic acid production by bacteria: development of functional foods (w) Probiotics, red. E. Rigobelo, InTech, Rijeka, 2012, s. 55–80
92. Van Wyk J., Brtiz J.T.: A rapid high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the extraction and quantification of folates in dairy products and cultures of *Propionibacterium freudenreichii*. *Afr. J. Biotechnol.* **11**, 2087–2098 (2012)
93. Vorobjeva L., Khasaeva F., Vasilyuk N., Trenquil E.: Characterization of propionic acid bacteria using matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry. *Microbiology*, **80**, 651–658 (2011)
94. Vorobjeva L., Khodjaev E., Vorobjeva N.: Probiotic acid bacteria as probiotics. *Microb. Ecol. Health Dis.* **20**, 109–112 (2008)
95. Wang L., Lv J., Chu Z., Cui Y., Ren X.: Production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii*. *Food Chem.* **103**, 31–318 (2006)
96. Yamazaki S., Kano K., Ikeda T., Isawa K., Kaneko T.: Role of 2-amino-3-carboxy-1,4-naphthoquinone, a strong growth stimulator for bifidobacteria, as an electron transfer mediator for NAD(P)(+) regeneration in *Bifidobacterium longum*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1428**, 241–250 (1999)
97. Yee A.L., Maillard M.B., Roland N., Chuat V., Leclerc A., Pogačić T., Valence F., Thierry A.: Great interspecies and intra-species diversity of dairy propionibacteria in the production of cheese aroma compounds. *Int. J. Food Microbiol.* **191**, 60–68 (2014)
98. Zárate G.: Dairy Propionibacteria: Less Conventional Probiotic to Improve the Human and Animal Health (w) Probiotic in Animals, red. E. Rigobelo, InTech, Rijeka, 2012, s. 153–202
99. Zhang A., Sun J., Wang Z., Yang S.T., Zhou H.: Effects of carbon dioxide on cell growth and propionic acid production from glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici*. *Bioresource Technol.* **175**, 374–381 (2015)
100. Żylińska J., Siemianowski K., Bohdziewicz K., Pawlikowska K., Kołakowski P., Szpendowski J., Bardowski J.: Kultury startowe do produkcji twarogów kwasowych – rola i oczekiwania. *Post. Mikrobiol.* **53**, 288–298 (2014)

Magdalena Michalak^{1*}, Klaudia Gustaw¹, Adam Waśko¹, Magdalena Polak-Berecka¹

¹ Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności,
Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Wpłynęło w marcu 2016 r.
Zaakceptowano w maju 2016 r.

1. Wprowadzenie. 2. Zanieczyszczenie środowiska kadmem a zdrowie człowieka. 3. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* jako biosorbent jonów metali ciężkich. 4. Rola zewnętrznych struktur komórkowych w wiązaniu jonów metali ciężkich. 4.1. Biosorpcja jonów metali ciężkich przez białka powierzchniowe. 4.2. Udział polisacharydów w wiązaniu jonów metali ciężkich. 5. Czynniki wpływające na wydajność procesu biosorpcji. 6. Kinetyka procesu biosorpcji. 7. Podsumowanie

Biosorption of cadmium ions by cell surface structures of bacteria from *Lactobacillus* species

Abstract: Cadmium is a heavy metal which is one of the major polluting component of human and animal environment. Exposure can lead to accumulation of metal ions in the tissues, causing adverse health effects. In recent years, the ability of biological material, such as bacteria, to remove cadmium and other toxic metals have been explored. Biosorption is a process of rapid binding of metals from solution onto functional groups that occur on the surface of bacterial cells. Species such as *Lactobacillus*, present in the human gastrointestinal tract and in fermented food, have the ability to bind and detoxify heavy metal ions due to the occurrence of negatively charged functional groups. These bacteria offer several advantages compared to other microorganisms, primarily thanks to their probiotic activity and GRAS (Generally Recognized As Safe) status. In this review, our intention was to describe the current understanding of biosorption mechanism of lactobacilli and to explain how bacterial surface structures interact with metal ions.

1. Introduction. 2. Environmental pollution by cadmium and human health. 3. Bacteria from *Lactobacillus* species as biosorbent of heavy metal ions. 4. Role of extracellular structures in the binding of heavy metal ions. 4.1. Biosorption of heavy metal ions by surface proteins. 4.2. Impact of exopolysaccharides on the binding of heavy metal ions. 5. Factors affecting efficiency of biosorption process. 6. Kinetic studies of biosorption process. 7. Summary

Słowa kluczowe: białka powierzchniowe, biosorpcja, egzopolisacharydy, kadmu, *Lactobacillus*

Keywords: biosorption, cadmium, cell surface proteins, exopolysaccharides, *Lactobacillus*

1. Wprowadzenie

Kadm to metal ciężki, który jest jednym z ważniejszych składników zanieczyszczających środowisko życia ludzi oraz zwierząt. Ekspozycja środowiskowa może prowadzić do wchłaniania jego związków przez organizm oraz ich niekorzystnego oddziaływania na komórki i tkanki [59]. Jedną z metod mających na celu eliminację metali ciężkich ze środowiska jest biosorpcja – zjawisko, które polega na usuwaniu zanieczyszczeń z zastosowaniem materiałów biologicznych. Do cech, które wyróżniają biosorpcję wśród metod konwencjonalnych (precypitacja, elektrodializa, adsorpcja na węglu aktywnym, itp.) zalicza się: niski koszt, wysoką efektywność, minimalizację odpadów pochodzenia chemicznego lub biologicznego, regenerację biosorbentów oraz możliwość odzysku metalu [25, 51].

Zdolność do przeprowadzania procesu biosorpcji w stosunku do metali ciężkich potwierdzono również wśród bakterii kwasu mlekowego (lactic acid bacteria – LAB) [9, 40, 46, 73, 77, 96]. Mikroorganizmy te, stano-

wiące naturalną mikroflorę błon śluzowych ludzi oraz zwierząt, są powszechnie stosowane do produkcji preparatów probiotycznych. Znaczący udział w aktywności biologicznej LAB odgrywają poszczególne komponenty komórkowe, w tym najbardziej zewnętrzne polimery tj. polisacharydy i białka powierzchniowe [39, 79]. Liczne badania wskazują, że w zależności od rodzaju, a nawet szczepu mikroorganizmu mają one związek z adhezją, agregacją oraz hamowaniem rozwoju patogenów [28, 50]. Dodatkowo, badania prowadzone w ostatnich latach wykazały, że dzięki obecności grup funkcyjnych stanowią one główny czynnik zaangażowany w interakcje bakteria–metal [19, 28, 30, 56, 57, 73].

2. Zanieczyszczenie środowiska kadmem a zdrowie człowieka

W wyniku rozwoju cywilizacji, uprzemysłowienia i urbanizacji kadm stał się metalem szeroko rozpowszechnionym w przyrodzie. W przemyśle wykorzystywany

* Autor korespondencyjny: Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie; ul. Skromna 8, 20-950 Lublin; e-mail: magdalena.michalak@up.lublin.pl

jest przede wszystkim do produkcji akumulatorów, baterii niklo-kadmowych oraz galwanicznych powłok ochronnych. Dodatkowo, związki kadmu wchodzi w skład barwników, stabilizatorów tworzyw sztucznych, czy materiałów fluorescencyjnych. Mogą być także używane do wytwarzania sztucznych ogni, stopów łożyskowych i lutowniczych bądź też prętów kadmowych [16]. Każdego roku do środowiska wprowadzanych jest 13 000 ton kadmu, który trafia do różnych ekosystemów i pozostaje w ciągłym obiegu zagrażając zdrowiu człowieka [70].

Związki kadmu dostają się do organizmu człowieka przede wszystkim drogą oddechową i pokarmową. Szacuje się, że w zależności od wielkości cząsteczek, 10–50% wdychanego kadmu jest absorbowana przez tkanki. Podobna zależność występuje w przypadku wchłaniania kadmu, który dostaje się do organizmu wraz z pożywieniem. Absorpcja tego metalu może wahać się w przedziale od około 5 do 10%, na co dodatkowo wpływa zawartość w diecie mikroelementów, takich jak żelazo, wapń, miedź czy cynk. Deficyt tych składników zwiększa bowiem wydajność wchłaniania metali ciężkich i ich kumulację w organizmie. W przypadku kontaktu kadmu ze skórą, potencjalny efekt toksyczny, w związku ze znikomym poziomem wchłaniania, jest bardzo mały [8].

Za najbardziej znaczące źródło narażenia ludzi na kadm uważane jest palenie papierosów. W organizmach palaczy stężenie tego pierwiastka we krwi, jak i w nerkach jest kilkakrotnie wyższe niż u osób niepalących. Ekspozycja na kadm w postaci aerozoli jest istotnym zagrożeniem w zakładach produkcyjnych, w których metal dostaje się do układu oddechowego podczas procesów, takich jak np. lutowanie lub spawanie [60].

Drogą pokarmową pierwiastek ten trafia do organizmu wraz z zanieczyszczoną żywnością, do której należą m.in. skorupiaki, podroby, warzywa liściaste. Uwzględniając zaś podstawowe produkty spożywcze, w krajach azjatyckich to ryż, a w krajach Europy Zachodniej – warzywa bulwiaste, stanowią główne źródło pokarmowej ekspozycji na toksyczny kadm [2, 35]. Dzielne spożycie kadmu w Polsce przez osoby dorosłe kształtuje się na poziomie 23–120 µg, podczas gdy w skali światowej jest to około 150 µg [17]. Istotnym źródłem narażenia człowieka na metal jest też woda pitna, która może ulegać kontaminacji w wyniku kontaktu z instalacją wodociagową wykonaną z materiałów zawierających kadm, bądź też z odpadami rolniczymi lub przemysłowymi. Ponadto, zanieczyszczone leki oraz suplementy diety uważane są za potencjalne źródło tego metalu w organizmie człowieka [2].

Kadm, który został zaabsorbowany w organizmie początkowo gromadzi się w enterocytach. Wchłanianie tego metalu możliwe jest przede wszystkim dzięki obecności w komórkach nabłonka jelitowego białko-

wych przenośników, takich jak DMT1 (divalent metal transporter 1) i MTP1 (metal transporter protein 1). Duży wpływ odgrywa również dyfuzja prosta oraz system białek transportowych (hZTL1, ZNT1), które odpowiedzialne są za transport jonów cynku i wapnia. Absorbowanie kadmu z przewodu pokarmowego możliwe jest także na skutek połączeń metalu z grupami tiolowymi cysteiny i glutationu (GSH), w wyniku czego tworzy się odpowiednio: Cd-cysteina i Cd-GSH [72]. Następnie kadm, który uległ wchłonięciu, przedostaje się z enterocytów nabłonka jelitowego do krwiobiegu. Stąd transportowany jest do wątroby zwykle związany z białkami, takimi jak albuminy oraz metalotioneiny. Intensywna produkcja metalotioneiny może prowadzić do nekrozy i apoptozy hepatocytów, w wyniku czego kompleks metal-białko przedostaje się do tkanek i narządów w organizmie człowieka [5].

Uważa się, że 50% kadmu zawartego w organizmie jest magazynowane w wątrobie i nerkach, co ma związek z dużą koncentracją metalotioneiny w tych organach. Pozostała część zaabsorbowanego metalu gromadzi się w płucach, trzustce, jądrach, grasicy, śledzionie, sercu, śliniankach oraz ośrodkowym układzie nerwowym [10, 71]. Długotrwała ekspozycja na kadm prowadzi także do akumulacji tego metalu w kościach i włosach [17].

Kadm ma negatywny wpływ na zdrowie człowieka nawet w małych ilościach, a ponieważ organizm ma ograniczoną zdolność reagowania na obecność metalu, nie jest on efektywnie usuwany [88]. Dowodzi tego fakt, że dziennie wydalanie kadmu, głównie z moczem, nie przekracza 0,01% ilości pierwiastka spożywanego w diecie. W przypadku ostrego zatrucia kadmem, spowodowanego zazwyczaj kontaktem z metalem w miejscu pracy, objawy pojawiają się zazwyczaj po 24 godzinach. Charakterystyczne zmiany to duszności, ogólne osłabienie, gorączka. Może również wystąpić obrzęk lub zapalenie płuc, a w ciężkich przypadkach – niewydolność oddechowa i śmierć [71]. Długotrwała, kilku – kilkunastoletnia ekspozycja na kadm, prowadzi do zatruc przewlekłych. Pierwszymi zauważalnymi objawami są wydalanie z moczem niskocząsteczkowych białek i zwiększona ilość wydalanej kreatyniny. Nierzadko pojawiają się nieprawidłowości ze strony układu oddechowego i zmiany morfologiczne krwi, takie jak eozynofilia (zwiększenie liczby granulocytów kwasochłonnych) oraz zmniejszona zawartość hemoglobiny w erytrocytach [17].

Niekorzystne działanie kadmu wiąże się z szeregiem mechanizmów, które prowadzą do różnorodnych zmian w organizmach żywych, przyczyniając się także do wzrostu ryzyka wystąpienia nowotworów. Uszkodzenie tkanek powodowane przez metal może być wynikiem indukowania stresu oksydacyjnego oraz epigenetycznych zmian w ekspresji DNA [65, 89]. Ponadto, kadm zaburza działanie komórkowych szlaków transporto-

wych, a także ingeruje w metabolizm i funkcje pierwiastków niezbędnych dla organizmu, takich jak np. cynk i magnez [83, 84]. Inne działania patologiczne obejmuje hamowanie syntezy hemu i upośledzenie funkcji mitochondriów, co może prowadzić do apoptozy komórki [13, 72]. Zaobserwowano również, że kadm działa toksycznie na skutek wyczerpywania glutationu i wiązania metalu do grup tiolowych białek [84]. Warto dodać, że przedstawione mechanizmy, w zależności od obecności innych metali ciężkich, takich jak ołów i arsen, mogą mieć nasilony efekt chorobotwórczy. Jednak, jak pokazują badania, występowanie cynku i seleniu oraz czynników zwiększających poziom jądrowego czynnika Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) może łagodzić toksyczne działanie kadmu [93].

3. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* jako biosorbent jonów metali ciężkich

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* tworzą dużą, heterogenną grupę Gram-dodatnich, katalazoujemnych, fakultatywnie beztlenowych bakterii, które należą do typu *Firmicutes* [43, 92]. Bakterie te zaliczane są do grupy bakterii mlekowych wytwarzających kwas mlekowy, jako końcowy produkt fermentacji węglowodanów. W zależności od gatunku należą do mezofili lub termofili. *Lactobacilli* rosną w szerokim zakresie temperatur od 2 do 53°C oraz w pH od 3 do 8. Występują w środowiskach bogatych w węglowodany będących substratami przeprowadzanej przez nie fermentacji. Do wzrostu potrzebują także dodatku w podłożu aminokwasów, peptydów, kwasów tłuszczowych, estrów, soli, pochodnych kwasów nukleinowych i witamin. Pomimo dużych wymagań pokarmowych, *lactobacilli* zasiedlają zróżnicowane nisze środowiskowe: od wody, gleby i ścieków, po tkanki roślinne i nabłonek przewodu pokarmowego ludzi oraz zwierząt [26, 43].

Rodzaj *Lactobacillus* obejmuje grupę bakterii, które odgrywają nie tylko kluczową rolę w wytwarzaniu żywności fermentowanej (produkty mleczarskie, kiszonki, dojrzewające wędliny), ale także są wykorzystywane do produkcji farmaceutycznych preparatów probiotycznych [20]. Zgodnie z definicją zatwierdzoną przez FAO i WHO probiotyki to „żywe szczepy ściśle określonych drobnoustrojów, które podawane w odpowiednich ilościach modulują równowagę bakteryjną flory jelitowej i wywierają korzystny efekt na zdrowie konsumenta” [36]. Obecne na rynku preparaty probiotyczne posiadają w swoim składzie żywe kultury jednego, lub większej liczby szczepów bakterii naturalnie występujących w przewodzie pokarmowym człowieka lub zwierząt [26]. Bakterie należące do rodzaju *Lactobacillus* dzięki wytwarzaniu substancji antybakteryjnych, tj. m.in. bakteriocyn i kwasów organicznych wykazują działa-

nie antagonistyczne w stosunku do drobnoustrojów chorobotwórczych. Ponadto, istotną rolę w hamowaniu zasiedlania przewodu pokarmowego przez patogeny odgrywa zdolność przylegania bakterii chorobotwórczych i probiotycznych do nabłonka jelitowego oraz konkurencja o receptory śluzówkowe i nabłonkowe. Dodatkowo, bakterie te poprawiają trawienie i przyswajanie składników odżywczych, usuwają substancje toksyczne, obniżają poziom cholesterolu i poprawiają odporność organizmu [18, 52, 80].

Pałeczki *Lactobacillus* w przewodzie pokarmowym ulegają kontaktowi z jonami metali i innymi zanieczyszczeniami pochodzącymi z diety, a dzięki wykształceniu odpowiednich mechanizmów potrafią chronić się przed ich toksycznym działaniem. Na podstawie obecności operonu *cadA* uważa się, że główny mechanizm oporności LAB na metale ciężkie opiera się na transporcie jonów metalu poza komórkę (efflux system) [61]. Wskazywałoby to, że jony metalu będą pozostawać niezwiązane przez bakterie w przewodzie pokarmowym. Jednak proces detekcji jonów metalu przez komórkę, transkrypcja odpowiednich genów i nagromadzenie właściwej ilości białek wymaga czasu. Podczas tych procesów, ‘uwięziony’ na powierzchni komórki bakterii metal przedostaje się wraz z nią wzdłuż przewodu pokarmowego, a następnie ulega usunięciu na drodze defekacji. Pomimo tej możliwości, prawdopodobnie jednak idealnym kandydatem do detoksyfikacji jest mikroorganizm, który nie posiada genów kodujących transportery metali, a jedynie wiąże je na powierzchni swoich osłon komórkowych lub gromadzi wewnątrz komórki w cytoplazmie [53]. Prócz działania skierowanego bezpośrednio wobec pierwiastków, bakterie mlekowe posiadają również zdolność do redukowania stresu oksydacyjnego spowodowanego toksycznością metali, mogą też łagodzić uszkodzenia narządów (nerki, wątroba) oraz ograniczać zmiany histopatologiczne [53, 96].

Kadm, który dostał się do organizmu drogą pokarmową w pierwszym etapie ulega wchłonięciu przez nabłonek jelitowy, który zasiedlany jest przez bakterie mlekowe. Badania przeprowadzone na myszach wykazały, że szczep *L. plantarum* CCFM8610 wiązał jony kadmu, co powodowało zwiększone wydalanie metalu z organizmu [97]. Podobną zależność zauważono w przypadku probiotycznego szczepu *L. rhamnosus* GG, który regulował wchłanianie aflatoksyny B1 u szczurów prowadząc do występowania większej ilości mykotoksyny w kale w porównaniu do grupy kontrolnej. Może to prowadzić do ograniczenia występowania kompleksów Cd-MT, który w efekcie, jest w mniejszym stopniu magazynowany w wątrobie lub transportowany wraz z krwią do nerek. Dzięki temu, znacznie ograniczona jest liczba niezwiązanych przez białko jonów metalu, a przez to prawdopodobieństwo występowania stresu oksydacyjnego i co za tym idzie uszkodzenie

tkanek jest mniejsze [31, 95]. Dodatkowo, zauważono, że żywe kultury *Lactobacilli* i *Bifidobacterii*, tj. *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *B. bifidum* oraz *B. longum* mogą zwiększać wchłanianie i biodostępność potrzebnych dla organizmu metali, w tym m.in. wapnia, magnezu oraz żelaza u ludzi i zwierząt. Można, więc przypuszczać, że żywe komórki bakterii *L. plantarum* CCFM8610 będą wykazywały zdolność do większej absorpcji tych metali *in situ*, a tym samym zmniejszały wchłanianie kadmu do krwiobiegu [97].

Uważa się, że głównym mechanizmem odpowiedzialnym za wiązanie jonów metali na powierzchni komórek bakterii jest wymiana jonowa. W procesie uczestniczą ponadto zjawiska, takie jak kompleksowanie, precypitacja, adsorpcja, chelatowanie oraz dyfuzja przez ścianę i błonę komórkową [1, 3].

Dane literaturowe wskazują, że wykorzystanie jako złoża sorpcyjnego zarówno żywej, jak i martwej biomasy prowadzi do usuwania jonów metali ciężkich [33, 40, 56, 57, 77, 97]. Przykładowo, Tian i wsp. [77] badając zdolności sorpcyjne 16 szczepów bakterii probiotycznych wobec jonów miedzi wykazali, że wszystkie bakterie lepiej wiązały jony metalu, jeśli w eksperymencie zastosowano żywe komórki. Sugerowano, że inaktywacja termiczna biomasy mogła spowodować nieodwracalne uszkodzenia zewnętrznej struktury komórkowej, a tym samym zmniejszyła liczbę miejsc wiążących jony miedzi. Z kolei inne badania pokazały, że efektywność wiązania jonów kadmu przez szczep *L. plantarum* CCFM8610 nie uległa znaczącej zmianie i była zbliżona w przypadku stosowania żywych i martwych komórek i wynosiła odpowiednio 77 i 73% [97]. Z drugiej jednak strony Mrvčić i wsp. [57] wnioskują, że lepsze zdolności sorpcyjne częściej wykazywały komórki martwe, co można tłumaczyć zwiększeniem dostępności grup funkcyjnych na powierzchni biosorbentu. Można, więc sądzić, że wydajność biosorpcji jest w dużej mierze zależna od gatunku, a nawet szczepu bakterii, które ulegają kontaktowi z jonem metalu. Nie da się, zatem jednoznacznie stwierdzić wpływu żywej lub martwej biomasy na wydajność omawianego procesu.

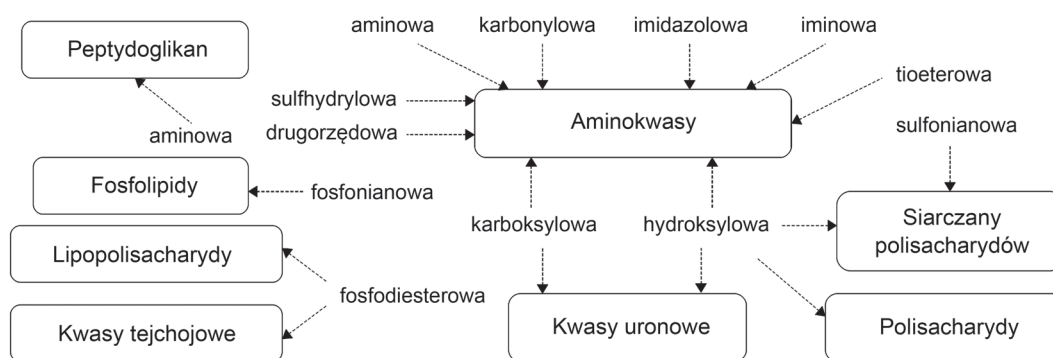
Wiązanie jonów metali przez LAB to proces dynamiczny. Halttunen i wsp. [34] analizując wybrane szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* zaobserwowali, że potrzeba od 5 minut do 1 godziny, by bakterie wydajnie wiązały jony kadmu i ołowiu w roztworze wodnym. Podobne rezultaty uzyskano badając zdolność bakterii *Pseudomonas putida* do wiązania kationów metali, w tym kadmu. Otrzymane wyniki skłoniły autorów do wniosku, że szybka adsorpcja metali z roztworów wodnych jest raczej efektem ich wiązania do powierzchni ściany komórkowej, aniżeli akumulacji jonów metalu (sorbatu) wewnątrz komórki [64]. Z kolei w innej pracy, autorzy porównywali efektywność usuwania jonów kadmu i ołowiu z roztworów wodnych

przez dwa probiotyczne szczepy: *L. rhamnosus* LC-705 i *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* JS. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wykazały szybkie wiązanie metalu i osiągnięcie stanu równowagi już po godzinie eksperymentu [40]. Podobne rezultaty uzyskano dla bakterii należących do gatunku *Enterococcus faecium*, które mają zastosowanie w wytwarzaniu produktów fermentowanych. Zaobserwowano usuwanie kadmu i ołowiu z roztworu przez *E. faecium* EF031 i probiotyczny szczep *E. faecium* M74. Zjawisko to było efektem tworzenia kompleksów metal–komórka bakterii, który utrzymywał się przez 48 godzin trwania eksperymentu. Po upływie godziny, badane szczepy bakterii zmniejszyły stężenie jonów metali w roztworze o 60%, co wykazało, że kompleksowanie metalu jest procesem wyjątkowo szybkim [78]. Powyższe wyniki wskazują, że zastosowanie probiotycznych szczepów bakterii mlekowych w produktach żywnościowych może przyczynić się do wiązania toksycznych jonów metali w organizmie człowieka, a powstający kompleks jest wystarczająco trwały, by ulec usunięciu z przewodu pokarmowego na drodze defekacji [53, 87].

4. Rola zewnętrznych struktur komórkowych w wiązaniu jonów metali ciężkich

Negatywnie naładowane grupy funkcyjne, takie jak aminowa, estrowa, hydroksylowa, karboksylowa, karbonylowa, sulfonowa, występujące na powierzchni komórki, w wyniku działania sił elektrostatycznych adsorbują kationy metali (Rys. 1). W związku z tym, protony i/lub kationy metali lekkich (sód, potas, magnez, wapń), które naturalnie związane są z grupami funkcyjnymi obecnymi na powierzchni komórek bakterii, zostają wypierane przez jony metali występujące w roztworze wodnym [51].

Informacji dotyczących przebiegu procesu biosorpcji jonów metali dostarczają zarówno proste, jak i bardziej złożone układy eksperymentalne. Każda z metod badawczych pozwala ujawnić wybrane aspekty dotyczące sorbatu oraz jego interakcji z miejscem wiążącym jon metalu. W celu oznaczenia stężenia sorbatu w fazie wodnej można wykorzystać atomową spektroskopię absorpcyjną (AAS), elektrody jonoselektywne (ISE), spektrometrię UV-Vis, a także plazmę wzbudzaną indukcyjnie (ICP). Użyteczną metodą w wizualizacji morfologii biosorbentu jest skaningowa i transmisyjna mikroskopia elektronowa (SEM/TEM). Z kolei określenie miejsc aktywnych biosorbentu możliwe jest dzięki wykorzystaniu technik analitycznych, takich jak spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR), spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (ESR) i jądrowy rezonans magnetyczny (NMR). Analiza termogravimetryczna (TGA) oraz



Rys. 1. Grupy funkcyjne występujące w wybranych biomolekułach na powierzchni komórek bakterii, które uczestniczą w procesie biosorpcji. Na podstawie [86]

skaningowa kolorymetria różnicowa (DSC) dostarczają informacji o stabilności termicznej biosorbentu. Ponadto, stopień utlenienia, kompozycja elementów powierzchniowych na biosorbencie, jak i stopień utlenienia i środowisko koordynacyjne metalu wiążącego się do biosorbentu wyznacza się stosując odpowiednio, spektroskopię fotoelektronów w zakresie promieniowania X (XPS) oraz absorpcyjną spektroskopię rentgenowską (XAS) [22].

Zdolności sorpcyjne niektórych komponentów komórkowych *lactobacilli*, takich jak egzopolisacharydy i białka powierzchniowe, zostały zauważone już kilka lat temu [19, 28, 30, 56, 57]. W swojej pracy Haltunnen i wsp. [33] wykazali, że neutralizacja ładunku ujemnego grup karboksylowych i fosforanowych na powierzchni *L. fermentum* ME3 prowadzi do zmniejszenia zdolności do biosorpcji jonów kadmu przez bakterie. Sugero- wano, że to właśnie oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy kationami metali, a niektórymi grupami funkcyjnymi na powierzchni komórek bakterii mają wpływ na usuwanie jonów metali ciężkich. Poznanie struktury fizykochemicznej polimerów ściany komór- kowej *lactobacilli* istotnych w procesie wiązania jonów metali ciężkich pozwala zrozumieć pośrednie, jak i bezpośrednie uwarunkowania zdolności sorpcyjnych komensalnej mikroflory jelitowej.

4.1. Biosorpcja jonów metali ciężkich przez białka powierzchniowe

Najbardziej zewnętrzną, a zarazem najliczniejszą grupę białek otaczających komórkę tworzą białka warstwy S (S-layer protein – SLP), które stanowią od 10 do 15% ogółu białek ściany komórkowej. Jest to kryształiczna, dwuwymiarowa powłoka zbudowana z białek i glikoprotein połączonych w sieć o zróżnicowanej symetrii (ukośna (p1, p2), kwadratowa (p4), heksagonalna (p3, p6)). Białka te mają stabilną strukturę trzeciorzędową, a ich masa cząsteczkowa mieści się w zakresie od 25 do 71 kDa, co czyni je najmniejszymi poznanymi dotychczas białkami uczestniczącymi w procesie

adhezji do komórek nabłonkowych [38]. Występowanie warstwy S potwierdzono dotychczas u szczepów należących do gatunków: *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. crispatus*, *L. gallinarum*, *L. helveticus* oraz *L. hilgardii*. Charakterystyczną cechą białek powierzchniowych S bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, oprócz małych rozmiarów, jest ich wysoki punkt izoelektryczny, który nadaje tym polimerom silnie zasadowy charakter [39].

Bakteryjne białka powierzchniowe zawierają dwa regiony strukturalne, z których jeden odpowiada za przymocowanie białka do ściany komórkowej, drugi zaś uczestniczy w utrzymaniu struktury białka na powierzchni. Dotychczas scharakteryzowano je w następujących białkach warstwy S: białku SA *L. acidophilus* ATCC 4356, CbsA *L. crispatus* JCM 5810, SlpB u szczepów *L. crispatus* K313 i K2-4-3, SlpA *L. crispatus* ZJ001, SlpA *L. brevis* ATCC 8287 oraz białku syntetyzowanym przez szczep *L. hilgardii* B706. Większość bakteryjnych białek warstwy S zawiera peptyd sygnałowy. Takie białka wiążą się niekowalencyjnie ich N- lub C-końcem do peptydoglikanu i wtórnych polimerów ściany komórkowej (kwasu teichojowego, teichuronowego). W kotwiczeniu uczestniczy motyw SLH, zaś w przypadku jego braku, zachodzi interakcja pomiędzy resztami aminokwasów białek a naładowanymi ujemnie węglowodanami, które występują w ścianie komórkowej bakterii [11, 38].

Liczne badania wskazują na istnienie korelacji pomiędzy obecnością białek warstwy S, ich budową, a właściwościami powierzchniowymi *lactobacilli* [76, 91]. Ponadto, wykazano, że białka warstwy S bakterii z rodzaju *Lactobacillus* chronią komórkę przed niekorzystnymi warunkami środowiska, w tym metalami ciężkimi. Występowanie tej warstwy powiązано ze spadkiem wrażliwości na mutanolizynę u *L. helveticus* ATCC 12046 [48], sok żołądkowy i trzustkowy u *L. acidophilus* M92 [23] oraz kwas taninowy i siarczany miedzi w winie u szczepu *L. hilgardii* B706 [19].

W celu zrozumienia mechanizmów zaangażowanych w wiązanie jonów metali można wykorzystać analizę widm w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR),

która daje wgląd w naturę wiązań i pozwala zidentyfikować różne grupy funkcyjne na powierzchni ściany komórkowej bakterii. Z wykorzystaniem tej techniki po odpowiedniej ekstrakcji białek S-layer pochodzących ze szczepów *L. kefir* CIDCA 8348 i JCM 5818 wykazano, że te polimery zdolne są do oddziaływania z metalami poprzez grupy karboksylowe reszt kwasu asparaginowego i glutaminowego. Koordynacja jest najczęściej jednokleszczowa i uzupełniona przez dodatkowe wiązania koordynacyjne obejmujące grupy –NH ze szkieletu peptydowego. Wykonane analizy pozwoliły także stwierdzić, że powstałe oddziaływania prowadzą do zmian w strukturze drugorzędowej białek. Odnotowano zwiększenie liczby β -harmonijek przy jednoczesnym spadku struktur α -helis, umożliwiając dopasowanie ich konformacji do obecności jonów metali przy najmniejszych kosztach energetycznych. Zauważona zależność była tym większa, im większy był promień jonowy kationu dwuwartościowego (Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+}) [29]. Efektem powstałych zmian był wzrost sztywności białek, ich wytrzymałości oraz zdolności rozpraszania energii podczas odfektowania [69].

Pomimo, że podczas biosorpcji obserwuje się wyraźne interakcje grup funkcyjnych z jonami metali, rolę jaką pełnią niektóre struktury powierzchniowe wydaje się być nie do końca poznana. Schut i wsp. [73] badali zdolności sorpcyjne szczepu *L. hilgardii* DSM 20176 i zaobserwowali, że bakterie traktowane proteinazą K, a więc pozbawione warstwy S cechowały się mniejszą zdolnością do wiązania jonów miedzi (o 38%) i żelaza (o 17%) w porównaniu do tych samych bakterii z warstwą S obecną na powierzchni komórki. Natomiast ten sam szczep bakterii, również nie zawierający białek powierzchniowych, w obecności jonów cynku i manganu wiązał jony z efektywnością większą o odpowiednio 17 i 58% [73]. Wyniki badań innych autorów pokazały, że szczepy bakterii *L. kefir* CIDCA 8348 i JCM 5818 pozbawione białek S-layer cechowały się większymi właściwościami sorpcyjnymi niż te same bakterie posiadające je na swojej powierzchni. Jednocześnie badania te wykazały, że po usunięciu SLP, komórki bakterii były bardziej podatne na szkodliwe działanie jonów ołowiu. Autorzy sugerowali więc, że białka powierzchniowe mogą stanowić raczej barierę ochronną przed jonami metalu, a rolę w usuwaniu toksycznych jonów metali przypisywali raczej innym komponentom komórkowym, takim jak np. egzopolisacharydy [54, 55].

4.2. Udział polisacharydów w wiązaniu jonów metali ciężkich

Strukturami, które powszechnie występują na powierzchni bakterii Gram-dodatnich są polisacharydy. To zróżnicowane, zazwyczaj obojętne polimery, które mogą być kowalencyjnie bądź jonowo zwią-

zane z kwasem N-acetylomuramidowym w łańcuchu peptydoglikanu (cell wall polysaccharide – WPS). Kiedy polisacharydy są luźno połączone z otoczką komórkową i zachodzi ich uwalnianie do środowiska zewnątrzkomórkowego, oznaczane są jako EPS (extracellular polysaccharides). Polisacharydami otoczkowymi (capsular polysaccharides – CPS) nazywamy zaś struktury, które tworzą gęstą, ściśle związaną z błoną komórkową powłokę. Warto zauważyć, że w literaturze istnieją pewne nieścisłości w odniesieniu do definicji podanych grup, co przekłada się na nieprzestrzeganie nomenklatury w artykułach naukowych [15, 66].

Polisacharydy wytwarzane przez *Lactobacilli* to zazwyczaj heteropolisacharydy składające się z grup cukrowych, takich jak glukoza, ramnoza, galaktoza, a także N-acetyloglukozamina (GlcNAc) oraz N-acetylogalaktozamina. U niektórych szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* występują też reszty kwasu glukuronowego, fosforan, acetyl i grupy pirogromianowe. Istnieją również pewne szczepy bakterii zdolne są do syntetyzowania homopolisacharydów, takich jak glukany i fruktany z sacharozy [74].

Badania nad *Lactobacillus rhamnosus* GG pozwoliły na zidentyfikowanie u tego szczepu dwóch różnych klas EPS: zarówno długich i bogatych w galaktozę, jak i krótkich, obfitujących w glukozę/mannozę cząsteczek. Co ciekawe, mutanty *L. rhamnosus* CMPG5351 z inaktywowanym genem biosyntezy galaktozy wykazywały zwiększoną zdolność adhezji do linii komórkowej CaCo-2, w porównaniu do szczepu wyjściowego, co jest prawdopodobnie związane z osłanianiem adhezyn bakteryjnych [44].

Ze względu na lokalizację i obfitość, ww. struktury w znacznym stopniu decydują o właściwościach biologicznych bakterii. Liczne badania wskazują na udział polisacharydów w adhezji, tworzeniu biofilmu, wiązaniu metali ciężkich, agregacji bakterii oraz w zabezpieczaniu komórki przed działaniem czynników zewnętrznych tj. stres osmotyczny, antybiotyki, sole żółci, niskie pH, itp. [14, 67, 68].

Cennym narzędziem analitycznym pozwalającym potwierdzić udział egzopolisacharydów w przyłączaniu jonów metali ciężkich jest skaningowa mikroskopia elektronowa SEM [45]. Uzyskany obraz przed oraz po eksperymencie procesu biosorpcji ukazuje zmiany w morfologii polimerów ściany komórkowej uczestniczących w wiązaniu jonów metali [21, 67]. Dodatkowo, w połączeniu z techniką EDX możliwe jest uzyskanie informacji o rozmieszczeniu poszczególnych elementów na powierzchni biomasy. Należy jednak mieć na uwadze, iż zastosowanie powyższej techniki daje możliwość jedynie jakościowej oceny morfologii struktury zewnętrznej komórki [51].

Z wykorzystaniem odpowiednich metod instrumentalnych wykazano, że w wyniku kontaktu egzopolisa-

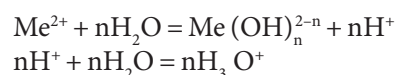
charydów z jonami metali dochodzi do wytworzenia kompleksów, które unieruchamiają metal. Badania pokazują, że powstały kompleks jest efektem elektrostatycznych oddziaływań pomiędzy ligandami metali, a negatywnie naładowanymi egzopolisacharydami [62, 75]. Powyższe obserwacje, pomimo, że odnoszące się do bakterii nie należących do LAB, potwierdzają funkcję jaką pełnią EPS u szczepu *L. rhamnosus* E/N. Przeprowadzone w ostatnim czasie eksperymenty wykazały, że zawartość jonów kadmu w tych strukturach po procesie biosorpcji wzrosła do 141% w porównaniu do początkowej zawartości jonów [67]. Wykorzystując technikę FT-IR zauważono wyraźne przesunięcia spektralne widm w pasmach, które pochodziły od drgań grup hydroksylowych, karboksylowych i karbonylowych, wskazując jednoznacznie na interakcję pomiędzy powyższymi grupami funkcyjnymi, a sorbatem [21, 67].

5. Czynniki wpływające na przebieg procesu biosorpcji

Oprócz budowy ściany komórkowej istotnym czynnikiem wpływającym na zdolności sorpcyjne bakterii są parametry fizykochemiczne. Do najważniejszych z nich zaliczyć można pH, temperaturę, siłę jonową, stężenie sorbatu i sorbentu, jak i obecność związków powierzchniowo czynnych. Sterowanie tymi czynnikami umożliwia przebieg biosorpcji w najkorzystniejszych warunkach, zapewniając jednocześnie największą wydajność procesu [85].

W oparciu o badania potwierdzające dominację wymiany jonowej nad innymi mechanizmami odpowiedzialnymi za proces biosorpcji, można wnioskować, że kluczowy wpływ na efektywność usuwania metali z roztworów wodnych ma wartość pH [7, 27]. Odczyn środowiska determinuje protonowanie/deprotonowanie miejsc wiążących jony metali wpływając na dostępność grup funkcyjnych dla sorbatu. Uważa się, że poszczególne grupy funkcyjne warunkują występowanie odmiennego punktu izoelektrycznego (wartości pH roztworu, przy której ładunek powierzchniowy jest zerowy) na powierzchni komórki. Gdy pH jest niższe od punktu izoelektrycznego, powierzchnia komórki bakteryjnej zyskuje ładunek dodatni, zaś powyżej tej wartości przyjmuje ładunek ujemny powodując tym samym przyciąganie kationów metali [98]. Jeśli zwiększa się wartość pH, następuje wzrost ładunku ujemnego na powierzchni biosorbentu do momentu, gdy wszystkie grupy funkcyjne ulegną deprotonacji. Sprzyja to nasileniu sił elektrostatycznych i adsorpcji jonów. Ponadto, uważa się, że podwyższony odczyn środowiska prowadzi do występowania większej liczby ujemnych grup funkcyjnych zdolnych do wiązania

jonów metali. Obserwuje się także spadek konkurencji pomiędzy protonami, a jonami metali, co jest spowodowane zmniejszeniem liczby jonów wodorowych obecnych w roztworze [94]. W związku z tym, gdy pH jest niskie, na skutek konkurencji o miejsca wiążące kationy i produkty kwaśnej hydrolizy, znacznie spadają zdolności sorpcyjne bakterii. Green-Ruiz i wsp. [32] zaproponowali dwie reakcje, które wyjaśniają przedstawione zjawisko:



Rozpatrując proces biosorpcji przez LAB w roztworach wodnych można stwierdzić że, niska wartość pH środowiska (< 3), a co za tym idzie duża liczba kationów wodorowych wiąże się z ograniczonym wiązaniem jonów metali. Dopiero wzrost tej wartości do pH 6 prowadzi do większej efektywności procesu. W tych warunkach grupy karboksylowe uczestniczące w procesie są naładowane ujemnie, co zwiększa wiązanie jonów metali. Jeśli zaś pH roztworu wzrasta powyżej tej wartości, odnotowuje się spadek rozpuszczalności jonów metali i możliwa jest ich precypitacja. Liczne badania wykazały, że największą wydajność biosorpcji osiąga się, jeśli odczyn środowiska ma wartość pH zbliżoną do 5,0 [40, 57, 73].

Obecność innych jonów metali w roztworze, na skutek konkurencji pomiędzy jonami sorbatu, zwiększa siłę jonową w roztworze i negatywnie wpływa na proces biosorpcji. Z drugiej jednak strony, wzrost stężenia biomasy bakteryjnej zwiększa powierzchnię sorpcyjną i liczbę miejsc wiążących, co w efekcie zwiększa liczbę związanych jonów metali [12]. Czasem jednak ilość przyłączonego metalu na jednostkę masy sorbentu spada wraz ze wzrostem jego dawki. Tłumaczy się to nakładaniem lub agregacją dostępnych miejsc wiążących, co w efekcie może prowadzić do mniejszego wychwytu jonów sorbatu [58, 63].

Obok stężenia, na wydajność procesu w znacznym stopniu wpływa rozmiar biosorbentu. Zwiększona powierzchnia kontaktu z jonem metalu przyczynia się do wzrostu efektywności procesu biosorpcji. Ponadto uważa się, że wraz ze wzrostem początkowego stężenia sorbatu w roztworze, zwiększa się ilość związanego metalu w jednostce masy biosorbentu. Wynika to z faktu, że początkowe stężenie metalu w roztworze pozwala przezwyciężyć opór pomiędzy fazą wodną a stałą [86].

Uważa się, że zmiana temperatury prowadzenia procesu biosorpcji w zakresie od 20 do 35°C nie ingeruje w znaczący sposób w jej przebieg. Dopiero wzrost temperatury powyżej 35°C prowadzi do wzrostu aktywności powierzchniowej i energii kinetycznej substancji rozpuszczonej, a tym samym wpływa korzystnie na wiązanie jonów metali ciężkich [85]. Inne doniesienia

literaturowe pokazują, że zmiana temperatury prowadzenia procesu z 15 do 30°C zwiększyła dwukrotnie (z 10,11 do 20,15 mg/g) skuteczność przyłączania jonów ołowiu do egzopolisacharydów *L. plantarum* 70810. Z kolei dalszy wzrost temperatury prowadzenia procesu wiązał się ze spadkiem wydajności biosorpcji do wartości 12,36 mg/g. Tłumaczy się to nasileniem ruchu atomów metalu. W tych warunkach może dochodzić do osłabienia oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy ligandem a sorbentem, co skutkuje uwolnieniem części jonów sorbatu [21, 81]. Pomijając te rozbieżności, należy mieć na uwadze fakt, że niekiedy zbyt wysoka temperatura może prowadzić do uszkodzenia ściany komórkowej bakterii. Dlatego też przyjmuje się, że najkorzystniej jest prowadzić proces przyłączania jonów metali w temperaturze pokojowej [85].

Udział w zwiększeniu skuteczności biosorpcji ma również powinowactwo metalu do biosorbentu, które można modulować poprzez wstępną obróbkę fizyczną lub chemiczną biomasy wpływającą na jej przepuszczalność i ładunek powierzchniowy, ułatwiając tym samym dostęp grup funkcyjnych do jonów metali [1].

6. Kinetyka procesu biosorpcji

Kinetyka biosorpcji wskazuje tempo, w jakim substancje rozpuszczone ulegają adsorpcji na powierzchni materiałów biologicznych. Pozwala to określić przydatność materiału biologicznego, który ma być wykorzystany, jako biosorbent jonów metali. W tym celu niezbędne jest wyznaczenie pojemności sorpcyjnej (q_e) określanej, jako masa jonów metalu, które uległy zaadsorbowaniu w suchej masie biosorbentu w stosunku do aktualnego stężenia w roztworze wodnym. Parametr Q_e opisuje wzór (1) przedstawiony poniżej, w którym V_0 i V_e to początkowa i końcowa objętość roztworu, która ulega kontaktowi z sorbentem; C_0 i C_e to stężenia początkowe i równowagowe metalu w roz-

tworze; m jest ilością biosorbentu, wyrażaną zazwyczaj, jako sucha masa [24].

$$q_e = \frac{C_0 V_0 - C_e V_e}{m} \quad (1)$$

Eksperymenty mające na celu określenie kinetyki biosorpcji polegają zazwyczaj na kontakcie biosorbentu z roztworem jonów (metoda batch) o znanym stężeniu początkowym. Kinetykę przeprowadzanego procesu śledzi się do momentu uzyskania równowagi w układzie sorpcyjnym, gdy nie obserwuje się już zmiany stężenia kationów w roztworze [85]. Badania kinetyczne dostarczają cennych informacji dotyczących prawdopodobnego mechanizmu biosorpcji, która obejmuje proces dyfuzji i reakcje chemiczne. Przyjmuje się, że transport sorbatu do wnętrza komórki przebiega w kilku etapach. W pierwszym z nich obserwuje się dyfuzję zewnętrzną – sorbat dyfunduje z objętości roztworu do warstwy cieczy, która otacza powierzchnię biomasy, a następnie transport substancji rozpuszczonej w całej warstwie granicznej. Kolejny etap to transport jonów metali przez pory do wewnętrznych części sorbentu i wychwyt cząsteczek przez miejsca aktywne. Ostatni, czwarty etap polega na sorpcji i desorpcji sorbatu [51].

Spośród wielu modeli kinetycznych opisanych w literaturze, najczęściej brane są pod uwagę te, które opierają się na porządku reakcji chemicznych, zwłaszcza modele Lagergrena (pseudo-I-rzędowy) i Ho (pseudo-II-rzędowy) (Tabela I). W wielu pracach dotyczących procesu biosorpcji zauważono jednak, że model zaproponowany przez Lagergrena jest odpowiedni tylko podczas początkowego etapu procesu. Wynika to głównie z wykorzystania liniowej formy równania, która wymaga znajomości pojemności sorpcyjnej (q_e). Dane na temat tego współczynnika nie są natomiast potrzebne w przypadku stosowania drugiego z przedstawionych modeli kinetycznych [90].

W momencie uzyskania stanu równowagi dynamicznej obserwowany jest rozdział jonów metalu

Tabela I
Wybrane modele kinetyczne opisujące proces biosorpcji

Model	Równanie	Forma liniowa równania	Piśmiennictwo
Pseudo-pierwszorzędowy Lagergrena	$\frac{dq_t}{dt} = k_1 (q_e - q_t)^2$	$\log (q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_1}{2.303} t$ $v_1 = k_1 q_e$ $v_1 = k_1 q_e$	[41]
Pseudo-drugorzędowy	$\frac{dq_t}{dt} = k_2 (q_e - q_t)^2$	$q_t = \frac{t}{\frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e}}$ $v_2 = k_2 q_e^2$	[37]

Objaśnienia: q_e i q_t – masa jonów metalu, które uległy adsorpcji na biosorbencie w stanie równowagi e i czasie t ; k_1 – stała szybkości modelu Lagergrena; v_1 – początkowa szybkość biosorpcji, k_2 – stała szybkości modelu pseudo-drugorzędowego; v_2 – początkowa szybkość adsorpcji

między roztworem i biosorbentem. Można go opisać za pomocą izoterm adsorpcji, które przedstawiają zależność, jaka występuje w stałej temperaturze pomiędzy ilością substancji zaadsorbowanej (jonów) przez jednostkę masy biosorbentu, a stężeniem równowagowym w adsorbencie. Powszechnie stosowanym modelem opisu równowagi sorpcyjnej jest zaproponowana przez Langmuira teoria adsorpcji jednowarstwowej [42]. Obejmuje ona kilka założeń. Mianowicie informuje, że na powierzchni adsorbentu występuje określona liczba miejsc aktywnych, które zdolne są do wiązania adsorbatu, a ich liczba jest proporcjonalna do wielkości powierzchni. Ponadto, jednemu miejscu aktywnemu odpowiada jedna cząsteczka adsorbentu, która nie ma możliwości swobodnego przemieszczania się na powierzchni adsorbentu. Zjawisko to nazywane jest adsorpcją zlokalizowaną. Dodatkowo, nie obserwuje się wzajemnych oddziaływań pomiędzy zaadsorbowanymi cząsteczkami, a powstała warstwa adsorpcyjna powoduje zmniejszenie sił adsorpcyjnych i tworzy się w ten sposób warstwa jednocząsteczkowa. W konsekwencji procesu, maksymalne stężenie warstwy powierzchniowej równa się ilości występujących na powierzchni adsorbentu miejsc aktywnych [47]. Z uwagi na to, że w analizowanym środowisku mogą znajdować się jony różnych metali ciężkich, które wiążą się na powierzchni biosorbentu, niezwykle pomocne w planowaniu procesu biosorpcji jest zastosowanie modeli wieloskładnikowych. Najbardziej powszechnie stosowana jest izoterma BET (Brunauer-Emmett-Teller) wykorzystująca prosty model jednoskładnikowy, przy założeniu, że równanie Langmuira dotyczy każdej warstwy [22].

7. Podsumowanie

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, wchodzące w skład mikroflory błon śluzowych ludzi oraz zwierząt, są przykładem bakterii o działaniu prozdrowotnym, a coraz częściej zauważany i doceniany jest ich potencjał, jako wydajnych sorbentów metali ciężkich. Duży wpływ na działanie detoksykacyjne *lactobacilli* wobec pierwiastków wynika z budowy ich ściany komórkowej. Z tego względu, określenie udziału poszczególnych struktur komórkowych bakterii w procesie biosorpcji jest ważnym etapem poznawczym, dającym wgląd w potencjał bakterii, które mogą zostać wykorzystane do usuwania jonów metali nie tylko ze środowiska, ale również z przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt.

Piśmiennictwo

1. Abbas S.H., Ismail I.M., Mostafa T.M., Sulaymon A.H.: Biosorption of heavy metals: a review. *J. Chem. Science Technol.* **3**, 74–102 (2014)
2. Abernethy D.R., DeStefano A.J., Cecil T.L., Zaidi K., Williams R.L.: Metal impurities in food and drugs. *Pharm. Res.* **27**, 750–755 (2010)
3. Ahemad M., Kibret M.: Recent trends in microbial biosorption of heavy metals: a review. *Biochem. Molecul. Biol.* **1**, 19–26 (2013)
4. Åvall-Jääskeläinen S., Palva A.: *Lactobacillus* surface layers and their applications. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 511–529 (2005)
5. Aziz R., Rafiq M.T., Yang J., Liu D., Lu L., He L., Daud M.K., Li T., Yang X.: Impact Assessment of Cadmium Toxicity and Its Bioavailability in Human Cell Lines (Caco-2 and HL-7702). *BioMed Res. Int.* DOI:10.1155/2014/839538 (2014)
6. Båth K., Roos S., Wall T., Jonsson H.: The cell surface of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 highlighted by identification of 126 extracellular proteins from the genome sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* **253**, 75–82 (2005)
7. Bayramoğlu G., Yakup Arica M.: Construction a hybrid biosorbent using *Scenedesmus quadricauda* and Ca-alginate for biosorption of Cu(II), Zn(II) and Ni(II): kinetics and equilibrium studies. *Bioresour. Technol.* **100**, 186–193 (2009)
8. Bernhoft R.A.: Cadmium toxicity and treatment. *Sci. World. J.* DOI:10.1155/2013/394652 (2013)
9. Bhakta J.N., Ohnishi K., Munekage Y., Iwasaki K., Wei M.Q.: Characterization of lactic acid bacteria-based probiotics as potential heavy metal sorbents. *J. Appl. Microbiol.* **112**, 1193–1206 (2012)
10. Bishak Y.K., Payahoo L., Osatdrahimi A., Nourazarian A.: Mechanisms of cadmium carcinogenicity in the gastrointestinal tract. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **16**, 9–21 (2015)
11. Buda B., Dylus E., Górski-Frączek S., Brzozowska E., Gamian A.: Właściwości biologiczne białek powierzchniowych bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. *Post. Hig. Med. Dośw.* **67**, 229–237 (2013)
12. Bueno B.Y.M., Torem M.L., Moa F., De Mesquita L.M.S.: Biosorption of lead(II), chromium(III) and copper(II) by *R. opacus*: equilibrium and kinetic studies. *Miner. Eng.* **21**, 65–75 (2008)
13. Cannino G., Ferruggia E., Luparello C., Rinaldi A.M.: Cadmium and mitochondria. *Mitochondrion*, **9**, 377–384 (2009)
14. Cescutti P.: Bacterial capsular polysaccharides and exopolysaccharides (w) Microbial glycobiology. Structures, relevance and applications, red. A.P. Moran, O. Holst, P.J. Brennan, M. von Itzstein, Elsevier, Amsterdam, 2009, s. 93–108
15. Chapot-Chartier M.P., Kulakauskas S.: Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microb. Cell Fact.* DOI: 10.1186/1475-2859-13-S1-S9 (2014)
16. Czechtot H., Majewska M.: Kadm – zagrożenia i skutki zdrowotne. *Farm. Pol.* **66**, 243–250 (2010)
17. Czechtot H., Skrzycki M.: Kadm – pierwiastek całkowicie zbędny dla organizmu. *Post. Hig. Med. Dośw.* **64**, 38–49 (2010)
18. Di Cerbo A., Palmieri B.: Review: The market of probiotics. *Pak. J. Pharm. Sci.* **28**, 2199–2206 (2015)
19. Dohm N., Petri A., Schlander M., Schlott B., König H., Claus H.: Molecular and biochemical properties of the S-layer protein from the wine bacterium *Lactobacillus hilgardii*. *Arch. Microbiol.* **193**, 251–261 (2011)
20. Farnworth E.R.: The evidence to support health claims for probiotics. *J. Nutr.* **138**, 1250–1254 (2008)
21. Feng M., Chen X., Li C., Nurgul R., Dong M.: Isolation and identification of an exopolysaccharide-producing lactic acid bacterium strain from chinese paocai and biosorption of Pb(II) by its exopolysaccharides. *J. Food Sci.* **77**, 111–117 (2012)
22. Fomina M., Gadd G.M.: Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. *Bioresour. Technol.* **160**, 3–14 (2014)
23. Frece J., Kos B., Svetec I.K., Zgaga Z., Mrsa V., Sušćević J.: Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* **98**, 285–292 (2005)

24. Gadd G.M.: Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **84**, 13–28 (2009)
25. Gadd G.M.: Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, **156**, 609–643 (2010)
26. Gajewska J., Błaszczak M.K.: Probiotyczne bakterie fermentacji mlekowej (LAB). *Post. Mikrobiol.* **51**, 55–65 (2012)
27. Gao J.F., Zhang Q., Wang J.H., Wu X.L., Wang S.Y., Peng Y.Z.: Contributions of functional groups and extracellular polymeric substances on the biosorption of dyes by aerobic granules. *Bioresour. Technol.* **102**, 805–813 (2011)
28. Gerbino E., Carasi P., Araujo-Andrade C., Tymczyszyn E., Gómez-Zavaglia A.: Role of S-layer proteins in the biosorption capacity of lead by *Lactobacillus kefir*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 583–592 (2015)
29. Gerbino E., Mobili P., Tymczyszyn E.E., Fausto R., Gómez-Zavaglia A.: FTIR spectroscopy structural analysis of the interaction between *Lactobacillus kefir* S-layers and metal ions. *J. Mol. Struct.* **987**, 186–192 (2011)
30. Gerbino E., Mobili P., Tymczyszyn E.E., Frausto-Reyes C., Araujo-Andrade C., Gómez-Zavaglia A.: Use of Raman spectroscopy and chemometrics for the quantification of metal ions attached to *Lactobacillus kefir*. *J. Appl. Microbiol.* **112**, 363–371 (2012)
31. Gratz S., Taubel M., Juvonen R.O., Viluksela M., Turner P.C., Mykkanen H., El-Nezami H. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG modulates intestinal absorption, fecal excretion, and toxicity of aflatoxin B1 in rats. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 7398–7400 (2006)
32. Green-Ruiz C., Rodriguez-Tirado V., Gomez-Gil B.: Cadmium and zinc removal from aqueous solutions by *Bacillus jeotgali*: pH, salinity and temperature effects. *Bioresour. Technol.* **99**, 3864–3870 (2008)
33. Halttunen T., Salminen S., Meriluoto J., Tahvonen R., Lertola K.: Reversible surface binding of cadmium and lead by lactic acid and bifidobacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **125**, 170–175 (2008)
34. Halttunen T., Salminen S., Tahvonen R.: Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **114**, 30–35 (2007)
35. He P., Lu Y., Liang Y., Chen B., Wu M., Li S., He G., Jin T.: Exposure assessment of dietary cadmium: findings from shanghai residents over 40 years, China. *BMC Public Health*. DOI: 10.1186/1471-2458-13-590 (2013)
36. Hill C., Sanders M.E. i wsp.: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastro. Hepat.* **11**, 506–514 (2014)
37. Ho Y.S., McKay G.: Pseudo-second order model for sorption processes. *Process Biochem.* **34**, 451–465 (1999)
38. Hu S., Kong J., Sun Z., Han L., Kong W., Yang P.: Heterologous protein display on the cell surface of lactic acid bacteria mediated by the S-layer protein. *Microb. Cell Fact.* DOI:10.1186/1475-2859-10-86 (2011)
39. Hynönen U., Palva A.: *Lactobacillus* surface layer proteins: structure, function and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 5225–5243 (2013)
40. Ibrahim F., Halttunen T., Tahvonen R., Salminen S.: Probiotic bacteria as potential detoxification tools: assessing their heavy metal binding isotherms. *Can. J. Microbiol.* **52**, 877–885 (2006)
41. Lagergren S.: Zur theorie der sogenannten adsorption gelöster stoffe. *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens. Handlingar.* **24**, 1–39 (1898)
42. Langmuir I.: The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *J. Am. Chem. Soc.* **40**, 1361–1403 (1918)
43. Lebeer S., Vanderleyden J., De Keersmaecker S.C.J.: Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 728–764 (2008)
44. Lebeer S., Verhoeven T.L., Francius G., Schoofs G., Lambrichts I., Dufrene Y., Vanderleyden J., De Keersmaecker S.C.: Identification of a gene cluster for the biosynthesis of a long, galactose-rich exopolysaccharide in *Lactobacillus rhamnosus* GG and functional analysis of the priming glycosyltransferase. *Appl. Environ. Microb.* **75**, 3554–3563 (2009)
45. Li W.W., Yu H.Q.: Insight into the roles of microbial extracellular polymer substances in metal biosorption. *Bioresour. Technol.* **160**, 15–23 (2014)
46. Lin Z., Zhou C., Wu J., Zhou J., Wang L.: A further insight into the mechanism of Ag⁺ biosorption by *Lactobacillus* sp. strain A09. *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.* **61**, 1195–1200 (2005)
47. Liu Y., Liu Y.J.: Biosorption isotherms, kinetics and thermodynamics. *Sep. Purif. Technol.* **61**, 229–242 (2008)
48. Lortal S., Vanheijenoort J., Gruber K., Sleytr U.B.: S-layer of *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046: isolation, chemical characterization and re-formation after extraction with lithium chloride. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 611–618 (1992)
49. Marraffini L.A., Dedent A.C., Schneewind O.: Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 192–221 (2006)
50. Mercan E., İspirli H., Sert D., Yilmaz M.T., Dertli E.: Impact of exopolysaccharide production on functional properties of some *Lactobacillus salivarius* strains. *Arch. Microbiol.* **197**, 1041–1049 (2015)
51. Michalak I., Chojnacka K., Witek-Krowiak A.: State of the art for the biosorption process – a review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **170**, 1389–1416 (2013)
52. Millette M., Luquet F.M., Ruiz M.T., Lacroix M.: Characterization of probiotic properties of *Lactobacillus* strains. *Dairy Sci. Technol.* **88**, 695–705 (2008)
53. Monachese M., Burton J.P., Reid G.: Bioremediation and tolerance of humans to heavy metals through microbial processes: a potential role for probiotics? *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 6397–6404 (2012)
54. Moppert X., Costaouec T.L., Raguene G., Courtois A., Simon-Colin C., Crassous P., Costa B., Guezennec J.: Investigations into the uptake of copper, iron and selenium by a highly sulphated bacterial exopolysaccharide isolated from microbial mats. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 599–604 (2009)
55. Morillo Perez J.A., Garcia-Ribera R., Quesada T., Aguilera M., Ramos-Cormenzana A., Monteoliva-Sanchez M.: Biosorption of heavy metals by the exopolysaccharide produced by *Paenibacillus jamilae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 2699–2704 (2008)
56. Mrvčić J., Prebeg T., Barišić L., Stanzer D., Bačun-Družina V., Stehlik-Tomas V.: Zinc binding by lactic acid bacteria. *Food Technol. Biotechnol.* **47**, 381–388 (2009)
57. Mrvčić J., Stanzer D., Solić E., Stehlik-Tomas V.: Interaction of lactic acid bacteria with metal ions: opportunities for improving food safety and quality. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 2771–2782 (2012)
58. Nadeem R., Hanif M.A., Shaheen F., Perveen S., Zafar M.N., Iqbal T.: Physical and chemical modification of distillery sludge for Pb(II) biosorption. *J. Hazard. Mater.* **150**, 335–342 (2008)
59. Ninkov M., Kataranovski M. i wsp.: Toxicity of oral cadmium intake: Impact on gut immunity *Toxicol. Lett.* **237**, 89–99 (2015)
60. Nordberg G.F., Nogawa K., Nordberg M., Friberg L.: Cadmium (w) Handbook of the Toxicology of Metals, red. G.F. Nordberg, B.F. Fowler, M. Nordberg, L. Friberg, Elsevier, Amsterdam, 2007, s. 445–486

61. Oleńska E., Małek W.: Mechanizmy oporności bakterii na metale ciężkie. *Post. Mikrobiol.* **52**, 363–371 (2013)
62. Pal A., Paul A.K.: Microbial extracellular polymeric substances central elements in heavy metal bioremediation. *Ind. J. Microbiol.* **48**, 49–64 (2008)
63. Pal A.A., Ghosh S., Paul A.K.: Biosorption of cobalt by fungi from serpentine soil. *Bioresour. Technol.* **97**, 1253–1258 (2006)
64. Pardo R., Herguedas M., E. Barrado E., Vega M.: Biosorption of cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass of *Pseudomonas putida*. *Anal. Bioanal. Chem.* **376**, 26–32 (2003)
65. Patra R.C., Rautray A.K., Swarup D.: Oxidative stress in lead and cadmium toxicity and its amelioration. *Vet. Med. Int.* DOI: 10.4061/2011/457327 (2011)
66. Patten D.A., Laws A.P.: *Lactobacillus*-produced exopolysaccharides and their potential health benefits: a review. *Benef. Microbes.* **6**, 457–471 (2015)
67. Polak-Berecka M., Sz wajgier D., Waśko A.: Biosorption of Al^{+3} and Cd^{+2} by an Eopolysaccharide from *Lactobacillus rhamnosus*. *J. Food Sci.* **79**, T2404–T2408 (2014)
68. Polak-Berecka M., Waśko A., Paduch R., Skrzypek T., Sroka-Bartnicka A.: The effect of cell surface components on adhesion ability of *Lactobacillus rhamnosus*. *Anton. Leeuw.* **106**, 751–762 (2014)
69. Qin Z., Buehler M.J.: Molecular dynamics simulation of the α -helix to β -sheet transition in coiled protein filaments: evidence for a critical filament length scale. *Phys. Rev. Lett.* DOI:http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevLett.104.198304 (2010)
70. Rani A., Kumar A., Lal A., Pant M.: Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *Int. J. Environ. Health Res.* **24**, 378–399 (2014)
71. Sarkar A., Ravindran G., Krishnamurthy V.: A brief review on the effect of cadmium toxicity: from cellular to organ level. *Int. J. Bio. Tech. Res.* **3**, 17–36 (2013)
72. Schauder A., Avital A., Malik Z.: Regulation and gene expression of heme synthesis under heavy metal exposure-review. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **29**, 137–158 (2010)
73. Schut S., Zauner S., Hampel G., König H., Claus H.: Biosorption of copper by wine-relevant lactobacilli. *Int. J. Food Microbiol.* **145**, 126–131 (2011)
74. Sengupta R., Altermann E., Anderson R.C., McNabb W.C., Moughan P.J., Roy N.C.: The role of cell surface architecture of lactobacilli in host-microbe interactions in the gastrointestinal tract. *Mediators Inflamm.* DOI:10.1155/2013/237921 (2013)
75. Shuhong Y., Meipin Z., Hong Y., Han W., Shan X., Yan L., Jihui W.: Biosorption of Cu^{2+} , Pb^{2+} and Cr^{6+} by a novel exopolysaccharide from *Arthrobacter ps-5*. *Carbohydr. Polym.* **101**, 50–56 (2014)
76. Sleytr U.B., Schuster B., Egelseer E.M., Pum D.: S-layers: principles and applications. *FEMS. Microbiol. Rev.* **38**, 823–864 (2014)
77. Tian F., Xiao Y., Li X., Zhai Q., Wang G., Zhang Q., Zhang H., Chen W.: Protective effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8246 against copper toxicity in mice. *PLoS One*, **10**, e0143318 (2015)
78. Topcu A., Bulat T.: Removal of cadmium and lead from aqueous solution by *Enterococcus faecium* strains. *J. Food Sci.* **75**, T13–T17 (2010)
79. Torino M.I., Font de Valdez G., Mozzi F.: Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages. *Front. Microbiol.* DOI:10.3389/fmicb.2015.00834 (2015)
80. Tulumoglu S., Yuksekdağ Z.N., Beyatlı Y., Simsek O., Cinar B., Yaşar E.: Probiotic properties of lactobacilli species isolated from children's feces. *Anaerobe.* **24**, 36–42 (2013)
81. Uslu G., Tanyol M.: 2006.: Equilibrium and thermodynamic parameters of single and binary mixture biosorption of lead (II) and copper (II) ions onto *Pseudomonas putida*: effect of temperature. *J. Hazard. Mater.* **B135**, 87–93 (2006)
82. Valko M., Morris H., Cronin M.T.D.: Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* **12**, 1161–1208 (2005)
83. Van Kerkhove E., Pennemans V., Swennen Q.: Cadmium and transport of ions and substances across cell membranes and epithelia. *BioMetals.* **23**, 823–855 (2010)
84. Vesey D.A.: Transport pathways for cadmium in the intestine and kidney proximal tubule: focus on the interaction with essential metals. *Toxicol. Lett.* **198**, 13–19 (2010)
85. Vijayaraghavan K., Yun Y.S.: Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnol. Adv.* **26**, 266–291 (2008)
86. Volesky B.: Biosorption and me. *Water Res.* **41**, 4017–4029 (2007)
87. Vrieze A., Holleman F., Zoetendal E., de Vos W., Hoekstra J., Nieuwdorp M.: The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetologia.* **53**, 606–613 (2010)
88. Waalkes M.P.: Cadmium carcinogenesis. *Mutat. Res.* **533**, 107–120 (2003)
89. Wang B., Shao C., Li Y., Tan Y., Cai L.: Cadmium and its epigenetic effects. *Curr. Med. Chem.* **19**, 2611–2620 (2012)
90. Wang J., Chen C.: Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnol. Adv.* **27**, 195–226 (2009)
91. Waśko A., Polak-Berecka M., Paduch R., Jóźwiak K.: The effect of moonlighting proteins on the adhesion and aggregation ability of *Lactobacillus helveticus*. *Anaerobe.* **30**, 161–168 (2014)
92. Wells J.M.: Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. *Microb. Cell Fact.* DOI:10.1186/14752859-10-S1-S17 (2011)
93. Wu K.C., Liu J.J., Klaassen C.D.: Nrf2 activation prevents cadmium-induced acute liver injury. *Toxicol. App. Pharmacol.* **263**, 14–20 (2012)
94. Zamil S., Ahmad S.S., Choi M.H., Park J.Y., Yoon S.C.: Correlating metal ionic characteristics with biosorption capacity of *Staphylococcus saprophyticus* BMSZ711 using QICAR model. *Bioresour. Technol.* **100**, 1895–1902 (2009)
95. Zhai Q., Narbad A., Chen W.: Dietary strategies for the treatment of cadmium and lead toxicity. *Nutrients.* **7**, 552–571 (2015)
96. Zhai Q., Wang G., Zhao J., Liu X., Narbad A., Chen Y.Q., Zhang H., Tian F., Chen W.: Protective effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 against chronic cadmium toxicity in mice indicate routes of protection besides intestinal sequestration. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 4063–4071 (2014)
97. Zhai Q., Wang G., Zhao J., Liu X., Tian F., Zhang H., Chen W.: Protective effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 against acute cadmium toxicity in mice. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 1508–1515 (2013)
98. Zouboulis A.I., Loukidou M.X., Matis K.A.: Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils. *Process Biochem.* **39**, 909–916 (2004)

Hubert Antolak^{1*}, Dorota Kręgiel¹

¹ Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Politechnika Łódzka

Wpłynęło w marcu 2016 r.
Zaakceptowano w lipcu 2016 r.

1. Charakterystyka *Asaia* sp. 2. Zdolności adaptacyjne. 3. Zakażenia oportunistyczne. 4. Symbionta moskitów i walka z malarią. 5. Podsumowanie

Acetic acid bacteria *Asaia* sp. and their unique adaptive abilities

Abstract: The natural environment for acetic bacteria of the genus *Asaia* are Asian fruits, flowers and insects. They are also isolated from spoiled soft drinks in Europe. These bacteria are classified as saprophytes, but there have been some cases of bacteremia caused by *Asaia lannensis* and *A. bogorensis* strains. They are also isolated as microbiota of mosquitoes in the tropical climate. Their unique adaptation abilities, such as genes encoding adhesins which help them colonize the environment as well as operons responsible for survival under various conditions, make *Asaia* sp. potential microorganisms to be used in the fight against malaria.

1. Characteristics of *Asaia* sp. 2. Adaptability. 3. Opportunistic infections. 4. Mosquito symbionts and the fight against malaria. 5. Summary

Słowa kluczowe: *Asaia* sp., oportunistyczne patogeny, symbionty, zdolności adaptacyjne
Key words: adaptability, *Asaia* sp., opportunistic pathogens, symbionts

1. Charakterystyka *Asaia* sp.

Asaia sp. to bakterie kwasu octowego (AAB), należące do klasy α -*Proteobacteria*, rodziny *Acetobacteraceae*. W obrębie rodzaju wyróżnia się 8 gatunków tych bakterii: *Asaia bogorensis* [35], *A. siamensis* [28], *A. krungthepensis* [36], *A. lannensis* [26], *A. spathodeae* [23], *A. astilbis* [32], *A. platycodi* [32], *A. prunellae* [32]. Ich komórki osiągają 0,5–1,0 μ m szerokości i 1,0–2,0 μ m długości. To tlenowe, nieprzetrwalnikujące, Gram-ujemne pałeczki, które wykazują zdolność ruchu dzięki urzęsieniu peritrichalnemu. Charakteryzują się aktywnością katalazy (EC 1.11.1.6) lecz nie wykazują aktywności oksydazy cytochromowej IV (EC 1.9.3.1).

Bakterie z rodzaju *Asaia* zasiedlają nisze ekologiczne bogate w sacharydy, takie jak glukoza, fruktoza czy sacharoza, stanowiące dla nich podstawowe źródło węgla i energii. Izolowane są zarówno z egzotycznych kwiatów, owoców, ale również z narządów azjatyckich i afrykańskich komarów *Anopheles stephensi* i *An. gambiae* [12, 30]. Stanowią także dość częste zanieczyszczenie smakowych wód mineralnych oraz napojów izotonicznych w Europie [16, 25, 29]. Należą do mikroorganizmów mezofilnych, które wykazują najlepszy wzrost w temperaturze 25–30°C i pH w zakresie 4–5. Jednak wykazano, że szczepy wyizolowane jako zanieczyszczenie napojów charakteryzują się zdolnością wzrostu w bardziej zakwaszonych środowiskach, osiągających poziom pH 3 [16]. Z kolei izolaty otrzymane z materiału klinicznego wykazują wzrost w tempera-

turze powyżej 35°C [33]. Na pożywkach hodowlanych zawierających m.in. glukozę i węglan wapnia, *Asaia* sp. tworzą regularne, łososiowe, różowe bądź kremowe kolonie o średnicy 1–2 mm ze strefami przejaśnienia wskutek produkowanych kwasów organicznych [24].

Namnażanie bakterii z rodzaju *Asaia* w napojach bezalkoholowych prowadzi do zmętnień oraz powstawania kłaczkowatych struktur, zbudowanych z komórek bakteryjnych oraz zewnątrzkomórkowych związków polimerowych (EPS). Synteza oraz charakter wytwarzanych związków zależne są m.in. od rodzaju źródła węgla w środowisku bytowania bakterii. Udowodniono, że wytwarzanie substancji zewnątrzkomórkowych przebiega wydajniej w środowiskach zawierających sacharozę [16, 21, 24]. W badaniach przeprowadzonych przez Kato zaobserwowano, że w środowisku bogatym w ten sacharyd izolaty *Asaia* sp. zdolne są do syntezy pozakomórkowego, rozpuszczalnego w wodzie β -(2,6)-fruktanu [21]. Z kolei Moonmangmee i wsp. stwierdzili, że *A. bogorensis* wykazuje zdolność do tworzenia nie tylko zewnątrzkomórkowych polimerów sacharydowych, ale również polimerów kapsułkowych, otaczających komórki bakteryjne [28]. Uważa się, że wytworzone polimery stanowią źródło pierwiastków biogennych, które wykorzystywane są przez komórki do podstawowych funkcji życiowych w warunkach głodowych. Wykazano, że EPS ułatwia nie tylko koagregację komórek, ale także adhezję bakterii do różnych materiałów abiotycznych – polistyrenu, polipropylenu lub politereftalanu etylenu [16, 24, 29].

* Autor korespondencyjny: Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Politechnika Łódzka, ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź; e-mail: hubert.antolak@gmail.com

2. Zdolności adaptacyjne

Badania nad genomem tych bakterii wykazują, że charakteryzują się one wyjątkowymi zdolnościami adaptacyjnymi do nowych środowisk. Zsekwencjonowany genom *A. bogorensis* NBRC 16594 ma wielkość 3 198 265 par zasad kodujących 2 758 genów. Badania na poziomie molekularnym dowodzą, że *A. bogorensis* są filogenetycznie blisko spokrewnione z innymi bakteriami kwasu octowego *Gluconobacter oxydans* [22]. Jednak, analiza genomu *A. bogorensis* wykazała również, że bakterie te posiadają geny wspólne z innymi bakteriami należącymi do AAB – *Granulibacter bethesdensis*, izolowanymi od osób z przewlekłą chorobą ziarniniakową (GCD). W materiale genetycznym *Asaia bogorensis* zidentyfikowano geny kodujące białka adhezyny określanej mianem specyficznie-patogennej. Geny kodujące białko HecA, odpowiedzialne za agregację i adhezję komórek, obecne są również u bakterii odpowiedzialnych między innymi za choroby roślin. Występują u *Pectobacterium atrosepticum* oraz *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya dadantii*), powodujących między innymi zgniliznę ziemniaków. Wykazano, że białko HecA odpowiedzialne jest za agregację komórek *Nicotiana clevelandii* wywołujących nekrozę liści tych roślin. Dodatkowo, białko to jest homologiem do włókienkowej hemaglutyniny (FHA) występującej u *Bordetella pertussis*, będących czynnikiem etnologicznym krztuśca, czy *Klebsiella pneumoniae* odpowiedzialnych za zapalenie płuc [15]. Zidentyfikowano także dodatkowe geny odpowiedzialne za hamowanie procesów utleniania oraz geny oporności na antybiotyki. Badania Kawai i wsp. wykazały, że *Asaia bogorensis* zawiera dwa kompletne operony kodujące oksydazy cytochromowe typu *bo*₃: *cyoABCD-1* i *cyoABCD-2* [22]. Analiza porównawcza transkryptomów wykazała, że *A. bogorensis* charakteryzuje się niższym poziomem ekspresji *cyoABCD-1* w hodowli zawierającej komórki HEK293 (Human Embryonic Kidney 293 cells), niż w hodowli klasycznych dla bakterii kwasu octowego z zastosowaniem podłoża YPGD (1.0% ekstrakt drożdżowy, 1.0% pepton, 2.0% glicerol, 0.5% glukoza). Z kolei, w hodowli tych drobnoustrojów z innymi typami komórek obserwowano wysoką ilość transkryptu drugiego z operonów [22]. Spośród ponad 700 rodzajów bakterii, 98 gatunków zawiera geny *cyoABCD*, ale tylko 8, pomijając *A. bogorensis*, wykazuje obecność dwóch operonów *cyo*. Większość z tych gatunków stanowią bakterie patogenne lub symbiotyczne: *Bordetella bronchiseptica*, *Burkholderia pseudomallei*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Ralstonia solanacearum* [22].

Wykorzystanie transkryptomiki pozwoliło na odnotowanie zwiększonego poziomu ekspresji niektórych genów *A. bogorensis* w hodowlach zawierających komórki linii McCoy. Badania te wykazały, że poziom

ekspresji genów oporności na stres środowiskowy w obecności komórek somatycznych był znacznie wyższy w porównaniu do klasycznych laboratoryjnych warunków hodowli. Wykazano zwiększony poziom ekspresji genu *RpoH* spełniającego rolę biologicznego sensora zmian temperatury. Co ciekawe, pomimo tego zjawiska, poziom ekspresji genów odpowiadających za białka szoku cieplnego (HSP, Heat Shock Protein) był znacząco niższy. Wiele prac doświadczalnych wykazało, że synteza HSP przez bakterie prowadzi do odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Możliwe jest zatem, że zachowanie niskiego poziomu HSP stanowi strategię, umożliwiającą przetrwanie i rozprzestrzenienie komórek *A. bogorensis* w organizmie gospodarza [22].

Dodatkowo, za adaptację do środowisk o niższej zawartości tlenu odpowiedzialne są oksydazy cytochromu typu *bd* (operon *cydAB*), wykazujące wysokie powinowactwo do tlenu. Wykazano, że *Asaia platycodi* charakteryzują się zdolnością do prowadzenia oksydatywnej fosforylacji niezależnej od terminalnej oksydazy cytochromu *aa*₃, która wykazuje niskie powinowactwo do tlenu. Dlatego też, bakterie te mogą zaadaptować się do środowisk o obniżonym stężeniu tlenu, takich jak przewód pokarmowy komarów [9]. Badania Chouaia wykazały, że *Asaia platycodi* posiadają między innymi system sekrecji typu IV umożliwiający wymianę materiału genetycznego między drobnoustrojami czy wprowadzenie cząstek efektorowych do wnętrza gospodarza, a także tworzenie biofilmów i kolonizację środowiska [9]. Dodatkowo, zdiagnozowano u nich system transporterów błonowych należących do rodziny ABC. Charakteryzują się one zdolnością do aktywnego usuwania leków, w skład których wchodzi między innymi tetracyklina, fluorochinolony, makrolidy, linkozamidy, aminoglikozydy, chloramfenikol, rifampicina [18]. Obecność tych genów przyczynia się prawdopodobnie do zwiększonej oporności na antybiotyki. Dodatkowo, *Asaia* sp. posiadają geny kodujące biosyntezę wici (*MotA*, *MotB*, *FlaA*, *FlaB*, *FlgC*, *FlgD*) a także fimbrii (*sF-Chap* i *sF-UshP*) [9]. Geny odpowiedzialne za naprzemienne aktywności operonów cytochromowych, system sekrecji typu IV, obecność wici lub fimbrii oraz adhezyn specyficznie patogennych mogą odpowiadać za kolonizację, adaptację i interakcję między gospodarzem a bakteriami. Mogą być one kluczem wyjaśniającym zdolności adaptacyjne bakterii *Asaia* sp. do coraz to nowych środowisk, nie tylko takich jak kwiaty i owoce, napoje czy nawet organizmy ssaków, ale także tak specyficznych jak organizm moskitów *Anopheles* sp. [22].

3. Zakażenia oportunistyczne

Dotychczas nie potwierdzono przypadku choroby bezpośrednio wywołanej bakteriami należącymi do rodzaju *Asaia*. Jednak doniesienia literaturowe świadczą,

że bakterie te często izolowane są od osób z obniżoną odpornością organizmu, po długotrwałej terapii lekowej, z chorobami serca czy układu oddechowego [13, 14].

Pierwszy odnotowany przypadek wyizolowania bakterii z rodzaju *Asaia* z materiału klinicznego dotyczył pacjenta hospitalizowanego z powodu zapalenia otrzewnej. Izolat *A. bogorensis* otrzymano z materiału klinicznego pozyskanego od 41-letniej kobiety, która ze względu na zaawansowaną chorobę nerek poddawana była długotrwałym dializom [31]. Kolejny przypadek dotyczył 23-letniego pacjenta, wykazującego zakażenie ogólnoustrojowe. Wywiad lekarski wykazał, że w ciągu ostatnich lat pacjent przechodził liczne operacje chirurgiczne związane z mięśniakiem Ewing'a oraz był poddawany hospitalizacji z powodu przewlekłego enterokokowego zapalenia stawów. Długotrwałe terapie antybiotykowe z zastosowaniem amoksycyliny i klindamycyny doprowadziły do utraty odporności i konieczności zastosowania substytucyjnego leczenia metadonem. W posiewach krwi pacjenta stwierdzono obecność antybiotykoodpornych, tlenowych pałeczek, których diagnostyka tradycyjnymi metodami biochemicznymi była nieskuteczna. W wyniku analiz genetycznych stwierdzono, że za infekcję odpowiadają bakterie *A. bogorensis* [33]. Podobny przypadek bakterii wywołanej przez szczep z gatunku *A. bogorensis* opisano u 20-letniej kobiety nadużywającej leków [34].

Pierwszy raport wyizolowania bakterii *A. lannensis* z materiału klinicznego dotyczył 3-letniego chłopca, u którego zdiagnozowano nawrót rdzeniaka. Historia karty pacjenta obejmowała również pancytopenię, zapalenie błony śluzowej oraz rzekomobłoniaste zapalenie jelita wywołane przez *Clostridium difficile*. Dalsze badania wykazały niedociśnienie tętnicze, tachykardię i gorączkę 40°C. W trakcie hospitalizacji chłopiec poddawany był lekoterapii z zastosowaniem meropenemu, wankomycyny i cefepimu. Z posiewu z krwi pacjenta wyizolowano bakterie, które zidentyfikowano za pomocą metod genetycznych jako *A. lannensis*. Podobnie jak w przypadku *A. bogorensis*, bakterie wykazywały niską wrażliwość bądź całkowitą oporność na penicyliny, cefalosporyny, karbapenemy, fluorochinolony, aztreonam i amikacynę, czyli antybiotyki powszechnie stosowane przeciwko bakteriom Gram-ujemnym [1]. Bakterie z rodzaju *Asaia* identyfikowane były również z materiału klinicznego innych pacjentów pediatrycznych. W 2007 roku wyizolowano bakterie *A. lannensis* u 15-miesięcznej dziewczynki, z diagnozą niewydolności serca związaną z kardiomiopatią. Kilka tygodni wcześniej zdiagnozowano u niej infekcję wirusową górnych dróg oddechowych. Późniejsze badania echokardiograficzne ujawniły osłabienie funkcji serca. W trakcie hospitalizacji u pacjentki wystąpiła hipotensja, połączona z wysoką gorączką, a posiew krwi ujawnił obecność tlenowych, Gram-ujemnych pałeczek.

Zastosowano leczenie z wykorzystaniem meropenu i wankomycyny. Podobne wyniki otrzymano w przypadku 5-letniego pacjenta, u którego także zdiagnozowano kardiomiopatię. U pacjenta wystąpiły również bóle brzucha, wysoka temperatura (39.9°C), wymioty i zespół niskiego rzutu serca. Podobnie jak w poprzednim przypadku, posiew krwi ujawnił obecność Gram-ujemnych bakterii. W kuracji antybiotykowej zaprzestano stosowania wankomycyny na rzecz gentamycyny. Identyfikację bakterii wyizolowanych z materiału klinicznego przeprowadzono metodami genetycznymi. Izolat charakteryzował się niską wrażliwością na powszechnie stosowane antybiotyki [19]. W 2008 roku odnotowano przypadek 2-letniego chłopca chorego na mukowiscydę. Zdiagnozowano u niego także niewydolność trzustki oraz zapalenie błony śluzowej nosa. W trakcie hospitalizacji zaobserwowano nasilony kaszel, odkrztuszanie płwociny, utratę apetytu, zmęczenie. Mikrobiologiczna analiza płwociny pacjenta wykazała obecność nie tylko typowej mikroflory zakażającej: *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, ale również Gram-ujemnych, tlenowych pałeczek. Analizy z wykorzystaniem technik molekularnych pozwoliły na zaklasyfikowanie wyizolowanych bakterii do *Gluconobacter* sp. oraz gatunku *A. lannensis* [2]. Ostatni opisany przypadek występowania bakterii *Asaia* sp. w materiale klinicznym dotyczył 28-letniej kobiety, u której stwierdzono zachowania obsesyjno-kompulsywne, polegające na podawaniu sobie zastrzyków ze środków farmakologicznych. Bezpośrednim powodem hospitalizacji była gorączka sięgająca 40°C oraz niskie ciśnienie krwi 100/60 mmHg. Posiewy na podłożu McConkey, podłożu Columbia oraz agarze czekoladowym wykazały obecność różowych kolonii, których identyfikacja przy zastosowaniu systemu Vitek2 (BioMérieux) pozwoliła na zaklasyfikowanie do rodzaju *Shigella*. Również komercyjne testy biochemiczne API 20E, API 20NE i API 32 GN nie dały jednoznacznego wyniku identyfikacji izolatów. Podobnie jak w poprzednich przypadkach, identyfikacja możliwa była dopiero metodą sekwencjonowania genu 16S rRNA, która wykazała, że wyizolowany szczep należy do gatunku *A. lannensis*. Dodatkowo, określenie minimalnych stężeń hamujących wzrost tych bakterii wykazało, że szczep ten wykazał oporność na większość antybiotyków. Stwierdzono jego wrażliwość jedynie na antybiotyki aminoglikozydowe oraz tetracykliny [6].

Przedstawione dane literaturowe świadczą o dużych problemach związanych z identyfikacją bakterii należących do rodzaju *Asaia*. W procedurze diagnostycznej brak jest bowiem odpowiedniego komercyjnego systemu/testu, pozwalającego na szybką identyfikację tych bakterii. Diagnostyka z wykorzystaniem testów biochemicznych API 20E (BioMérieux), API 20NE (Bio-

Mérieux), API 32 GN (BioMérieux), Rapid NF (Thermo Scientific) czy Vitek (BioMérieux) jest praktycznie niemożliwa. Moore i wsp. stosując testy API 20NE otrzymał dla szczepu *Asaia* sp. profil numeryczny 5040000, który odpowiadał w 78,7% rodzajowi *Pasteurella*. Także szczepy *A. lannensis* wyizolowane przez Kręgiel i wsp. w testach API 20NE oraz API 20E dały odpowiednio profile 4045400 i 0004002, przypisane odpowiednio do rodzajów *Pasteurella* i *Shigella* [25, 29]. Identyfikację biochemiczną bakterii z rodzaju *Asaia* przeprowadzili również Carretto i wsp., otrzymując wynik *Klebsiella* sp. dla testu 20NE, a *Pasteurella* sp. dla API 20NE oraz *Escherichia coli* dla API 32GN [6]. Problemy z identyfikacją, ze względu na brak odpowiednich bibliotek danych, pojawiają się również przy zastosowaniu spektrometrii masowej MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry). Najbardziej skuteczne metody identyfikacji tych bakterii to te, oparte na analizach genetycznych. Dotychczas identyfikacja bakterii *Asaia* sp. prowadzona była z wykorzystaniem sekwencjonowania genu 16S rRNA [28, 29, 35, 36]. Jednak, należy pamiętać, że 5 spośród 8 opisanych gatunków *Asaia* sp. charakteryzuje się znacznym, bo wynoszącym 99,5%, podobieństwem genu 16S rRNA, co może być powodem niedokładnych wyników identyfikacji bakterii na poziomie gatunkowym [2].

4. Symbionta moskitów i walka z malarią

Malaria uważana jest za jedną z trzech najważniejszych chorób zakaźnych na świecie. Przenoszona jest przez samice komarów z rodzaju *Anopheles*, zaś zakażenie organizmu człowieka następuje poprzez ugryzienie owadów. W 2013 roku odnotowano około 200 mln przypadków zarażenia malarią, ludzi zamieszkujących głównie regiony tropikalne i subtropikalne, co w sumie stanowi 106 krajów o łącznej liczbie 3,3 mld ludzi [37]. Malaria, zaraz po AIDS i gruźlicy, jest najniebezpieczniejszą chorobą, zabijającą rocznie około 2 mln ludzi, głównie dzieci. Za rozwój choroby w organizmie gospodarza odpowiedzialne są jednokomórkowe pierwotniaki z rodzaju *Plasmodium*, przenoszone przez komary. Dotychczasowa strategia ograniczenia malarii, obejmująca stosowanie leków oraz insektycydów, daje coraz mniejszą skuteczność, ze względu na oporność nabywaną przez komary oraz pierwotniaki. Dlatego też, poszukiwane są alternatywne sposoby ograniczania malarii [7, 27]. Nowoczesne metody walki z malarią oparte są o zastosowanie określonych symbiontów bakteryjnych, które zamieszkują organizmy komarów i mogą wpływać na cykl pierwotniaków *Plasmodium* sp. [4, 5, 8, 17].

Dotychczasowe badania nad bakteryjnymi symbiontami komarów przenoszących malarię pokazują,

że w skład mikroflory izolowanej z komarów wchodzi bakterie należące do rodzajów *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Chryseobacterium*, *Elizabethkingia*. Jednakże, gatunkiem stanowiącym znaczną większość w procentowym udziale populacji stanowią bakterie należące do rodzaju *Asaia* [3]. Dotychczas wykazano, że narządy rozrodcze, gruczoły ślinowe oraz jelito środkowe komarów z rodzaju *Anopheles* zasiedlają gatunki: *Asaia bogorensis* oraz *A. platycodi* [9, 10, 12]. Pierwotne zasiedlenie organów owadów przez bakterie *Asaia* sp. nastąpiło zapewne w wyniku pożywiania się moskitów pyłkiem kwiatów [10]. Powstała symbioza bakteria-moskit jest na tyle stabilna, że komórki bakterii zasiedlające jelito hamują rozwój oocyst *Plasmodium* sp., ale również przekazywane są innym osobnikom i potomstwu [11].

Zarówno w próbach laboratoryjnych jak i środowiskowych wykazano, że szczepy *A. bogorensis* przeciwdziałają malarii. Bakterie te były w stanie dokonać kolonizacji jelita środkowego i gruczołów ślinowych oraz otoczyć *Plasmodium* w różnych stadiach rozwoju (oocysty oraz sporozoity), zachowując przy tym żywotność i ruchliwość [11]. Badania wykazały, że zmiany fizjologiczne w jelicie środkowym moskitów, następujące po posiłku z krwi, nie wpływają negatywnie na bytującą populację *Asaia* sp. Ponadto obecność *Plasmodium* nie ma wpływu na liczbę bakterii. Oznacza to, że zakażone komary posiadają odpowiednią liczbę komórek bakterii z rodzaju *Asaia*, zdolnych do antagonistycznego działania przeciwko *Plasmodium* [5]. Bakterie w obrębie światła jelita środkowego niekorzystnie wpływają na różne stadia pasożyta malarii. Wykorzystują do tego różnorodne enzymy i toksyny, stwarzają fizyczne bariery, które utrudniają wzajemne oddziaływanie *Plasmodium* oraz nabłonka jelita środkowego owadów. Alternatywnie, wpływ bakterii na rozwój pasożyta może nastąpić za pośrednictwem zmiany w fizjologii samego komara. Prawdopodobnie poprzez indukcję odpowiedzi immunologicznej, pod wpływem obecności bakterii i pasożytów, i/lub zmian w metabolizmie gospodarza, które wpływają negatywnie na rozwój *Plasmodium*. Badania wykazały, że niektóre z czynników odpornościowych komarów wywołanych przez bakterie uczestniczą w zabijaniu pasożytów już w początkowych stadiach rozwoju oocyst. Uzasadniona wydaje się być hipoteza, że obecność bakterii aktywuje odpowiedź immunologiczną komara, a syntetyzowane peptydy i inne czynniki odpornościowe działają przeciwko *Plasmodium* [11, 17].

5. Podsumowanie

Bakterie z rodzaju *Asaia* stanowią niezwykle interesujący model biologiczny. Pałeczki te charakteryzują się unikalnymi zdolnościami adaptacyjnymi do

rozmaitych środowisk takich jak kwiaty, owoce, napoje bezalkoholowe, ale również organizmy owadów czy ludzi. Różnorodność mechanizmów umożliwiających przystosowanie się do nowych środowisk sprawia, że bakterie *Asaia* charakteryzuje swoisty dualizm. Z jednej strony bakterie te należą do typowych zanieczyszczeń napojów bezalkoholowych oraz są oportunistycznymi patogenami człowieka, z drugiej strony, jako typowa mikrobiota moskitów, stanowią ważny mikroorganizm dla opracowania strategii w walce z malarią.

Piśmiennictwo

- Abdel-Haq N., Savaşan S., Davis M., Asmar B.I., Painter T., Salimnia H.: *Asaia lannensis* bloodstream infection in a child with cancer and bone marrow transplantation. *J. Med. Microbiol.* **7**, 974–976 (2009)
- Alauzer A., Teyssier C., Jumas-Bilak E., Gouby A., Chiron R., Rabaud C., Counil F., Lozniewski A., Marchandi H.: *Gluconobacter* as well as *Asaia* species, newly emerging opportunistic human pathogens among Acetic Acid Bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 3935–3942 (2010)
- Boissière A., Morlais I. i wsp.: Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS Pathog.* DOI:10.1371/journal.ppat.1002742 (2012)
- Bongio N.J., Lampe D.J.: Inhibition of *Plasmodium berghei* development in mosquitoes by effector proteins secreted from *Asaia* sp. bacteria using a novel native secretion signal. *PLoS One*, DOI:10.1371/journal.pone.0143541 (2015)
- Capone A., Favia G.L. i wsp.: Interactions between *Asaia*, *Plasmodium* and *Anopheles*: new insights into mosquito symbiosis and implications in malaria symbiotic control. *Parasit. Vectors*, DOI:10.1186/1756-3305-6-182 (2013)
- Carretto E., Visiello R., Bardaro M., Schivazappa S., Vailati F., Farina C., Barbarini D.: *Asaia lannensis* bacteremia in a 'needle freak' patient. *Future Microbiol.* **11**, 23–29 (2016)
- Catteruccia F., Godfray H.C., Crisanti A.: Impact of genetic manipulation on the fitness of *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Science*, **299**, 1225–1227 (2003)
- Catteruccia F., Nolan T., Loukeris T.G., Blass C., Savakis C., Kafatos F.C., Crisanti A.: Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Nature*, **405**, 959–962 (2000)
- Chouaia B., Daffonchio D. i wsp.: Acetic acid bacteria genomes reveal functional traits for adaptation to life in insect guts. *Genome Biol. Evol.* **6**, 912–920 (2014)
- Crotti E., Daffonchio D. i wsp.: *Asaia*, a versatile acetic acid bacterial symbiont, capable of cross-colonizing insects of phylogenetically distant genera and orders. *Environ. Microbiol.* **11**, 3252–3264 (2009)
- Dong Y., Manfredini F., Dimopoulos G.: Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathog.* DOI:10.1371/journal.ppat.1000423 (2009)
- Favia G., Ricci I., Marzorati M., Negri I., Alma A., Sacchi L., Bandi C., Daffonchio D.: Bacteria of the genus *Asaia*: a potential paratransgenic weapon against malaria. *Adv. Exp. Med. Biol.* **627**, 49–59 (2008)
- Fredricks D., Ramakrishnan L.: The *Acetobacteraceae*: extending the spectrum of human pathogens. *PLoS Pathog.* DOI:10.1371/journal.ppat.0020036 (2006)
- Greenberg D.E., Porcella S.F., Stock F., Wong A., Conville P.S., Murray P.R., Holland S.M., Zelazny A.M.: *Granulibacter bethesdensis* gen. nov., sp. nov., a distinctive pathogenic acetic acid bacterium in the family *Acetobacteraceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 2609–2616 (2006)
- Holden N., Pritchard L., Toth I. Colonization outwith the colon: plants as an alternative environmental reservoir for human pathogenic enterobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* DOI: 10.1111/j.1574-6976.2008.00153 (2009)
- Horsáková I., Voldřich M., Čerovský M., Sedláčková P., Šicenrová P., Ulbrich P.: *Asaia* sp. as a bacterium decaying the packaged still fruit beverages. *Czech J. Food. Sci.* **27**, 362–365 (2009)
- Ito J., Ghosh A., Moreira A.L., Wimmer E.A., Jacobs-Lorena M.: Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature*, **417**, 452–455 (2002)
- Jarmuła A., Oblak E., Wawrzycka D., Gutowicz J.: Oporność wielolekowa związana z aktywnym usuwaniem leków z komórek drobnoustrojów. *Postepy, Hig. Med. Dosw.* **65**, 216–227 (2011)
- Juretschko S., Beavers-May T.K., Stovall S.H.: Nosocomial infection with *Asaia lannensis* in two pediatric patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J. Med. Microbiol.* **59**, 848–852 (2010)
- Katsura K., Kawasaki H., Potacharoen W., Saono S., Seki T., Yamada Y., Uchimura T., Komagata K.: *Asaia siamensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -*Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 559–563 (2001)
- Kato N., Mizuno M., Nakai Y., Nozaki K., Suga J., Kanda T., Yamada Y., Amano Y.: Structural analysis of the water-soluble carbohydrate from *Asaia bogorensis* by NMR spectroscopy. *J. Appl. Glycosci.* **54**, 231–233 (2007)
- Kawai M., Higashiura N., Hayasaki K., Okamoto N., Takami A., Hirakawa H., Matsushita K., Azuma Y.: Complete genome and gene expression analyses of *Asaia bogorensis* reveal unique responses to culture with mammalian cells as a potential opportunistic human pathogen. *DNA Res.* DOI: 10.1093/dnares/dsv018 (2015)
- Kommanee J., Tanasupawat S., Yukphan P., Malimas T., Muramatsu Y., Nakagawa Y., Yamada Y.: *Asaia spathodeae* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -*Proteobacteria*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **56**, 81–87 (2010)
- Kręgiel D.: Attachment of *Asaia lannensis* to materials commonly used in beverages industry. *Food Control*, **32**, 537–542 (2013)
- Kręgiel D., Rygała A., Libudzisz Z., Walczak P., Ołtuszak-Walczak E.: *Asaia lannensis* – the spoilage acetic acid bacteria isolated from strawberry-flavored bottled water in Poland. *Food Control*, **26**, 147–150 (2012)
- Malimas T., Yukphan P., Takahashi M., Kaneyasu M., Potacharoen W., Tanasupawat S., Nakagawa Y., Tanticharoen M., Yamada Y.: *Asaia lannaensis* sp. nov., a new acetic acid bacterium in the *Alphaproteobacteria*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 666–671 (2008)
- Marrelli M.T., Li C., Rasgon J.L., Jacobs-Lorena M.: Transgenic malaria-resistant mosquitoes have a fitness advantage when feeding on *Plasmodium*-infected blood. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 5580–5583 (2007)
- Moonmangmee S., Moonmangmee D., Adachi O., Matsushita K.: A novel extracellular polysaccharides from acetic acid bacterium *Asaia bogorensis* NRIC 0311T. "1st Mae Fah Luang University International Conference" (2012)
- Moore J.E., McCalmont M., Xu J., Millar B.C., Heaney N.: *Asaia* sp., an unusual spoilage organism of fruit-flavored bottled water. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4130–4131 (2002)

30. Rossi R., Favia G. i wsp.: Mutual exclusion of *Asaia* and *Wolbachia* in the reproductive organs of mosquito vectors. *Parasit. Vectors*, DOI: 10.1186/s13071-015-0888-0 (2015)
31. Snyder R.W., Ruhe J., Kobrin S., Wasserstein A., Doline C., Nachamkin I., Lipschutz J.: *Asaia bogorensis* peritonitis identified by 16S ribosomal RNA sequence analysis in a patient receiving peritoneal dialysis. *Am. J. Kidney. Dis.* **44**, 15–17 (2004)
32. Suzuki R., Zhang Y., Iino T., Kosako Y., Komagata K., Uchimura T.: *Asaia astilbes* sp. nov., *Asaia platycodi* sp. nov., and *Asaia prunellae* sp. nov., novel acetic acid bacteria isolated from flowers in Japan. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **56**, 339–346 (2010)
33. Tuuminen T., Heinäsmäki T., Kertulla T.: First report of bacteraemia by *Asaia bogorensis*, in patient with a history of intravenous-drug abuse. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 3048–3050 (2006)
34. Tuuminen T., Roggenkamp A., Vuopio-Varkila J.: Comparison of two bacteremic *Asaia bogorensis* isolates from Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **26**, 523–524 (2007)
35. Yamada Y., Katsura K., Kawasaki H., Widyastuti Y., Saono S., Seki T., Uchimura T., Komagata K.: *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 823–829 (2000)
36. Yukphan P., Potacharoen W., Tanasupawat S., Tanticharoen M., Yamada Y.: *Asaia krungthepensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 313–316 (2004)
37. World Health Organization. World Malaria Report Geneva Switzerland: WHO (2014)

1. Wprowadzenie. 2. Charakterystyka integronów. 3. Integrony bakterii Gram-dodatnich. 3.1. Integrony *Corynebacterium* spp. 3.2. Integrony *Enterococcus* spp. 3.3. Integrony *Staphylococcus* spp. 3.4. Integrony *Streptococcus* spp. 3.5. Integrony innych gatunków bakterii Gram-dodatnich. 4. Podsumowanie

Integrans in Gram-positive bacteria

Abstract: Integrans are genetic platforms responsible for integration, rearrangement and expression of resistance determinants called gene cassettes. Most of the reports on the occurrence, characteristics and evolution of integrans concern Gram-negative bacteria, whereas relatively little is known on the distribution and role of integrans in Gram-positive microorganisms. The aim of this review is to summarize the information about the occurrence of integrans in Gram-positive bacteria and their role in the spread of antimicrobial resistance.

1. Introduction. 2. Integron characteristics. 3. Integrans in Gram-positive bacteria. 3.1. Integrans in *Corynebacterium* spp. 3.2. Integrans in *Enterococcus* spp. 3.3. Integrans in *Staphylococcus* spp. 3.4. Integrans in *Streptococcus* spp. 3.5. Integrans in other Gram-positive species. 4. Summary

Słowa kluczowe: horyzontalny transfer genów, kasety genowe, lekooporność, plazmid
Key words: antimicrobial resistance, gene cassettes, plasmid, horizontal gene transfer

1. Wprowadzenie

Antybiotyki to drobnocząsteczkowe substancje pochodzenia naturalnego lub syntetycznego, które zabijają wrażliwe drobnoustroje, bądź hamują ich wzrost. Ich odkrycie stanowiło wielki przełom w historii medycyny, dostarczając niezwykle skutecznego środka do walki z infekcjami wywoływanymi przez mikroorganizmy. Jednak choroby zakaźne o etiologii bakteryjnej nadal pozostają jednym z ważniejszych wyzwań w obszarze zdrowia publicznego [38, 40, 41, 45]. Nadmierne, a często również niewłaściwe stosowanie antybiotyków w praktyce medycznej, weterynaryjnej oraz w rolnictwie, przyczyniło się do znacznego wzrostu lekooporności drobnoustrojów, ewolucji szczepów wcześniej niewrażliwych na szerokie spektrum antybiotyków i wreszcie nabycia znacznej oporności przez mikroorganizmy oportunistyczne [11, 12].

Ze względu na rosnące zagrożenie związane z coraz częstszym występowaniem szczepów wielolekoopornych, utrudniającym lub wręcz uniemożliwiającym skuteczne leczenie, antybiotykooporność uznana została za poważny problem medyczny w skali globalnej [5, 42–44], a uwaga naukowców skupiona została na wyjaśnieniu przyczyn tego zjawiska. Za szerzenie lekooporności odpowiada wiele mechanizmów, a za najważniejszy z nich uważa się horyzontalny transfer genów (HGT, Horizontal Gene Transfer). Oprócz dobrze poznanych elementów genetycznych odpowiedzialnych za HGT, takich jak plazmidy koniugacyjne

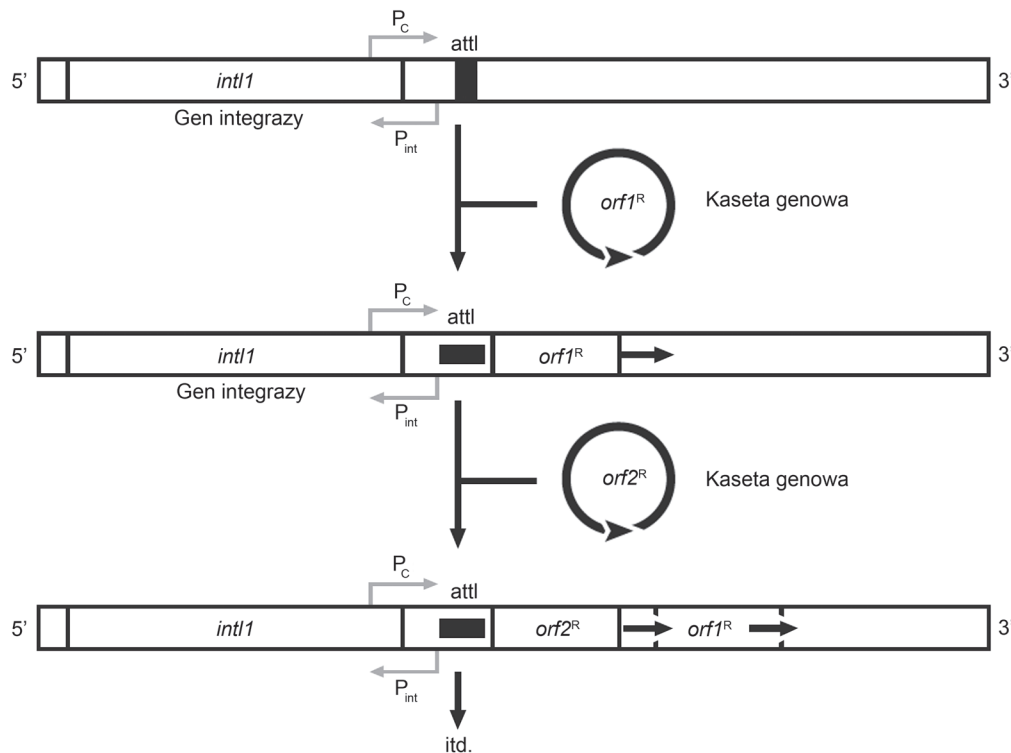
i transpozony, zidentyfikowano integrony, uznawane obecnie za jeden z najważniejszych czynników szerzenia lekooporności [8, 9, 19, 36].

2. Charakterystyka integronów

Integrony opisano po raz pierwszy w 1989 roku [36], początkowo uważając je za elementy charakterystyczne wyłącznie dla genomu bakterii Gram-ujemnych [18, 26]. Mają one zwartą strukturę. Często określane są mianem platform naturalnej inżynierii genetycznej, gdyż umożliwiają wbudowanie egzogennych otwartych ramek odczytu (zwanych kasetami genowymi) i ich konwersję do funkcjonalnych genów, poprzez zapewnienie ich ekspresji [33, 36]. Włączenie kaset genowych w obręb liniowej struktury integronu odbywa się na zasadzie rekombinacji umiejscowionej (site-specific recombination), niezależnej od białka RecA. Podstawowymi elementami budowy integronu są: gen *intI*, kodujący integrację, sekwencja *attI*, będąca miejscem włączania kaset genowych, oraz promotor P_C [10, 14, 25] (Rys. 1).

Zmiennymi elementami integronu są kasety genowe, których wielkość mieści się w przedziale od 400 pz do 1 kpz. Poza integronem kasetę występuje w cytoplazmie jako kolistą, kowalencyjnie zamkniętą cząsteczką dwuniciowego DNA, którą od plazmidu odróżnia brak zdolności do autonomicznej replikacji [24]. Do tej pory odkryto ponad 130 kaset genowych związanych z antybiotykoopornością [30]. Każda kasetę zawiera miejsce *attC*, zwane dawniej miejscem 59-be. Jest to zmienny,

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, ul. Umultowska 89; 61-614 Poznań; tel. 61 8295939; e-mail: koczma@amu.edu.pl



Rys. 1. Struktura integronu klasy 1 i wbudowywanie kaset genowych

niezbyt silnie konserwatywny region o długości od 57 do 141 par zasad, warunkujący zajście rekombinacji umiejscowionej i wbudowanie kasety w miejsce *attI* integronu [8, 18]. Kluczowe dla *attC* są miejsca proste na dwóch końcach, określane jako sekwencje konsensusowe LH i RH (Left Hand, Right Hand). Każde z nich składa się z pary silnie konserwatywnych miejsc rdzennych (core sites), określanych odpowiednio jako 1L i 2L oraz 1R i 2R [14, 15]. Długość sekwencji łącznikowej między skrajnymi miejscami prostymi waha się od 17 do 117 pz, co wpływa na zmienną długość elementu *attC* [30].

W odróżnieniu od pozostałych enzymów z rodziny rekombinaz tyrozynowych, integraza IntI ma zdolność nie tylko włączania, ale i wycinania kaset genowych [26]. Umożliwia to rearanżację kaset w integronie, co ma duże znaczenie, gdyż ekspresja genów zawartych w kasetach zależy od promotora P_c , a fizyczne oddalenie genów od promotora znacznie osłabia ich transkrypcję [9].

Choć sam integron nie ma zdolności do przemieszczania się w obrębie genomu, znaczną mobilność uzyskuje poprzez sprzężenie z ruchomymi elementami genetycznymi: transpozonomi lub plazmidami koniugacyjnymi, co umożliwia rozpowszechnianie oraz wymianę genów oporności wśród wielu grup bakterii [3, 25].

Ze względu na różnice w sekwencji genu integrazy, integrony pogrupowano, wyróżniając pięć głównych klas, przy czym te należące do klas 1, 2 i 3 określa się jako integrony mobilne lub integrony oporności, zaś klasa 4 i 5 obejmuje integrony odrębnego typu, zwane superintegronami [6]. Do 1 klasy zaliczono większość

opisanych integronów. Ponieważ częstość ich występowania w izolatach klinicznych jest wysoka, zostały one najlepiej zbadane [44]. Wykrywane są one również u bakterii środowiskowych [27, 35], a ich obecność może być skorelowana ze zwiększonym potencjałem chorobotwórczym szczepu gospodarza [23]. Integrony klasy 2 wykazują strukturalne podobieństwo do integronów klasy pierwszej; składają się z genu integrazy, *intI2*, promotora *PinA1* oraz miejsca *attI2*. Podobieństwo między sekwencjami aminokwasowymi genów *intI1* i *intI2* jest mniejsze niż 50%, lecz integraza klasy drugiej nie jest funkcjonalna, bowiem zawiera w połowie ramki odczytu kodon stop. Jedną z hipotez zakłada, że *intI2* jest pseudogenem, według innej może to być gen regulatorowy, sprzężony z funkcjonalnym *intI1* [20]. Integrony klasy 2 są znacznie rzadziej spotykane, a ich występowanie stwierdzano m.in. w szczepach *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Acinetobacter baumannii* i *Burkholderia cepacia* [1, 2, 8, 17, 21]. Występowanie integronów klasy 3 ogranicza się do kilku gatunków mikroorganizmów, m.in. *Acinetobacter* spp., *Alcaligenes* spp., *Citrobacter freundii*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Salmonella* spp. i *Serratia marcescens* [40].

Superintegrony to duże struktury zawierające ponad 20 kaset genowych, po raz pierwszy zidentyfikowane u *Vibrio cholerae*, w drugim, mniejszym chromosomie [4]. Największe superintegrony wykryto u *Vibrio vulnificus* (217 kaset genowych, kodujących różnorodne białka, głównie o nieznanym znaczeniu) i *V. cholerae*

(179 kaset), [6]. W przeciwieństwie do klasycznych integronów, superintegrony nie są związane z mobilnymi elementami genetycznymi. Elementy takie opisano dotychczas u: *Vibrionaceae*, *Shewanella* sp., *Xanthomonas* sp., *Pseudomonas* sp. oraz innych *Proteobacteria* [40, 41].

3. Integrony bakterii Gram-dodatnich

Większość opublikowanych danych na temat integronów dotyczy bakterii Gram-ujemnych [3, 8, 9, 18, 19, 24–26]. Początkowo, brak doniesień o obecności integronów u bakterii Gram-dodatnich skłonił badaczy do uznania ich za struktury charakterystyczne tylko dla bakterii Gram-ujemnych [18]. Sytuacja zmieniła się w 1998 r., kiedy opisano pierwszy integron szczepu bakterii Gram-dodatniej – *Corynebacterium glutamicum* [29]. Był to integron klasy 1, zlokalizowany w obrębie plazmidu. Wkrótce obecność integronów stwierdzono w innych gatunkach Gram-dodatnich, zarówno w izolatach klinicznych, jak i środowiskowych [28].

3.1. Integrony *Corynebacterium* spp.

Opisano dotychczas integrony szczepów trzech gatunków bakterii z rodzaju *Corynebacterium*: *C. casei*, *C. ammoniagenes*, *C. glutamicum*, przy czym najlepiej poznano te elementy w *C. glutamicum*. W tym gatunku integrony klasy 1 zidentyfikowano w obrębie dwóch plazmidów typu R (Resistance): pCG4, o wielkości 29 kbp, determinującym oporność na streptomycynę i spektomycynę oraz pTET3, o wielkości 27,8 kbp, warunkującym oporność na streptomycynę, spektynomycynę i tetracyklinę [29, 37].

Plazmid pCG4, zawierający pierwszy integron odkryty u bakterii Gram-dodatnich, został opisany w szczepie *C. glutamicum* T250 (ATCC 31830). Wykazano, że plazmid ten jest zdolny do replikacji także w innych gatunkach bakterii, w *Corynebacterium herculis*, *Brevibacterium flavum* i *Microbacterium ammoniaphilum* [22]. Integron plazmidu pCG4 zawiera pojedynczą kasetę genową, *aadA2a*, warunkującą oporność na streptomycynę i spektynomycynę. Jego sekwencja jest niemal identyczna z sekwencją integronu plazmidu pSA1700, występującego w szczepie *Pseudomonas aeruginosa*. Różnice dotyczą jedynie dwóch substytucji nukleotydowych, z których jedna (G→C) występuje w genie *aadA2a*, a druga (C→G) w obrębie regionu –10 promotora P_C . Obecność guaniny w tym regionie skutkuje zwiększoną aktywnością promotora integronu *C. glutamicum* w porównaniu ze typowym, „słabym” promotorem P_C obecnym w integronach klasy 1 [29].

Plazmid pTET3, zidentyfikowany w szczepie *C. glutamicum* LP-6, zawiera unikalny integron klasy 1 z genem integrazy, zinaktywowanym w wyniku wbudo-

wania sekwencji insercyjnej IS6100. Region zmienny zawiera pojedynczą kasetę genową *aadA9*, której sekwencja wykazuje maksymalnie 61% podobieństwa do innych kaset typu *aadA*, obecnych w integronach wielu gatunków bakterii [37].

Poza *C. glutamicum*, integrony klasy 1 wykryto również w 10 izolatach *C. ammoniagenes* i trzech *C. casei*, wyosobnionych z obornika pochodzącego z ferm drobiu w USA. W przypadku integronu *C. ammoniagenes*, region zmienny zawierał kasety genowe *aadA1*, *aadA2*, *aadA9* oraz *dfrA1-aadA1*, natomiast w elemencie *C. casei* stwierdzono obecność kaset *aadA1*, *dfrA1* (warunkuje oporność na trimetoprim) oraz genu kodującego syntazę lipidu A [28].

Sprzężenie integronów *Corynebacterium* spp. z mobilnymi wektorami HGT, jakimi są plazmidy, pozwala na propagację tych elementów w obrębie całego rodzaju taksonomicznego. Dane, uzyskane przez Nandi'ego [28] sugerują, że integrony klasy pierwszej, różniące się rodzajem kaset genowych, są powszechne u *C. glutamicum*, *C. ammoniagenes* i *C. casei*. O transferze integronów między znacznie oddalonymi filogenetycznie grupami bakterii świadczyć może niemal całkowite podobieństwo integronu *C. glutamicum* z plazmidu pCG4 oraz integronu InC z *Pseudomonas aeruginosa* [29].

3.2. Integrony *Enterococcus* spp.

Integrony wykryto w dwóch najczęściej izolowanych gatunkach bakterii z rodzaju *Enterococcus* – *E. faecalis* i *E. faecium*. Pierwsze doniesienie dotyczyło występowania genu *aadA1* w bezpośrednim sąsiedztwie genu integrazy *intI1*, w szczepie *E. faecalis* W4770, wyhodowanym z próbki materiału pobranego od pacjenta szpitala University of Wisconsin (USA) [7]. Geny te wykryto w plazmidzie pNCC801 o wielkości ok. 80 kbp, który był zdolny do transferu do komórek innego szczepu *E. faecalis*, JH2-2, z częstością rzędu 3×10^{-10} . Opisany przez Clarka i wsp. [7] fragment integronu o wielkości 1009 bp jest identyczny ze zdeponowanymi w bazie danych GenBank sekwencjami plazmidów *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Shigella dysenteriae* czy *Enterobacter cloacae*.

Częste występowanie integronów stwierdzono również u enterokoków wyosobnionych od pacjentów szpitala Jinan University (Chiny). Integrony klasy 1 z izolatów *E. faecalis* najczęściej zawierały zestaw kaset genowych *dfrA12-orfF-aadA2*. Jeden z izolatów miał dwa integrony klasy 1, każdy z ciągiem kaset *dfrA12-orfF-aadA2* i *aadA2*. Dwa izolaty niosły jednocześnie integrony klasy 1 i 2, zawierające, odpowiednio, kasety *dfrA17-aadA5* i *dfrA1-sat1-aadA1*. Integrony te wykazywały bardzo duże podobieństwo sekwencji, wynoszące powyżej 99%, do integronów wykrytych u innych gatunków bakterii na terenie tego samego szpitala.

Ponadto, te same zespoły kaset genowych dominowały u różnych gatunków bakterii, zarówno Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych, co sugeruje ich rozprzestrzenianie wśród bakterii w środowisku szpitalnym [42].

3.3. Integrony *Staphylococcus* spp.

Pierwsze dane o obecności integronów w bakteriach z rodzaju *Staphylococcus* pochodzą z 2004 roku. Nandi i wsp. [28] wykryli integrony klasy 1 w szczepach 3 gatunków (*S. lentus*, *S. nepalensis* i *S. xylosus*), wyizolowanych z obornika z fermi drobiu. W szczepie ostatniego wymienionego gatunku, w regionie zmiennym zidentyfikowano gen transketolazy, natomiast pozostałe izolaty miały integrony „puste”, bez wbudowanych kaset genowych.

Integrony klasy 1 pochodzące z gronkowców wyhodowanych z materiałów pobranych od pacjentów szpitali poznano kilka lat później. W 2007 r. Xu i wsp. [39] wykryli je w izolatach klinicznych *S. aureus*. Wszystkie te integrony zawierały pojedynczą kasetę genową *aadA1*. Badania przeprowadzone przez ten sam zespół doprowadziły również do odkrycia integronów klasy 1 w 30 z 54 (55,6%) opornych na metycylinę szczepów gronkowców koagulazo-ujemnych: *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus* i *S. warneri*. Zidentyfikowano cztery zastawy kaset genowych: *dfrA1-orfF-aadA2*, *aacA4-cmlA1*, *dfrA17-aadA5* i *aadA2*. Co ciekawe, analiza metodą hybrydyzacji Southern blot wykazała, że we wszystkich szczepach integrony były zlokalizowane w chromosomie, a nie w plazmidach, co ma miejsce w przypadku większości integronów bakteryjnych.

Xu i wsp. [42] podali także dane o częstym występowaniu integronów klasy 1 w klinicznych szczepach *S. aureus* opornych na metycylinę (MRSA). Autorzy wykryli je w 76 ze 179 (42,5%) izolatów. Integrony te zawierały cztery zestawy kaset genowych: *dfrA1-orfF-aadA2*, *aacA4-cmlA1*, *dfrA17-aadA5* i *aadA2*, a więc takie same jak u opornych na metycylinę gronkowców koagulazo-ujemnych. Analizowane szczepy były izolowane w latach 2001–2006 od pacjentów z zakażeniami szpitalnymi. W poszczególnych latach odnotowywano najczęściej występowanie jednego zestawu kaset, co może świadczyć o możliwości przekazywania integronów wśród gronkowców na drodze HGT. Jednak z drugiej strony, chromosomowa lokalizacja integronów u gronkowców zdaje się przeczyć tej hipotezie [44]. Podsumowując, budowa integronów *Staphylococcus* spp. nie odbiega od ogólnego schematu. Uwagę zwraca ich konserwatyzm pod względem zawartości kaset genowych. Najbardziej rozpowszechnione są kasety genowe typu *aadA* (95,9%) i *drfA* (52,5%) a najczęściej występującym zestawem kaset jest *drfA12-orfF-aadA2* [39, 40, 44].

Obecność kaset genowych zawierających geny z rodziny *aadA* związana jest z opornością na strep-

tomycynę i spektynomycynę, *aacA4* determinuje oporność na aminoglikozydy, kasety z rodziny *drfA* zapewniają oporność na trimetoprim, a kasetą *cmlA1* warunkuje oporność na chloramfenikol. Co więcej, obecność integronów u *Staphylococcus* spp. skorelowana jest z wielolekoopornością tych bakterii. Ren i wsp. ustalili [32], że integrony występują u 80% badanych szczepów MRSA opornych na 12 antybiotyków, podczas gdy w szczepach opornych na jeden antybiotyk, integrony obecne były tylko w 43,8% izolatów. W ostatnich latach zauważalna jest także tendencja wzrostowa w wykrywalności integronów klasy 1. W 2009 roku integron tej klasy zidentyfikowano u *Staphylococcus epidermidis*, a zawarte w nim kasety genowe związane były z opornością na aminoglikozydy – *aac6* oraz β -laktamy – *aac6'-aph2* [31]. Integrony klasy pierwszej były powszechnie wykrywane również w izolatach *Staphylococcus* spp. pochodzących z wymazów gardła i nosa – 40,5% z 200 szczepów zawierało integrony. Co więcej, po raz pierwszy zanotowano integron u *Staphylococcus saprophyticus*. Daje to w sumie dziewięć gatunków z tego rodzaju ze zidentyfikowanymi integronami (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. lentus*, *S. nepalensis*, *S. xylosus* i *S. saprophyticus*) [28, 44].

3.4. Integrony *Streptococcus* spp.

Oprócz *Corynebacterium* spp., *Enterococcus* spp. i *Staphylococcus* spp., obecność integronów stwierdzono również u bakterii z rodzaju *Streptococcus* (Tabela I). W badaniach przeprowadzonych w latach 2001–2002 w Chinach, wykryto cztery szczepy *Streptococcus* spp., wyhodowane z materiałów pobranych od pacjentów szpitala, zawierające integrony klasy 1 z zestawem kaset *drfA12-orfF-aadA2* [34].

3.5. Integrony innych gatunków bakterii Gram-dodatnich

Obecność integronów klasy 1 wykazano metodą PCR także w bakteriach *Aerococcus* sp. oraz *Brevibacterium thioogenitalis*, wyizolowanych z obornika pochodzącego z ferm drobiu. Nie uzyskano jednak produktu amplifikacji regionów zmiennych integronów, co świadczyć może o braku wbudowanych kaset genowych, bądź mutacji w obrębie sekwencji kompletnej do zastosowanych starterów [28].

4. Podsumowanie

Integrony to struktury genetyczne powszechne w genomach wielu gatunków bakterii, warunkujące adaptację mikroorganizmów oraz wpływające na tempo

Tabela I
Charakterystyka integronów bakterii Gram-dodatnich

Gatunek	Integron	Szeregi kaset genowych	Piśmiennictwo
<i>Aerococcus</i> sp.	Klasa 1	gen kodujący metylazę tRNA	[28]
<i>Brevibacterium thiogenitalis</i>	Klasa 1	nie wykryto	[28]
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	Klasa 1	<i>aadA2</i> , <i>aadA9</i> , <i>dfrA1-aadA1</i>	[28]
<i>C. casei</i>	Klasa 1	<i>dfrA1-aadA1</i>	[28]
<i>C. glutamicum</i>	Klasa 1	<i>aadA2</i> , <i>aadA9</i>	[29, 37]
<i>Enterococcus faecalis</i>	Klasa 1	<i>dfrA12-orfF-aadA2</i> , <i>dfrA17-aadA5</i> , <i>aadA2</i>	[7, 42]
<i>E. faecalis</i>	Klasa 2	<i>dfrA1-sat1-aadA1</i>	[42]
<i>E. faecium</i>	Klasa 1	<i>dfrA12-orfF-aadA2</i> , <i>dfrA17-aadA5</i> , <i>aadA2</i>	[42]
<i>Staphylococcus aureus</i>	Klasa 1	<i>dfrA12-orfF-aadA2</i> , <i>dfrA17-aadA5</i> , <i>aadA2</i> , <i>aacA4-cmlA1</i>	[42]
<i>S. epidermidis</i>	Klasa 1	<i>dfrA12-orfF-aadA2</i> , <i>dfrA17-aadA5</i> , <i>aadA2</i> , <i>aacA4-cmlA1</i>	[39]
<i>S. hominis</i>	Klasa 1	<i>dfrA12-orfF-aadA2</i> , <i>dfrA17-aadA5</i> , <i>aacA4-cmlA1</i>	[39]
<i>S. haemolyticus</i>	Klasa 1	<i>dfrA12-orfF-aadA2</i>	[39]
<i>S. lentus</i>	Klasa 1	nie wykryto	[28]
<i>S. nepalensis</i>	Klasa 1	nie wykryto	[28]
<i>S. xylosus</i>	Klasa 1	nie wykryto	[28]
<i>S. warneri</i>	Klasa 1	<i>dfrA12-orfF-aadA2</i>	[39]
<i>Streptococcus</i> sp.	Klasa 1	<i>dfrA12-orfF-aadA2</i>	[34]

ich ewolucji. Obecność integronów jest często skorelowana ze wieloopornością szczepów ich gospodarzy. Stanowi to poważny problem, ze względu na szybko szerzącą się lekooporność wśród bakterii. Przeprowadzone analizy porównawcze wskazują, że integrony bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych są blisko spokrewnione – mają podobną strukturę i kodują identyczne integrazy. Świadczy to o częstych zdarzeniach horyzontalnego transferu genów między obydwoma grupami bakterii, być może z udziałem mobilnych elementów genetycznych o szerokim zakresie gospodarzy. Większość opisanych integronów bakterii Gram-dodatnich należy do klasy 1 i zaobserwowano je w gatunkach należących do rodzajów *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus* i *Brevibacterium*. Integrony klasy 2 stwierdzono jedynie u enterokoków, natomiast integronów klasy 3 nie zaobserwowano dotąd w bakteriach Gram-dodatnich. Należy jednak zauważyć, że dystrybucja i zmienność integronów w tej grupie bakterii są wciąż słabo poznane.

Piśmiennictwo

- Ahmed A.M., Nakano H., Shimamoto T.: Molecular characterization of integrons in non-typhoid *Salmonella* serovars isolated in Japan: description of an unusual class 2 integron. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**, 371–374 (2005)
- Barlow R.S., Desmarchelier P.M., Gobius K.S.: Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 838–842 (2004)
- Boucher Y., Labbate M., Koenig J.E., Stokes H.W.: Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends Microbiol.* **15**, 301–309 (2007)
- Boucher Y., Nesbø C.L., Joss M.J., Robinson A., Mabbutt B.C., Gillings M.R., Doolittle W.F., Stokes H.W.: Recovery and evolutionary analysis of complete integron gene cassette arrays from *Vibrio*. *BMC Evol. Biol.* **6**, 3 (2006)
- Bush K., Zgurskaya H.I. I wsp.: Tackling antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 894–896 (2011)
- Cambray G., Guerout A.M., Mazel D.: Integrons. *Annu. Rev. Genet.* **44**, 141–166. (2010)
- Clark N.C., Olsvik O., Swenson J.M., Spiegel C.A., Tenover F.C.: Detection of a streptomycin/spectinomycin adenyltransferase gene (*aadA*) in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 157–160 (1999)
- Collis C.M., Grammaticopoulos G., Briton J., Stokes H.W., Hall R.M.: Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. *Mol. Microbiol.* **9**, 41–52 (1993)
- Collis C.M., Kim M.J., Stokes H.W., Hall R.M.: Binding of the purified integron DNA integrase Int1 to integron- and cassette-associated recombination sites. *Mol. Microbiol.* **29**, 477–490 (1998)
- Crowley D., Daly M., Lucey B., Shine P., Collins J.J., Cryan B., Moore J.E., Murphy P., Buckley G., Fanning S.: Molecular epidemiology of cystic fibrosis-linked *Burkholderia cepacia* complex isolates from three national referral centres in Ireland. *J. Appl. Microbiol.* **92**, 992–1004 (2002)
- Davies J.: Microbes have the last word. *EMBO Rep.* **8**, 616–621 (2007)
- Davies J., Davies D.: Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 417–433 (2010)
- Fluit A.C., Schmitz F.J.: Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**, 761–770 (1999)
- Fluit A.C., Schmitz F.J.: Resistance integrons and super-integrons. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 272–288 (2004)

15. Francia M.V., Zabala J.C., De La Cruz F., Garcia Lobo J.M.: The IntI1 integrase preferentially binds singlestranded DNA of the *attC* site. *J. Bacteriol.* **181**, 6844–6849 (1999)
16. Gillings, M.R.: Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome and microbial pangenome. *Front. Microbiol.* **4**, 4 (2013)
17. Girlich D.K.A., Poirel L., Cavin M.H., Verny C., Nordmann P.: Molecular epidemiology of an outbreak due to IRT-2 beta-lactamase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* in a geriatric department. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**, 467–473 (2000)
18. Hall R.M., Collis C.M.: Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol. Microbiol.* **15**, 593–600 (1995)
19. Hall R.M., Collis C.M.: Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resist. Updates*, **1**, 109–119 (1998)
20. Hansson K., Sundstrom L., Pelletier A., Roy P.H.: IntI2 integrase in Tn7. *J. Bacteriol.* **184**, 1712–1721 (2002)
21. Hisata K., K.A.K., Yamamoto M., Ito T., Nakatomi Y., Cui L.: Dissemination of methicillin-resistant *Staphylococci* among healthy Japanese children. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 3364–3372 (2005)
22. Katsumata R., Ozaki A., Oka T., Furuya A.: Protoplast transformation of glutamate-producing bacteria with plasmid DNA. *J. Bacteriol.* **159**, 306–311 (1984)
23. Koczura R., Mokracka J., Barczak A., Krysiak N., Kaznowski A.: Association between the presence of class 1 integrons, virulence genes and phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolates from river water. *Microb. Ecol.* **65**, 84–90 (2013)
24. Labbate M., Case R.J., Stokes H.W.: The integron/gene cassette system: an active player in bacterial adaptation. *Methods Mol. Biol.* **532**, 103–125 (2009)
25. Mazel D.: Integrons and the origin of antibiotic resistance gene cassettes. *ASM News*, **70**, 520–525 (2004)
26. Mazel D., Dychinco B., Webb V.A., Davies J.: Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1568–1574 (2000)
27. Mokracka J., Koczura R., Kaznowski A.: Transferable integrons of Gram-negative bacteria isolated from the gut of a wild boar in the buffer zone of a national park. *Ann. Microbiol.* **62**, 877–880 (2012)
28. Nandi S., Maurer J.J., Hofacre C., Summers A.O.: Gram-positive bacteria are a major reservoir of class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 7118–7122 (2004)
29. Nesvera J., Hochmannová J., Pátek M.: An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **15**, 391–395 (1998)
30. Partridge S.R., Tsafnat G., Coiera E., Iredell J.R.: Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**, 757–784 (2009)
31. Pinilla G., Muñoz L., Ruiz A., Chavarro B., Cifuentes Y.: Isolation of *Staphylococcus epidermidis* strain carrier of the class one integron in a septic neonatal patient. *Infection*, **13**, 196–202 (2009)
32. Ren C., Zhao Y., Shen Y.: Analysis of the effect of integrons on drug-resistant *Staphylococcus aureus* by multiplex PCR detection. *Mol. Med. Rep.* **7**, 719–724 (2013)
33. Rowe-Magnus D.A., Mazel D.: The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *Int. J. Med. Microbiol.* **292**, 115–125 (2002)
34. Shi L., Zheng M., Xiao Z., Asakura M., Su J., Li L., Yamasaki S.: Unnoticed spread of class 1 integrons in gram-positive clinical strains isolated in Guangzhou, China. *Microbiol. Immunol.* **50**, 463–467 (2006)
35. Stalder T., Barraud O., Casellas M., Dagot C., Ply, M.C.: Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Front. Microbiol.* **3**, 119 (2012)
36. Stokes H.W., Hall R.M.: A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol. Microbiol.* **3**, 1669–1683 (1989)
37. Tauch A., Gotker S., Puhler A., Kalinowski J., Thierbach G.: The 27.8-kb R-plasmid pTET3 from *Corynebacterium glutamicum* encodes the aminoglycoside adenyltransferase gene cassette *aadA9* and the regulated tetracycline efflux system Tet 33 flanked by active copies of the widespread insertion sequence IS6100. *Plasmid*, **48**, 117–129 (2002)
38. Wang L., Li Y., Chu J., Xu Z., Zhong Q.: Development and application of a simple LAMP method on rapid detection of *L. monocytogenes* strains. *Mol. Biol. Rep.* **39**, 445–449 (2012)
39. Xu Z., Shi L., Zhang C., Zhang L., Li X., Cao Y., Li L., Yamasaki S.: Nosocomial infection caused by class 1 integron-carrying *Staphylococcus aureus* in a hospital in South China. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 980–984. (2007)
40. Xu Z., Shi L., Alam M., Li L., Yamasaki S.: Integron-bearing methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in South China, 2001–2004. *FEMS Microbiol. Lett.* **278**, 223–230 (2008)
41. Xu Z., Li L., Alam M.J., Zhang L., Yamasaki S., Shi L.: First confirmation of integron-bearing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr. Microbiol.* **57**, 264–268 (2008)
42. Xu Z., Li L., Shirliff M.E., Peters B.M., Peng Y., Alam M.J., Yamasaki S., Shi L.: First report of class 2 integron in clinical *Enterococcus faecalis* and class 1 integron in *Enterococcus faecium* in South China. *Diagnostic Microbiol. Infect. Dis.* **68**, 315–317 (2010)
43. Xu Z., Li L., Shirliff M.E., Peters B.M., Li B., Peng Y., Alam M.J., Yamasaki S., Shi L.: Resistance class 1 integron in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in southern China, 2001–2006. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 714–718 (2011)
44. Xu Z., Li L., Shi L., Shirliff M.: Class 1 integron in staphylococci. *Mol. Biol. Rep.* **38**, 5261–5279 (2011)
45. Zhao X., Li Y., Wang L., You L., Xu Z., Li L., He X., Liu Y., Wang J., Yang L.: Development and application of a loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection *Escherichia coli* O157 strains from food samples. *Mol. Biol. Rep.* **37**, 2183–2188 (2010)

Artur Piński¹, Katarzyna Hupert-Kocurek^{1*}

¹ Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski

Wpłynęło w marcu 2016 r.
Zaakceptowano w maju 2016 r.

1. Wprowadzenie. 2. Genetyczne uwarunkowania kolonizacji rośliny przez endofity bakteryjne. 3. Genetyczne podłoże odporności bakterii endofitycznych na stres oksydacyjny i osmotyczny. 4. Mechanizmy sekrecji i translokacji białek efektorowych. 5. Czynniki transkrypcyjne zaangażowane w interakcje endofit bakteryjny-gospodarz. 6. Zmiany w ekspresji genów w interakcji endofit bakteryjny-roślina. 7. Podsumowanie

Genetic basis of endophytic bacteria-plant interactions

Abstract: Bacterial endophytes promote plant growth through colonization of the internal tissues of the plant without external signs of infection or negative effects on their host. Although endophytic bacteria enter the plant through the primary and lateral root hair cells, root cracks and wounds, they are found at many sites in the plants, such as stems, leaves, seeds, and xylem. The colonization of plant tissues comprises: host recognition, chemotactic migration of endophyte towards root exudates, adhesion to the surface of the root, penetration of the epidermis and finally adaptation to a new environment. The distinctive features of endophytic bacteria are their flagellar motility, secretion of the cell-wall degrading enzymes (CWDEs) and biofilm-forming ability. It is postulated that endophytic bacteria capable of colonizing plants should contain at least a minimum set of genes responsible for their endophytic behavior. Among them, genes involved in chemotaxis and adhesion processes, secretion and translocation of effector proteins as well as genes which facilitate survival in reactive-oxygen rich environment can be distinguished. An important group of genes are the ones which encode regulatory proteins involved in the control of gene expression at the transcriptional level. However, in establishing an endophytic association with plants, species-specific gene-functions seem to be involved. Identification of genes responsible for endophytic behavior will increase our knowledge about the genetic aspects of plant-endophyte interactions and enable to fully exploit their potential.

1. Introduction. 2. Genetic determinants of plant colonization by bacterial endophytes. 3. The genetic basis of endophytic bacteria resistance to oxidative and osmotic stress. 4. Mechanisms of secretion and translocation of effector proteins. 5. Transcription factors involved in the interactions of bacterial endophytes with the host. 6. Changes in gene expression in the plant-endophyte interactions. 7. Summary

Słowa kluczowe: bakterie endofityczne, białka efektorowe, kolonizacja rośliny
Key words: endophytic bacteria, effector proteins, plant colonization

1. Wprowadzenie

Endofity bakteryjne, to pochodzące głównie z ryzo-sfery, bakterie kolonizujące wewnętrzne tkanki roślin, niewywołujące objawów chorobowych [14]. Bakterie te mogą wnikać do rośliny poprzez włosniki, korzenie, jak również poprzez przetchlinki czy aparaty szparkowe [34]. Mogą dostawać się do wnętrza rośliny przez uszkodzenia wywołane czynnikami abiotycznymi lub enzymami degradującymi ściany komórkowe (CWDE – Cell Wall Degrading Enzymes) [19]. Endofity mogą pozostawać w miejscu wnikięcia do rośliny lub migrować poprzez jej system waskularny lub apoplast [36].

Zdolność bakterii do kolonizacji rośliny i oddziaływań endofitycznych z gospodarzem związana jest z genetycznym uwarunkowaniem ruchliwości, zdolności do adhezji do powierzchni korzenia i penetracji tkanek gospodarza, utrzymania potencjału redoks, jak również sekrecji i transportu substancji odżywczych. Ważną grupę genów stanowią geny kodujące białka

regulatorowe zaangażowane w kontrolę ekspresji genów na poziomie transkrypcji [2]. Cechy bakterii niezbędne w procesie kolonizacji rośliny i oddziaływań endofitycznych z gospodarzem przedstawiono w tabeli I.

2. Genetyczne uwarunkowania kolonizacji rośliny przez endofity bakteryjne

Proces kolonizacji rośliny zwykle rozpoczyna się od rozpoznania przez bakterie endofityczne specyficznych związków wydzielanych przez roślinę i migrację w kierunku ich źródła. Zdolność do przemieszczania się w kierunku bodźca chemicznego zwana jest chemotaksją dodatnią. Proces ten został szczegółowo poznany i opisany u *Escherichia coli* [31]. W odpowiedzi na pojawienie się w środowisku danego związku, chemiczny ligand zostaje rozpoznany przez zlokalizowany na powierzchni komórki chemoreceptor MCP (Methyl-accepting Chemotaxis Protein). Związanie

* Autor korespondencyjny: Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biochemii, ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, tel. 32 2009 462, email: katarzyna.hupert-kocurek@us.edu.pl

Tabela I
Cechy warunkujące zdolność bakterii do kolonizacji i oddziaływań endofitycznych z rośliną

Zdolność do ruchu	rzęski, pilusy typu IV
Adhezja do powierzchni korzenia, tworzenie biofilmu	rzęski, pilusy typu IV, egzopolisacharydy, lipopolisacharydy, hemaglutyniny/hemolizyny, włókna curli
<i>quorum sensing</i>	synteza AHL, receptory specyficzne dla AHL
Zdolność degradacji ściany komórkowej roślin	pektynazy, celulazy, proteazy
Odporność na stres oksydacyjny	katalaza, peroksydaza, transferaza S-glutationowa, dysmutaza ponadtlenkowa, pompy typu RND, synteza i degradacja PHB
Sekrecja i translokacja białek efektorowych	systemy sekrecji typu I–VI, system Sec i Tat

liganda powoduje wzbudzenie sygnału przenoszonego przez szereg białek chemotaktycznych (Che) na złożony kompleks białkowy rzęski. Jednym z chemotaktycznych białek zaangażowanych w przenoszenie sygnału jest kinaza histydynowa, CheA. Białko to, ulegając autofosforylacji, przenosi grupę fosforanową na białko CheY regulujące aktywność systemu oddziałującego bezpośrednio z flagellum, kontrolującego kierunek rotacji wici. Do grupy białek warunkujących przenoszenie sygnału i chemotaktyczny ruch bakterii w komórkach *E. coli* należą także: białko CheW modulujące aktywność CheA, metylotransferaza CheR i esteraza metylowa CheB katalizujące metylację MCP [31]. Obecność genu *chsA* kodującego białko CheA, jak również aktywność tego enzymu wykazano w komórkach endofitycznego szczepu *Azospirillum brasilense*. Badania Pedraza i wsp. [32] obejmujące mutagenezę i klonowanie genu *chsA* oraz izolację i charakterystykę białka CheA potwierdziły jego udział w chemotaktycznej odpowiedzi szczepu.

Ruchliwość jest jedną z ważniejszych cech bakterii endofitycznych umożliwiającą efektywną kolonizację rośliny. Bakterie te mogą przemieszczać się ruchem biernym, zgodnym z przepływem wody w roślinie, lecz aktywna ruchliwość umożliwia im niezależne przemieszczanie się w obrębie tkanek gospodarza. Zdolność endofitów bakteryjnych do ruchu wynika z obecności genów kodujących rzęski lub pilusy typu IV odpowiedzialne za drgający ruch komórek. Badania Mitter i wsp. [13] wykazały, że ruch drgający komórek uwarunkowany obecnością pilusów typu IV jest niezbędny do kolonizacji ryżu przez endofityczną bakterię *Azoarcus* sp. BH72. W komórkach szczepu BH72, synteza tego typu pilusów jest związana z obecnością genu *pilA*, kodującego krótki peptyd – prepilinę i genu *pilB*, kodującego białko niezbędne w procesie syntezy pilusów. Oba geny tworzą operon *pilAB* i są równocześnie transkrybowane. W komórkach szczepu *Azoarcus* sp. BH72 wykazano także obecność dodatkowego genu *pilT*, kodującego białko o aktywności ATPazy, odpowiedzialne za retrakcję pilusa typu IV warunkującą przesunięcie komórki [7]. Mutacja w obrębie genu *pilT*, kodującego białko PilT powoduje, że szczep BH72 tworzy mikrokolonie na powierzchni korzeni ryżu, lecz

jego zdolność do inwazji i kolonizacji tej rośliny jest znacznie upośledzona.

Kolejny, kluczowy etap kolonizacji rośliny przez bakterie polega na adhezji komórek bakteryjnych do powierzchni korzenia i ich intensywnych podziałach skutkujących utworzeniem biofilmu. Tworzenie biofilmu przez bakterie, jak i szereg procesów, takich jak: replikacja DNA, biosynteza metabolitów wtórnych czy bioluminescencja, ulega regulacji poprzez mechanizm *quorum sensing* (QS). U bakterii Gram-ujemnych, cząsteczkami sygnałowymi odpowiadającymi za QS, są najczęściej acylowe pochodne laktonu homoseryny (AHL). Cząsteczki te wydzielane są do środowiska, a gdy ich stężenie przekroczy wartość progową, następuje zmiana ekspresji genów we wszystkich komórkach danej populacji. Jak wykazały badania Dourado i wsp. [11], u endofitycznych bakterii z rodzaju *Methylobacterium* zagęszczenie komórek, a co za tym idzie, produkcja AHLs ma większy wpływ na ekspresję genów związanych z interakcjami pomiędzy bakteriami a gospodarzem, niż wydzieliny roślinne. Cząsteczki AHL zwiększają ekspresję genów związanych z metabolizmem bakterii (*mxoF*), adaptacją bakterii do stresu środowiskowego (*crtI*, *sss*) oraz reakcją bakterii na wydzieliny roślinne (*acdS*). W komórkach tych mikroorganizmów, w obecności wydzieliny roślinnych, jedynie gen *mxoF* ulega zwiększonej ekspresji. Zdolność do produkcji specyficznego laktonu, OOHL (lakton N-3-oksyoktanylo-L-homoseryny), wykazano w komórkach *Pantoea agglomerans* YS19. Ta endofityczna, diazotroficzna bakteria wyizolowana z ryżu, zdolna jest do tworzenia wielokomórkowych agregatów zwanych symplazmatami. Choć YS19 wnika do tkanek gospodarza w postaci pojedynczych komórek, to kolonizacja zachodzi w postaci symplazmat [53]. Badania Jiang i wsp. [17] wykazały, że inkubacja komórek *P. agglomerans* YS19 w pożywce z dodatkiem OOHL zwiększa ich zdolność do kolonizacji gospodarza o około 67%. W badaniach obserwowano również wzrost średniej świeżej masy siewek ryżu o 11,8%. Obserwowane efekty mogą wynikać z intensywniejszego tworzenia symplazmat i zwiększonej zdolności do ruchu komórek promowanej przez OOHL.

Wytwarzanie AHL nie zawsze wpływa na efektywność kolonizacji rośliny przez bakterie. Badania z użyciem laktonazy rozkładającej acylowe pochodne laktonu homoseryny produkowanej przez endofityczny szczep *Azospirillum lipoferum* B518, wykazały, że enzymatyczna dezaktywacja AHLs powoduje zanik aktywności pektynaz, zwiększoną syntezę sideroforów oraz zmniejszoną syntezę kwasu indoliloctowego (IAA). Nie obserwowano natomiast żadnych zmian w aktywności celulozy czy zdolności szczepu do poruszania się. Wyniki opisanych badań sugerują, że regulacja ekspresji genów istotnych dla kolonizacji rośliny, jak i promocji wzrostu gospodarza przez QS są specyficzne dla danego szczepu bakterii [6].

Wstępny etap kolonizacji rośliny – adhezję bakterii do korzenia, warunkują słabe odwracalne oddziaływanie międzycząsteczkowe. Kolejna faza oddziaływań jest nieodwracalna i wynika z oddziaływań między powierzchnią korzenia a fimbriami lub flagellami mikroorganizmu [34]. W *A. brasilense* Sp7, wici są niezbędne nie tylko do chemotaktycznego przemieszczania się bakterii w kierunku korzenia, ale także w początkowym etapie adhezji komórek i ich trwałym zakotwiczeniu. Mutanty badanego szczepu niewytwarzające wici nie wykazują zdolności do kolonizacji gospodarza [44]. Obniżoną zdolność do tworzenia biofilmu i poruszania się wykazywał także niezdolny do syntezy wici mutant szczepu *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 [5].

Zakotwiczenie endofitów bakteryjnych na powierzchni korzenia gospodarza, może być również związane z obecnością zewnątrzkomórkowych białek lub polimerów otoczkowych [34]. Włókna curli to główny białkowy składnik macierzy zewnątrzkomórkowej u wielu szczepów bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*. Włókna te zaangażowane są w procesy adhezji komórek do powierzchni korzenia, agregacji komórek bakteryjnych i formacji biofilmu. W genomie szczepu *Pseudomonas putida* W619 zlokalizowano dwa klastry genów: *csgEFG* i *csgAB*, które kodują białka odpowiedzialne za tworzenie tego typu włókien [50]. Jak wykazały badania de Oliveira Pinheiro i wsp. [10] nad kolonizacją roślin przez bakterie z rodzaju *Azospirillum*, w przytwierdzeniu bakterii do powierzchni korzenia może także uczestniczyć śluz wydzielany przez korzenie. Adhezja komórek do powierzchni korzenia możliwa jest również dzięki produkcji biofilmu, którego struktura stabilizowana jest przez egzopolisacharydy (EPS). Wprowadzenie mutacji w obrębie genu *gumD*, zaangażowanego w syntezę EPS u szczepu *G. diazotrophicus* Pal5, uniemożliwia przytwierdzenie się mutantu do powierzchni korzenia i efektywną kolonizację gospodarza [28].

W kolonizacji rośliny przez bakterie, równie ważna jest zdolność bakterii endofitycznych do produkcji kwasu indoliloctowego (IAA). IAA produkowany przez bakterie endofityczne może stymulować tworze-

nie korzeni bocznych i włośników, co powoduje zwiększenie powierzchni korzeni, a tym samym możliwości wnikania bakterii do wnętrza rośliny. Bakteryjny IAA rozluźnia strukturę ściany komórkowej, jak też zwiększa ilość produkowanych polisacharydów, które mogą być wykorzystywane przez inne mikroorganizmy. Polisacharydy przyciągają kolejne potencjalne endofity bakteryjne oraz umożliwiają wzrost i rozwój bakteriom ryzodermalnym. Bakteryjne IAA umożliwiają również, ominięcie systemu obronnego gospodarza poprzez osłabienie sygnalizacji związanej z IAA, co z kolei może przyczyniać się do osiągnięcia sukcesu kolonizacyjnego [12].

Bakterie endofityczne mogą wnikać do wnętrza rośliny w miejscach naruszenia ciągłości tkanek. Jednakże, ze względu na syntezę zewnątrzkomórkowych enzymów odpowiedzialnych za degradację roślinnej ściany komórkowej (CWDE – Cell Wall Degrading Enzymes), część tych mikroorganizmów wnikając do komórek gospodarza nie wymaga obecności uszkodzeń [34, 45]. Zdolność syntezy enzymów pektynolitycznych, celulolitycznych i proteolitycznych stwierdzono u szczepów: *Azoarcus* sp. BH72 [20], *Azospirillum irakense*, *Bulkholderia* sp. PsJN, *Enterobacter asburiae* JM22, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas* sp. IMBG294 [30], *Pseudomonas* sp. A3R3 [22], *Pseudomonas fluorescens* [34], *Klebsiella pneumoniae* 342 [13], *Azospirillum* sp. B510 [18] i *Pseudomonas stutzeri* A1501 [52].

W genomie endofitycznego szczepu *Azoarcus* sp. BH72 zidentyfikowano gen *eglA*, kodujący endoglukanazę (EC 3.2.1.4) hydrolizującą wiązania β -1,4-glikozydowe celulozy. Zwiększoną ekspresję genu *eglA* obserwowano w komórkach bakterii bytujących w pobliżu korzeni bocznych i wierzchołków korzeni ryżu, które są głównymi miejscami wnikania bakterii do wnętrza rośliny. Jak wykazały badania Krause i wsp. [20], mutanty w genie *eglA* charakteryzowały się obniżoną zdolnością do wewnątrzkomórkowej kolonizacji epidermy korzeni i brakiem zdolności do systemicznego rozprzestrzeniania się w siewkach ryżu. W komórkach badanego szczepu nie wykazano obecności genów kodujących inne enzymy z grupy CWDE [20, 37].

Zdolność do produkcji enzymów degradujących ściany komórkowe roślin wykazano także u szczepów *G. diazotrophicus* Pal5 i UAP5541. Szczepy te syntetyzują endoglukanazę (EC 3.2.1.4), endopolimetylogalakturnazę (EC 3.2.1.15) i endoksyloglukonazę (EC 3.2.1.151), które w przeciwieństwie do endoglukanazy szczepu *Azoarcus* sp. BH72, umożliwiają wykorzystanie odpowiednio celulozy, pektyny i ksyloglukanu, jako jedyne źródła węgla. Jak sugerują badania Adriano-Anaya i wsp. [1], regulacja syntezy tych enzymów stanowi mechanizm kontroli wzrostu *G. diazotrophicus* Pal5 i UAP5541 wewnątrz korzeni gospodarza.

Tabela II

Geny endofitów bakteryjnych warunkujące skuteczną kolonizację rośliny i funkcjonowanie bakterii w komórkach gospodarza

Szczep	Gen	Funkcja kodowanego peptydu/białka	Efekt inaktywacji genu	Źródło
<i>Azoracus</i> sp. BH72	<i>pilT</i>	retrakcja pilusa typu IV warunkująca ruch komórki białko	brak zdolności szczepu do ruchu drgającego, obniżenie o 50% zdolności szczepu do kolonizacji ryżu	[7]
<i>Azoracus</i> sp. BH72	<i>pilA</i>	strukturalne pilusa typu IV	obniżona zdolność do formowania mikrokolonii na powierzchni korzenia ryżu	[7]
<i>Azoracus</i> sp. BH72	<i>eglA</i>	hydroliza wiązań β -1-4-glikozydowych celulozy	obniżona zdolność kolonizacji komórek epidermy korzeni ryżu	[20]
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	<i>mot1</i> , <i>mot2</i> , <i>mot3</i>	synteza wici, zdolność do ruchu chemotaktycznego	brak zdolności adsorpcji do powierzchni korzeni, obniżona zdolność kolonizacji pszenicy	[43]
<i>Azospirillum brasilense</i>	<i>chsA</i>	kinaza histydynowa, białko chemotaktyczne, zaangażowane w przenoszenie sygnału	obniżona zdolność do chemotaksji i kolonizacji truskawek	[32]
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5	<i>gumD</i>	produkcja egzopolisacharydów	obniżona zdolność adsorpcji do powierzchni korzeni, tworzenia biofilmu i kolonizacji ryżu	[28]
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5	<i>sod</i>	dysmutaza nadtlenkowa, inaktywacja anionorodnika ponadtlenkowego	obniżona zdolność kolonizacji ryżu	[3]
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5	<i>gr</i>	reduktaza glutationowa, odtwarzanie zredukowanej formy glutationu	obniżona zdolność kolonizacji ryżu	[3]
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5	<i>flgA</i>	zdolność do ruchu chemotaktycznego	obniżona zdolność do tworzenia biofilmu i poruszania się	[39]
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	<i>hrpE</i> <i>hrcN</i>	białka systemu sekrecji typu III	obniżona zdolność kolonizacji ryżu	[41]
<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>invA</i>	jedno z białek rdzenia kompleksu sytemu sekrecji typu III	indukcja odpowiedzi systemu odpornościowego tytoniu	[42]

Ekspansyny to białka obecne w ścianie komórkowej roślin odpowiedzialne za rozluźnianie jej struktury. Rozrywają one, na drodze nieenzymatycznej, niekowalencyjne wiązania między mikrofibrylami celulozowymi a glikanami [38]. Wiele mikroorganizmów oddziałujących z roślinami jest zdolna do produkcji białek podobnych do ekspansyn. Geny kodujące zewnętrzkomórkowe białka posiadające domeny o strukturze podobnej do ekspansyn znaleziono w genomie *Micromonospora lupini* Lupac 08 wyizolowanej z brodawek korzeniowych *Lupinus angustifolius*. Sugeruje się, że produkcja białek podobnych do ekspansyn przez bakterie endofityczne może być również istotna dla promocji ich interakcji z roślinnym gospodarzem [46]. Geny endofitów bakteryjnych warunkujące skuteczną kolonizację rośliny i funkcjonowanie bakterii w komórkach gospodarza zebrano w tabeli II.

3. Genetyczne podłoże odporności bakterii endofitycznych na stres oksydacyjny i osmotyczny

Rośliny wytworzyły szereg różnych mechanizmów warunkujących ochronę przed infekcjami bakteryjnymi, wirusowymi i przed grzybami. Jednym z nich

jest produkcja reaktywnych form tlenu czy tlenku azotu [45]. W związku z tym, dla efektywnej kolonizacji komórek gospodarza, endofity bakteryjne muszą być przystosowane do przetrwania w środowisku bogatym w te związki [2].

Enterobacter sp. 638 to endofityczny szczep wyizolowany z topoli zdolny do promocji wzrostu roślin. W genomie tego szczepu zidentyfikowano szereg genów kodujących enzymy zaangażowane w procesy usuwania reaktywnych form tlenu, między innymi geny dysmutazy ponadtlenkowej, peroksyreduktazy, chloroperoksydazy, peroksydazy tiolowej, jak również geny kodujące enzymy umożliwiające syntezę glutationu. Szczep ten zdolny jest również do detoksykacji wolnych rodników tlenku azotu dzięki obecności genu kodującego dioksygenazę tlenku azotu oraz grupy genów kodujących enzymy beztlenowej redukcji azotanów. W komórkach *Enterobacter* sp. 638 kluczowym regulatorem aktywującym ekspresję genów zaangażowanych w obronę przed stresem oksydacyjnym indukowanym nadtlenkiem wodoru jest białko OxyR [24].

W komórkach *K. pneumoniae* 342, diazotroficznego endofita o szerokim zakresie gospodarza, zidentyfikowano gen kodujący białko Ada niezbędne do aktywowania transkrypcji genów zaangażowanych

w odpowiedź komórki na uszkodzenia wzoru metylacji DNA, które mogą być spowodowane przez czynniki alkilujące lub tlenek azotu. Badany szczep posiada także gen *uvrA*, kodujący endonukleazę zaangażowaną w naprawę uszkodzeń DNA, wywołanych m.in. nadtlaniem wodoru oraz geny kodujące dysmutazę nadtlenkową, katalazę, peroksydazę, peroksyreduktazę i transferazę glutationową. Podobnie jak *Enterobacter* sp. 638, szczep *K. pneumoniae* 342 zdolny jest do usuwania wolnych rodników tlenu azotu dzięki obecności białka odpowiedzialnego za detoksykację tlenu azotu i grupy genów kodujących enzymy beztlenowej redukcji azotanów [13]. W genomach obu szczepów bakterii zidentyfikowano także geny kodujące kompleks białkowy – AcrAB. Pompa AcrAB odpowiedzialna jest za usuwanie z komórek bakteryjnych fitoaleksyn, które są produkowane przez rośliny w odpowiedzi na infekcje wywołane przez patogeny roślin [13, 45].

Obecność genów kodujących białka zaangażowane w usuwanie reaktywnych form tlenu wykazano także w genomie *P. putida* W619, endosymbionta wyizolowanego z topoli [50] oraz szczepu *P. stutzeri* A1501, kolonizującego i infekującego korzenie ryżu [52]. W komórkach *P. putida* W619 odpowiedź na stres oksydacyjny regulowana jest przez czynnik transkrypcyjny PerR, którego aktywność zależy od obecności jonów Fe^{2+} lub Mn^{2+} . Białko to wiąże się z DNA powodując represję genów związanych z odpowiedzią na stres oksydacyjny. W obecności nadtlenu wodoru białko PerR oddysocjuje od DNA, dzięki czemu regulowane przez ten represor geny mogą ulec ekspresji [24, 50]. W odpowiedzi na obecność reaktywnych form tlenu w komórkach szczepu *P. stutzeri* A1501 obserwuje się natomiast indukcję genu *bcp* kodującego białko Bcp o aktywności peroksydazy tiolowej zależnej od tioredoksyny [35].

W komórkach *Agrobacterium tumefaciens* [8] i *P. putida* [40] w ochronę przed stresem oksydacyjnym zaangażowane jest białko wiążące DNA – Dps (DNA-binding protein from starved cells), zidentyfikowane i opisane po raz pierwszy u *E. coli*. W przeciwieństwie do *E. coli*, w komórkach *A. tumefaciens* białko Dps nie wiąże się z DNA, lecz jego ochronna rola wynika ze zdolności wiązania jonów żelaza i hamowania formacji rodników hydroksylowych [8].

Znaczącą rolę enzymów zaangażowanych w procesy usuwania reaktywnych form tlenu: reduktazy glutationowej i dysmutazy nadtlenkowej w endofitycznej kolonizacji ryżu przez szczep *G. diazotrophicus* Pal5 wykazały badania Alqueres i wsp. [3]. Insercyjna inaktywacja genów *gr* i *sod* kodujących odpowiednio te dwa enzymy (tabela II), prowadziła do znacznego obniżenia liczby bakterii kolonizujących korzenie badanej rośliny.

W trakcie kolonizacji rośliny, komórki bakteryjne muszą poradzić sobie także ze wzrastającym ciśnieniem osmotycznym. Dlatego też, wiele endofitów bak-

teryjnych posiada geny kodujące białka umożliwiające szybką odpowiedź na zmieniające się warunki środowiska zewnętrznego. Na przykład, w genomie *Azoarcus* sp. CIB, zidentyfikowano geny kodujące białka zaangażowane w transport i metabolizm osmoprotektantów, takich jak: N-tlenek trimetyloaminy, poliaminy czy sarkozyna, oraz kilka kopii genów kodujących enzymy umożliwiające syntezę i degradację poli(hydroksymaślanu) (PHB) [26].

Herbaspirillum seropedicae SmR1 i *H. frisingense* GSF30T są zdolne do produkcji innego ważnego osmoprotektanta – trehalozy. Szczep SmR1 posiada geny umożliwiające syntezę i degradację homopolimeru D-glukozy, którego metabolizm, podobnie jak w przypadku PHB produkowanego przez *Azoarcus* sp. CIB, może być związany ze zdolnością do radzenia sobie ze stresem osmotycznym i głodem [33, 44]. Szczep *G. diazotrophicus* Pal5 wykazuje tolerancję na wysokie stężenie sacharozy (do 30%), co stanowi ważne przystosowanie tej bakterii do bytowania w tkankach trzciny cukrowej, gdzie obserwuje się wysokie stężenie tego disacharydu. Tolerancja wysokich stężeń cukru może wynikać z obecności w komórkach szczepu Pal5 systemów transportu umożliwiających pobór proliny/betainy, di- i tripeptydów, jak też przewidywanej zdolności do syntezy, degradacji i transportu trehalozy. Pomimo wysokiej tolerancji na stres osmotyczny, szczep *G. diazotrophicus* Pal5 jest wrażliwy na stres solny. Zakłada się, że obecność jonów chlorkowych wpływa negatywnie na jego interakcje z roślinnym gospodarzem [5, 9].

4. Mechanizmy sekrecji i translokacji białek efektorowych

W oddziaływaniu bakterie endofityczne-roślina istotną rolę odgrywają cząsteczki efektorowe wydzielane do środowiska zewnętrznego lub wprowadzane bezpośrednio do komórek gospodarza. Sekrecja i translokacja białek efektorowych to kluczowe strategie mikroorganizmów mające na celu osłabienie układu odpornościowego gospodarza.

W komórkach bakterii Gram-ujemnych opisano funkcjonowanie sześciu typów systemów translokacji i sekrecji białek (T1SS – T6SS). U większości opisanych dotąd endofitów najczęściej spotykane są systemy typu I (T1SS) i typu II (T2SS). T1SS odpowiada za transport białek bezpośrednio na powierzchnię komórki bakteryjnej lub do otaczającego ją środowiska, podczas gdy sekrecja z udziałem T2SS jest procesem dwuetapowym, obejmującym transport białek przez błonę cytoplazmatyczną do przestrzeni peryplazmatycznej, a następnie na powierzchnię komórki [36].

Geny kodujące białka wchodzące w skład systemu sekrecji typu III zidentyfikowano w genomie endofi-

tycznego szczepu *H. seropedicae* SmR1 [33]. Sugeruje się, że obecność T3SS w komórkach tego szczepu może być związana z rozpoznawaniem bakterii przez gospodarza. Badania prowadzone z użyciem szczepu *Rhizobium* NGR234, wydzielającego białka efektorowe w odpowiedzi na flawonoidy wydzielane przez korzenie roślin, świadczą z kolei o roli systemu T3SS w optymalizacji oddziaływań bakteria–gospodarz. Jednym z białek efektorowych wydzielanych przez ten system jest białko NopL. Białko to hamuje ekspresję białek odpornościowych u gospodarza roślinnego. Ponadto, wykazano, że NopL wydzielane przez bakterie promuje tworzenie brodawek korzeniowych [2, 4, 33, 36]. Badania Shirron i Yaron [42] wykazały, że kolonizacja tytoniu (*Nicotiana tabacum*) przez żywe komórki *Salmonella* Typhimurium nie wywołuje objawów chorobowych, podczas gdy kolonizacja rośliny przez komórki niezdolne do syntezy białka NopL prowadzi do odpowiedzi ze strony układu odpornościowego rośliny. Indukcję systemu odpornościowego gospodarza wyrażającą się zmianami pH i produkcją reaktywnych form tlenu obserwowano także podczas kolonizacji tytoniu przez zmutowany szczep *Salmonella* Typhimurium, niosący delecję w genie *invA*, kodującym jedno z białek rdzenia kompleksu systemu sekrecji typu III (tabela II).

System sekrecji typu IV uczestniczy w procesie koniugacji oraz w transferze białek, DNA i nukleoproteinowych kompleksów do komórki docelowej. Obecność genów kodujących składniki kompleksu T4SS zlokalizowane zostały w genomie szczepów *G. diazotrophicus* PAL5, *K. pneumoniae* 342 i *Methylobacterium populi* BJ001. Dzięki systemowi T4SS szczep *A. tumefaciens* zdolny jest do wprowadzenia T-DNA do wnętrza komórki roślinnej [5, 36]. Identyfikacja systemów T3SS i T4SS u nielicznych bakterii endofitycznych może sugerować, że mechanizm modulacji odpowiedzi rośliny na wniknięcie bakterii, poprzez białka efektorowe wydzielane bezpośrednio do komórek gospodarza, nie jest powszechny w interakcjach endofit–roślina [36].

Dla większości zbadanych dotąd endofitów charakterystyczny jest system sekrecji typu V (T5SS). Jest on związany jest z transporterem Sec, który przenosi wydzielane białko do przestrzeni peryprazmatycznej, z której dzięki obecności w wydzielanym białku domeny translokacyjnej, przedostaje się ono na powierzchnię komórki [2]. Sekrecji z udziałem systemu T5SS ulegają na przykład białka zaangażowane w proces adhezji u szczepu *P. putida* W619 [50] czy też białka warunkujące kolonizację komórek roślinnych przez szczep *Enterobacter* sp. 638 [45].

Funkcjonowanie systemu sekrecji typu VI (T6SS) jest istotne dla przebiegu wielu procesów, między innymi: tworzenia biofilmu, koniugacji, regulacji QS, promocji i supresji wirulencji [15]. T6SS jest to kom-

pleks białkowy występujący u większości *Proteobacteria* umożliwiający translokację białek efektorowych do komórek eukariotycznych i prokariotycznych [21]. U wielu gatunków bakterii patogennych T6SS wydaje się być głównym czynnikiem determinującym ich wirulencję [27]. U *P. aeruginosa* natomiast, T6SS promuje antybakteryjną aktywność szczepu przeciw szerokiemu spektrum konkurencyjnych bakterii [15].

W komórkach szczepu *A. tumefaciens*, system T6SS zaangażowany jest w sekrecję rodziny białek efektorowych typu VI – DNaz (Tde), które wykazują aktywność antybakteryjną. Ochronę komórek bakteryjnym przed Tde zapewnia białko Tdi. Zdolność do sekrecji białka Tde jest jednym z przystosowań szczepu *A. tumefaciens* do kolonizacji rośliny. Obecność genów *tde/tdi* w genomach bakterii kolonizujących rośliny sugeruje konserwatywność tego mechanizmu u fitobakterii, jako sposobu uzyskania przewagi w środowiskach zasiedlanych przed wiele gatunków bakterii. Wykazano, że funkcjonowanie systemu T6SS może mieć także pozytywny wpływ na interakcje endofit–roślina [21]. Geny kodujące ten system sekrecji znalezione zostały w genomie niektórych bakterii endofitycznych, na przykład w komórkach *P. fluorescens* PICF7, u którego zlokalizowano dwa zestawy genów kodujących elementy tego systemu sekrecji [26].

Brak u niektórych bakterii endofitycznych genów kodujących kompleksy systemu sekrecji typu III i IV i obecność genów systemu sekrecji typu VI wskazuje, że organizmy będące endofitami można scharakteryzować jako „rozbrojone patogeny” [2].

5. Czynniki transkrypcyjne zaangażowane w interakcje endofit bakteryjny–gospodarz

W wyniku analizy porównawczej genomów endofitów bakteryjnych zidentyfikowano grupę konserwatywnych czynników regulujących metabolizm komórkowy, które najprawdopodobniej odpowiedzialne są za zachowania endofityczne. Do czynników tych należą białka: AraC, FrmR, AsnC, LrgB, LysR, DeoR i WrbA [2].

AraC to rodzina bakteryjnych czynników regulatorowych oddziałujących z DNA, które aktywują proces transkrypcji wielu różnych genów, chociaż mogą również działać jako represory tego procesu. Białka rodziny AraC zaangażowane są w regulację metabolizmu cukrów, procesów patogenezы i odpowiedzi na warunki stresowe [16].

Kolejna rodzina białek regulatorowych, LrgB, zaangażowana jest przede wszystkim w kontrolę aktywności mureinaz. Dlatego też, białka te najprawdopodobniej zaangażowane są w regulację nieinwazyjnej degradacji roślinnych ścian komórkowych, która zachodzi podczas infekcji gospodarza przez bakterie endofityczne [2].

Regulatory transkrypcji zaliczone do rodziny LysR należą do najbardziej rozpowszechnionych w królestwie *Prokaryota*. Uczestniczą one w regulacji ekspresji wielu funkcjonalnie zróżnicowanych zestawów genów. Do genów regulowanych przez białka LysR należą geny zaangażowane w wirulencję, metabolizm komórkowy, *quorum sensing*, zdolność do poruszania się, odpowiedź na stres oksydacyjny (np. OxyR i PerR), jak również w produkcję toksyn i ich sekrecję [23, 24].

Do wymienionych czynników transkrypcyjnych, które mogą być zaangażowane w interakcje gospodarz–endofit bakteryjny zaliczono również białko WrbA, flawoproteinę, której synteza w komórkach *E. coli* indukowana jest przez produkt genu *rpoS* kodującego alternatywny czynnik transkrypcyjny σ^S regulujący ekspresję genów zaangażowanych w odpowiedź komórki na czynniki stresowe. Jednakże rola białek WrbA w oddziaływaniu bakterii z roślinami nie została jeszcze w pełni wyjaśniona [2].

6. Zmiany w ekspresji genów w interakcji endofit bakteryjny–roślina

Ze względu na to, że kolonizacja roślin przez bakterie wpływa na wzrost i rozwój roślin, wytworzyły one szereg molekularnych mechanizmów warunkujących odpowiedź na inwazję przez te mikroorganizmy. Wiele genów roślinnych ulega zmienionej ekspresji podczas interakcji bakteria-roślina [48, 49]. Sugeruje to, że początkowe etapy kolonizacji rośliny przez bakterie endofityczne są aktywnie monitorowane i prawdopodobnie wzmacniane lub osłabiane przez gospodarza. Przykładem genu, którego ekspresja ulega zmianie podczas kolonizacji rośliny jest gen *shr5* kodujący białko zaangażowane w transdukcję sygnałów w komórkach roślinnych. Po inokulacji trzciny cukrowej diazotroficznymi bakteriami *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae* i *A. brasilense* obserwuje się obniżenie ekspresji tego genu [34]. Wyniki badań Vinagre i wsp. [47] wskazują, że im bardziej korzystna dla rośliny jest kolonizacja przez endofity, tym niższy poziom ekspresji genu *shr5*.

Nadekspresję genów związanych z chemotaksją oraz sekrecją obserwowano u szczepu *P. aeruginosa* w odpowiedzi na substancje wydzielane przez korzenie buraka cukrowego. W komórkach Gram-dodatniego szczepu *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 obserwowano silną indukcję ekspresji genów odpowiedzialnych za chemotaktyczny ruch komórki oraz rozkład substratów odżywczych, wywołaną przez wydzieliny korzeni kukurydzy. Analiza transkryptomu endofitycznego szczepu *B. subtilis* OKB105 przeprowadzona przez Xie i wsp. [51] wykazała natomiast zmiany w ekspresji 176 genów badanego szczepu po inkubacji z siewkami ryżu. Obserwowane zmiany w poziomie transkryp-

cji dotyczyły genów zaangażowanych w metabolizm, transport cukrów i aminokwasów, chemotaksję i ruch komórki, jak również sporulację i biosyntezę kwasu teichuronowego [51].

7. Podsumowanie

Bakterie endofityczne znajdują coraz więcej zastosowań w różnych dziedzinach biotechnologii, szczególnie w biotechnologii roślin i biotechnologii środowiska. Badania polowe potwierdzają skuteczność inokulowania roślin endofitami bakteryjnymi w celu stymulowania wzrostu gospodarza, jego ochrony przed szkodnikami, wskazują także na pozytywne aspekty wykorzystania tych organizmów do wspomagania procesów fitoekstrakcji oraz fitoremediacji terenów zdegradowanych. Bakterie te są również źródłem wielu substancji czynnych o właściwościach antibakteryjnych, przeciwwirusowych, przeciwnowotworowych czy przeciwgrybiczych. Dlatego też, niezmiernie istotnym wydaje się identyfikacja genów odpowiedzialnych za „endofityczne” zachowania oraz zrozumienie i poszerzenie wiedzy o genetycznych aspektach oddziaływań endofity bakteryjne – rośliny. Umożliwi to pełne wykorzystanie potencjału tej grupy bakterii.

Piśmiennictwo

- Adriano-Anaya M., Salvador-Figueroa M., Ocampo J.A., García-Romera I.: Plant cell-wall degrading hydrolytic enzymes of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Symbiosis*, **40**, 151–156 (2005)
- Ali S., Duan J., Charles T.C., Glick B.R.: A bioinformatics approach to the determination of genes involved in endophytic behavior in *Burkholderia* spp. *J. Theor. Biol.* **343**, 193–208 (2014)
- Alqueres S., Meneses C., Rouws L., Rothballer M., Baldani I., Schmid M., Hartmann A.: The bacterial superoxide dismutase and glutathione reductase are crucial for endophytic colonization of rice roots by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. *Mol. Plant Microbe Interact.* **23**, 937–945 (2013)
- Bartsev A.V., Deakin W.J., Boukli N.M., McAlvin C.B., Stacey G., Malnoe P., Broughton W.J., Staehelin C.: NopL, an effector protein of *Rhizobium* sp. NGR234, thwarts activation of plant defense reactions. *Plant Physiol.* **134**, 871–879 (2004)
- Bertalan M., Ferreira P.C.G. i wsp.: Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *BMC Genomics*, **10**, 450–457 (2009)
- Boyer M., Bally R., Perrotto S., Chaintreuil C., Wisniewski-Dyé F.: A quorum-quenching approach to identify quorum-sensing-regulated functions in *Azospirillum lipoferum*. *Res. Microbiol.* **159**, 699–708 (2008)
- Böhm M., Hurek T., Reinhold-Hurek B.: Twitching motility is essential for endophytic rice colonization by the N₂-fixing *Azoarcus* sp. strain BH7. *Mol. Plant Microbe Interact.* **20**, 526–533 (2007)
- Ceci P., Ilari A., Falvo E., Chiancone E.: The Dps protein of *Agrobacterium tumefaciens* does not bind to DNA but protects it toward oxidative cleavage: x-ray crystal structure, iron binding,

- and hydroxyl-radical scavenging properties. *J. Biol. Chem.* **278**, 20319–20326 (2003)
9. de Oliveira M.V., Intorne A.C., Vespoli L.S., Madureira H.C., Leandro M.R., Pereira T.N., Olivares F.L., Berbert-Molina M.A., De Souza Filho G.A.: Differential effects of salinity and osmotic stress on the plant growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. *Arch. Microbiol.* **198**, 287–294 (2016)
 10. de Oliveira Pinheiro R., Boddey L., James E., Sprent J., Bodde R.: Adsorption and anchoring of *Azospirillum* strains to roots of wheat seedlings. *Plant Soil*, **246**, 151–166 (2002)
 11. Dourado M.N., Bogas A.C., Pomini A.M., Andreote F.D., Quecine M.C., Marsaioli A.J., Araújo W.L.: *Methylobacterium*-plant interaction genes regulated by plant exudate and quorum sensing molecules. *Braz. J. Microbiol.* **10**, 1331–1339 (2014)
 12. Etesami H., Alikhani H.A., Hosseini H.M.: Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents. *MethodsX*, **2**, 72–78 (2015)
 13. Fouts D.E., Methé B.A. i wsp.: Complete genome sequence of the N₂-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. *PLoS Genet.* **4**(7), e1000141 doi: 10.1371/journal.pgen.1000141 (2008)
 14. Hardoim P.R., van Overbeek L.S., Elsas J.D.: Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.* **16**, 463–471 (2008)
 15. Hood R.D., Mougous J.D. i wsp.: A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria. *Cell Host Microbe*, **7**, 25–37 (2010)
 16. Ibarra J.A., Pérez-Rueda E., Segovia L., Puente J.L.: The DNA-binding domain as a functional indicator: the case of the AraC/XylS family of transcription factors. *Genetica*, **133**, 65–76 (2008)
 17. Jiang J., Wu S., Wang J., Feng Y.: AHL-type quorum sensing and its regulation on symplasmata formation in *Pantoea agglomerans* YS19. *J. Basic. Microbiol.* **55**, 607–616 (2015)
 18. Kaneko T., Sato S. i wsp.: Complete genomic structure of the cultivated rice endophyte *Azospirillum* sp. B510. *DNA Res.* **17**, 37–50 (2010)
 19. Klama J.: Współżycie endofitów bakteryjnych z roślinami. *Acta Scient. Polon.* **31**, 19–28 (2004)
 20. Krause A., Goesmann A. i wsp.: Complete genome of the mutualistic, N₂-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1385–1391 (2006)
 21. Ma L.S., Hachani A., Lin J.S., Filloux A., Lai E.M.: *Agrobacterium tumefaciens* deploys a superfamily of type VI secretion DNase effectors as weapons for interbacterial competition in planta. *Cell Host Microbe*, **16**, 94–104 (2014)
 22. Ma Y., Rajkumar M., Luo Y.M., Freitas H.: Inoculation of endophytic bacteria on host and non-host plants—Effects on plant growth and Ni uptake. *J. Hazard. Mater.* **195**, 230–237 (2011)
 23. Maddocks S.E., Oyston P.C.: Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology*, **154**, 3609–3623 (2008)
 24. Marinho H.S., Real C., Cyrne L., Soares H., Antunes F.: Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biol.* **2**, 535–562 (2014)
 25. Martín-Moldes Z., Díaz E. i wsp.: Whole-genome analysis of *Azoarcus* sp. strain CIB provides genetic insights to its different lifestyles and predicts novel metabolic features. *Syst. Appl. Microbiol.* **38**, 462–471 (2015)
 26. Martínez-García P.M., Ruano-Rosa D., Schilirò E., Prieto P., Ramos C., Rodríguez-Palenzuela P., Mercado-Blanco J.: Complete genome sequence of *Pseudomonas fluorescens* strain PICF7, an indigenous root endophyte from olive (*Olea europaea* L.) and effective biocontrol agent against *Verticillium dahlia*. *Stand. Genomic Sci.* **10**, 10 (2015)
 27. Mattinen L., Somervuo P., Nykyri J., Nissinen R., Kouvonen P., Corthals G., Auvinen P., Aittamaa M., Valkonen J.P., Pirhonen M.: Microarray profiling of host-extract-induced genes and characterization of the type VI secretion cluster in the potato pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *Microbiology*, **154**, 2387–2396 (2008)
 28. Meneses C.H.S.G., Rouws L.F.M., Simoes-Araujo J.L., Vidal M.S., Baldani J.I.: Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **24**, 1448–1455 (2011)
 29. Mitter B., Petric A., Shin M.W., Chain P.S., Hauberg-Lotte L., Reinhold-Hurek B., Nowak J., Sessitsch A.: Comparative genome analysis of *Burkholderia phytofirmans* PsJN reveals a wide spectrum of endophytic lifestyles based on interaction strategies with host plants. *Front. Plant. Sci.* **4**, 120 (2013)
 30. Pavlo A., Leonid O., Iryna Z., Natalia K., Maria P.A.: Endophytic bacteria enhancing growth and disease resistance of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Biol. Control*, **56**, 43–49 (2011)
 31. Pedraza R.O., Mentel M.I., Ragout A.L., Xiqui M.L., Segundo M.D., Baca B.E.: Plant growth-promoting bacteria: The role of chemotaxis in the association *Azospirillum brasilense*-plant. Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, (2009)
 32. Pedraza R.O., Motok J., Salazar S.M., Ragout A.L., Mentel M.I., Tortora M.L., Guerrero-Molina M.F., Winik B.C., Díaz-Ricci J.C.: Plant growth-promoting bacteria: The role of chemotaxis in the growth-promotion of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 265–272 (2009)
 33. Pedrosa F.P., Souza E.M. i wsp.: Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. *PLoS Genet.* **7**, e1002064. doi: 10.1371/journal.pgen.1002064 (2011)
 34. Pisarska K., Pietr S.J.: Bakterie endofityczne – ich pochodzenie i interakcje z roślinami. *Post. Mikrobiol.* **53**, 141–151 (2014)
 35. Rediers H., Bonnacerrere V., Rainey P.B., Hamonts K., Vanderleyden J., De Mot R.: Development and application of a dapB-based *in vivo* expression technology system to study colonization of rice by the endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas stutzeri* A15. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 6864–6874 (2003)
 36. Reinhold-Hurek B., Hurek T.: Living inside plants: bacterial endophytes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**, 435–443 (2011)
 37. Reinhold-Hurek B., Maes T., Gemmer S., Van Montagu M., Hurek T.: An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. BH72. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19**, 181–188 (2006)
 38. Rodakowska E., Kaspruwicz A., Łapa A., Łuczak M., Derba M., Wojtaszek P.: Ściany komórkowe jako źródło sygnałów regulujących procesy rozwojowe komórek roślin. *Biotechnologia*, **4**, 18–35 (2006)
 39. Rouws L.F.M., Simoes-Araujo J.L., Hemerly A.S., Baldani J.I.: Validation of a Tn5 transposon mutagenesis system for *Gluconacetobacter diazotrophicus* through characterization of a flagellar mutant. *Arch. Microbiol.* **189**, 397–405 (2008)
 40. Saumaa S., Tover A., Tark M., Tegova R., Kivisaar M.: Oxidative DNA damage defense systems in avoidance of stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **189**, 5504–5514 (2007)
 41. Schmidt M.A., Monteiro R.A. i wsp.: The type III secretion system is necessary for the development of a pathogenic and endophytic interaction between *Herbaspirillum rubrisubalbicans* and *Poaceae*. *BMC Microbiol.* **12**, 98 (2012)
 42. Shirron N., Yaron S.: Active suppression of early immune response in tobacco by the human pathogen *Salmonella*

- typhimurium*. *PLoS One*, **6**, e18855. doi: 10.1371/journal.pone.0018855 (2011)
43. Steenhoudt O., Vanderleyden J.: *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 487–506 (2000)
 44. Straub D., Rothballer M., Hartmann A., Ludewig U.: The genome of the endophytic bacterium *H. frisingense* GSF30T identifies diverse strategies in the *Herbaspirillum* genus to interact with plants. *Front. Microbiol.* **4**, 168 (2013)
 45. Taghavi S., van der Lelie D., Hoffman A., Zhang Y.B., Walla M.D., Vangronsveld J., Newman L., Monchy S.: Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. *PLoS Genet.* **6**(5), e1000943. doi: 10.1371/journal.pgen.1000943 (2010)
 46. Trujillo M.E., Bacigalupe R., Pujic P., Igarashi Y., Benito P., Riesco R., Médigue C., Normand P.: Genome features of the endophytic actinobacterium *Micromonospora lupini* strain Lupac 08: on the process of adaptation to an endophytic life style? *PLoS One*, **9**, e108522 (2014)
 47. Vinagre F., Vargas C., Schwarcz K., Cavalcante J., Nogueira E.M., Baldani J.I., Ferreira P.C., Hemerly A.S.: SHR5: a novel plant receptor kinase involved in plant-N₂-fixing endophytic bacteria association. *J. Exp. Bot.* **57**, 559–569 (2006)
 48. Wang Y., Ohara Y., Nakayashiki H., Tosa Y., Mayama S.: Microarray analysis of the gene expression profile induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* FPT9601-T5 in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **18**, 385–396 (2005)
 49. Wang W., Chen L.N., Wu H., Zang H., Gao S., Yang Y., Xie S., Gao X.: Comparative proteomic analysis of rice seedlings in response to inoculation with *Bacillus cereus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **56**, 208–215 (2013)
 50. Wu X., Monchy S., Taghavi S., Zhu W., Ramos J., van der Lelie D.: Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**, 299–323 (2010)
 51. Xie S., Wu H., Chen L., Zang H., Xie Y., Gao X.: Transcriptome profiling of *Bacillus subtilis* OKB105 in response to rice seedlings. *BMC Microbiol.* **15**, 21 (2015)
 52. Yan Y., Jin Q. i wsp.: Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 7564–7569 (2008)
 53. Zhang X., Li E., Xiong X., Shen D., Feng Y.: Colonization of endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 on host rice, with formation of multicellular symplasmata. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 1667–1673 (2010)

Daniel Wasilkowski^{1*}, Agnieszka Mrozik¹

¹ Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski

Wpłynęło w kwietniu 2016 r.
Zaakceptowano w lipcu 2016 r.

1. Wprowadzenie. 2. Strategie tolerancji metali ciężkich u mikroorganizmów i roślin. 3. Koncepcja fitostabilizacji wspomaganej. 4. Aktywność mikrobiologiczna gleby w warunkach fitostabilizacji wspomaganej. 5. Wskaźniki mikrobiologiczne a jakość gleby. 6. Przykłady *in situ* fitostabilizacji wspomaganej. 7. Podsumowanie

Recultivation of heavy metal-contaminated soils using aided phytostabilization

Abstract: The main anthropogenic sources of heavy metals in the environment are mining and smelting, refining and chemical industry, industrial and municipal wastes, transport as well as fertilizers and pesticides used in agriculture. Among all heavy metals, Cd, Cu, Pb, Hg, Ni and Zn are of major environmental and human health concern. The high toxicity of heavy metals causes the need to remove them from the contaminated soil using minimally invasive remediation solutions, called gentle remediation options (GRO). One of the attractive methods to reduce the labile fractions and toxicity of heavy metals in soil seems to be aided phytostabilization. It is a combination of phytostabilization using plants tolerant to trace metals and stabilizing soil against erosion with the initial chemical immobilization achieved by adding various organic and inorganic additives. The potential toxicity of trace elements depends on their specific form present in the environment, their reactivity, mobility, concentration and their availability to living organisms. The bioavailability of heavy metals in soil is constantly changing and depends on different physicochemical, biological and environmental parameters. Due to the fact that microorganisms respond quickly to the presence of stressors in the environment, the changes in metabolic activity, size and structure can be used as good indicators of the effectiveness of applied remediation technology for cleaning up contaminated sites and ecosystem quality.

1. Introduction. 2. Tolerance strategies in microorganisms and plants. 3. Concept of aided phytostabilization. 4. Microbial activity of soil under aided phytostabilization. 5. Microbial indexes and soil quality. 6. Examples of *in situ* aided phytostabilization. 7. Summary

Słowa kluczowe: fitostabilizacja wspomagana, gleba, metale ciężkie, mikroorganizmy, rośliny

Key words: aided phytostabilization, heavy metals, microorganisms, plants, soil

1. Wprowadzenie

Skażenie gleby metalami ciężkimi stanowi poważny problem w wielu uprzemysłowionych krajach na świecie i dotyczy terenów silnie zurbanizowanych [43]. Głównymi antropogenicznymi źródłami metali ciężkich w środowisku są zakłady przemysłu górniczego i hutniczego, petrochemicznego i chemicznego, odpady działalności przemysłowej i komunalnej, transport oraz stosowane w rolnictwie nawozy i pestycydy [2, 14]. Spośród wszystkich metali ciężkich za najbardziej niebezpieczne uważane są Cd, Cu, Pb, Hg, Ni i Zn. Pierwiastki te należą do priorytetowych zanieczyszczeń środowiska, zagrażających zdrowiu ludzkiemu zarówno ze względu na właściwości toksykologiczne, jak i powszechność występowania [29, 61].

Atrakcyjną alternatywą dla fizykochemicznych rozwiązań w detoksykacji i/lub eliminacji metali z gleby wydają się być bardziej bezpieczne i mniej ingerujące w środowisko biologiczne metody, określane wspólną nazwą GRO (gentle remediation options) [16, 40]. Należy do nich między innymi fitostabilizacja wspo-

magana, stosowana z powodzeniem w rekultywacji terenów zanieczyszczonych odpadami pokopalnianymi o dużej zawartości metali ciężkich. Polega ona na chemicznej stabilizacji metali z zastosowaniem różnych nieorganicznych i organicznych dodatków doglebowych w połączeniu z odpowiednio dobranymi gatunkami roślin [7, 11, 21, 31]. Celem tej technologii jest nie tylko usunięcie lub ograniczenie biodostępności metali ciężkich, ale także przywrócenie odpowiedniej jakości biologicznej gleby.

O potencjalnej toksyczności metali/metaloidów decyduje postać, w jakiej występują w środowisku, ich mobilność oraz stężenie i dostępność dla organizmów żywych [63, 80]. Biodostępność metali w glebie zmienia się dynamicznie i zależy od różnych czynników fizykochemicznych, biologicznych i środowiskowych [32]. Z uwagi na to, że mikroorganizmy charakteryzują się wyjątkową zdolnością adaptacji do zmieniających się warunków środowiskowych pomiary ich aktywności metabolicznej, liczebności i bioróżnorodności mogą być dobrymi wskaźnikami jakości, funkcjonowania i zmian zachodzących w glebie [8, 12, 78]. W połączeniu

* Autor korespondencyjny: Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski, ul Jagiellońska 28, 40-032 Katowice; tel. 32 2009576; e-mail: daniel.wasilkowski@us.edu.pl

z czynnikami fizykochemicznymi, taka kompleksowa analiza stanu i funkcji gleby może dostarczyć szczegółowych informacji o kierunku zmian zachodzących w glebie oraz zapewnić ocenę efektywności procesów remediacyjnych [8, 29, 60].

1. Strategie tolerancji metali ciężkich u mikroorganizmów i roślin

Mikroorganizmy i rośliny wyższe odgrywają istotną rolę w modyfikowaniu właściwości fizykochemicznych gleby, wpływając tym samym na biodostępność zawartych w niej metali. Kooperacja pomiędzy mikroflorą strefy ryzosferowej i roślinami stanowi bardzo ważny rodzaj pozytywnego oddziaływania, mającego wpływ na redukcję toksycznego charakteru metali ciężkich w glebie oraz kontrolowanie ich wnikania i akumulację w komórkach mikroorganizmów i roślin [23, 45, 69].

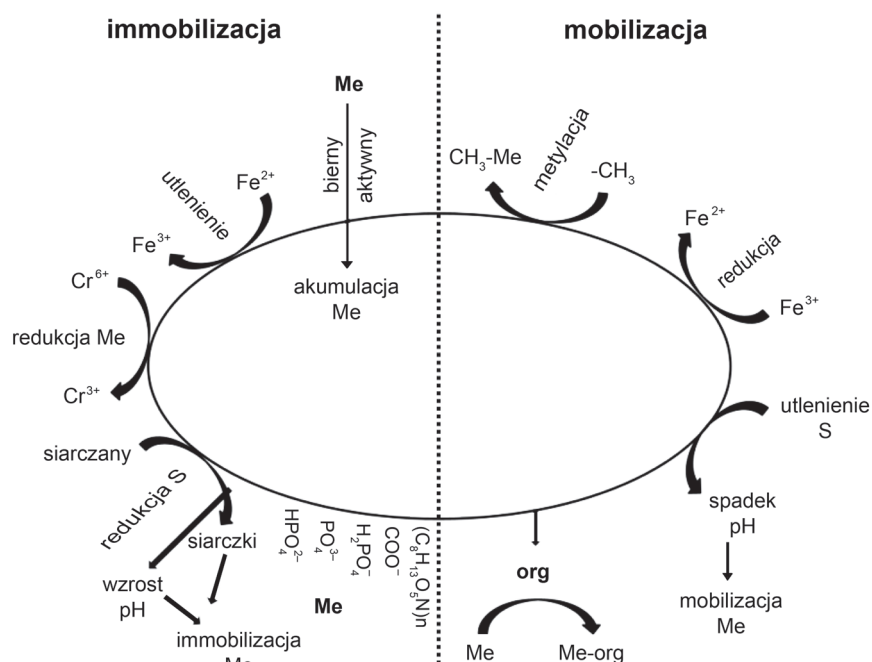
Aktywność mikroorganizmów glebowych jest jednym z istotnych czynników wpływającym na procesy związane z mobilizacją i immobilizacją metali. Mikroorganizmy posiadają zdolność wiązania form organicznych i nieorganicznych metali, zarówno rozpuszczalnych jak i nierozpuszczalnych, na powierzchni komórek w procesie zwanym biosorpcją [26, 44, 53]. Grupy karboksylowe peptydoglikanu bakterii Gram-dodatnich stanowią główne miejsca wiązania kationów metali na powierzchni komórki, natomiast u bakterii Gram-ujemnych taką funkcję pełnią grupy fosforanowe. U grzybów natomiast w wiązaniu metali na powierzchni komórki uczestniczy chityna wchodząca w skład ściany komórkowej [69]. Powinowactwo metali do powierzchni komórek mikroorganizmów przedstawia następujący szereg: $\text{Ni} > \text{Hg} > \text{U} > \text{As} > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Co} > \text{Cr} > \text{Pb}$ [84].

Metale ciężkie mogą również ulegać akumulacji wewnątrzkomórkowej w drodze ich transportu biernego/aktywnego przez błonę, a następnie ich wiązaniu, precypitacji i magazynowaniu przez wewnątrzkomórkowe struktury i organelle w postaci fosforanów, szczawianów i węglanów [26, 27, 45]. Wiele związków będących produktami metabolizmu mikroorganizmów może wiązać metale ciężkie. Do niespecyficznych związków o takim charakterze należą niskocząsteczkowe kwasy organiczne i alkohole oraz wielocząsteczkowe polisacharydy [69]. Specyficznymi natomiast związkami syntezowanymi przez mikroorganizmy w obecności toksycznych metali są metalotioneiny. Te niskocząsteczkowe białka zawierają liczne reszty cysteinowe, które uczestniczą w wiązaniu i detoksykacji jonów metali [58, 86]. Z kolei do precypitacji metali może dochodzić w drodze pozyskiwania energii z utleniania Fe^{2+} do Fe^{3+} lub utleniania związków siarki do H_2SO_4 [27]. Redukcja U^{6+} do U^{4+} i Cr^{6+} do Cr^{3+} prowadzi do zmniejszenia rozpuszczalności tych metali. Niektóre

bakterie redukujące metale i siarczany charakteryzują się zdolnością do wytrącania metali głównie w postaci wodorotlenków i siarczanów [26, 69].

Mikroorganizmy mogą również uwalniać metale ciężkie w glebie poprzez ich ługowanie, chelatację i metylację. Procesy te prowadzą do rozpadu nierozpuszczalnych związków metali i minerałów [26]. Aktywność bakterii heterotroficznych może prowadzić do zakwaszenia gleby i uwolnienia kationów metali związanych na przykład ze związkami organicznymi. Następuje to w wyniku między innymi uwolnienia z komórki do środowiska kwasów organicznych, spośród których kwas cytrynowy, glukonowy i szczawiowy mogą tworzyć wysoce mobilne, stabilne kompleksy z metalami [69, 73, 86]. Zdolność mikroorganizmów do detoksykacji Fe, Mg, Mn, Cr, Pb, Zn, Cd, Ga i Pu wynika ze zdolności do syntezowania i wydalanania z komórki niskocząsteczkowych białkowych chelatorów, zwanych sideroforami [68, 74]. Innymi metabolitami bakteryjnymi zwiększającymi mobilność metali są biosurfaktanty. Te amfipatyczne cząsteczki tworzą kompleksy z metalami ciężkimi obecnymi w macierzy glebowej, a następnie uwalniają je do roztworu glebowego zwiększając ich biodostępność [83]. Niektóre gatunki bakterii i grzybów mogą usuwać z gleby związki Se, As i Hg w drodze ich metylacji do lotnych pochodnych związków, takich jak: $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$ i $(\text{CH}_3)_2\text{Se}_2$, $(\text{CH}_3)_2\text{HAs}$ i $(\text{CH}_3)_3\text{As}$ oraz HgCH_3^+ i $\text{Hg}(\text{CH}_3)_2$ [11, 71]. Mikroorganizmy mogą także uwalniać potencjalnie biodostępne metale i metaloidy poprzez procesy oksydoredukcyjne. Redukcję większości metali przeprowadzają bakterie beztlenowe wykorzystujące Fe^{3+} jako końcowy akceptor elektronów. Do uwalniania metali może dochodzić w wyniku redukcji Fe^{3+} do Fe^{2+} lub obniżenia pH w następstwie utlenienia S [27]. Redukcja Fe^{3+} do Fe^{2+} i Mn^{4+} do Mn^{2+} zwiększa ich rozpuszczalność. Natomiast redukcja jonów Hg^{+2} do rtęci metalicznej Hg^0 i jej dyfuzja poza komórkę jest głównym mechanizmem unieszkodliwiania toksycznej formy Hg^{2+} [26, 86]. Procesy immobilizacji i mobilizacji metali ciężkich w glebie przez mikroorganizmy ilustruje rys. 1.

Rośliny wyższe posiadają zdolność do pochłaniania i neutralizowania aktywnych chemicznie zanieczyszczeń. Podczas swojego wzrostu wpływają na stężenie metali ciężkich w zanieczyszczonej glebie na dwa sposoby. Jednym z nich jest unikanie przyswajania metali ciężkich i blokowanie ich wchłaniania przez korzenie do tkanek roślinnych, natomiast drugim sposobem jest zdolność do pobierania, magazynowania i immobilizowania metali ciężkich poprzez ich wiązanie z cząsteczkami czynnymi biologicznie [17]. Pierwszą linią obrony roślin przed migracją metali ciężkich do wnętrza komórek jest poziom pozakomórkowy. Obecność zjawiska mikoryzy arbuskularnej z systemem korzeniowym roślin naczyniowych stanowi barierę chroniącą



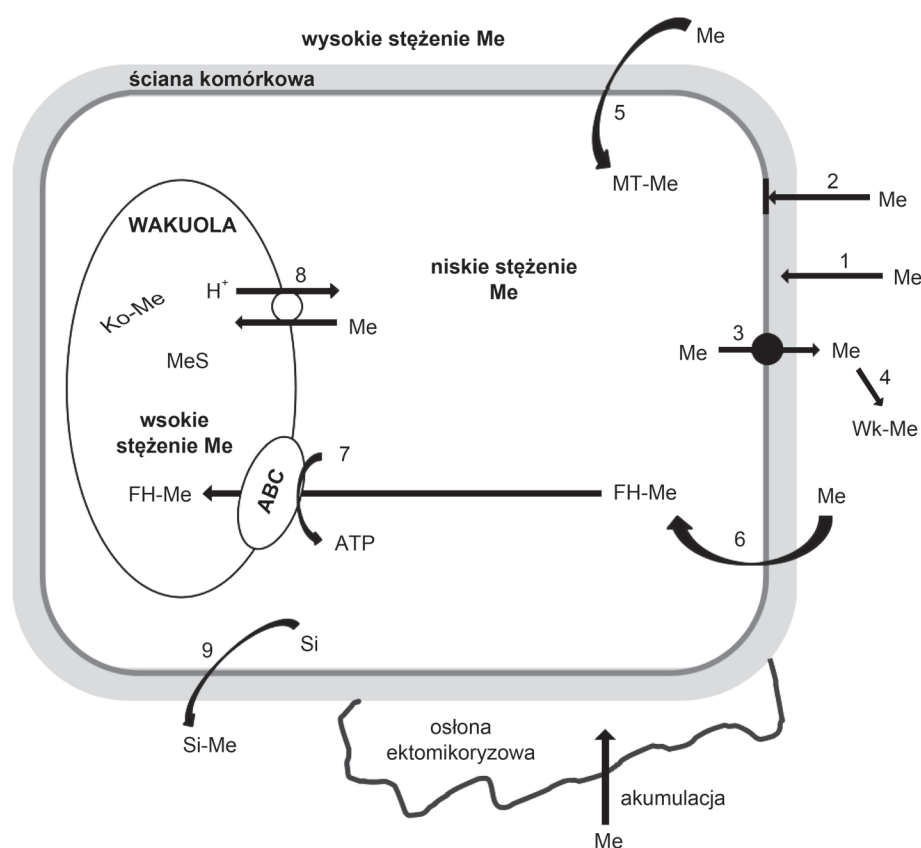
Rys. 1. Procesy immobilizacji i mobilizacji metali ciężkich w glebie przez mikroorganizmy
Me – metal, org – związek organiczny [23, 26, zmodyfikowany]

przed wnikaniem metali do tkanek roślinnych. Mikroryza odpowiada za adsorpcję lub chelatację biodostępnych w glebie form metali/metaloidów, w szczególności Hg, Se, Cd, Cu i Zn, ograniczając ich dostępność dla roślin [17, 69]. W zapobieganiu transportu metali przez ścianę komórki roślinnej biorą udział również elementy strukturalne ściany zdolne do immobilizowania metali ciężkich, jak na przykład: pektyny, grupy histydynowe i zewnątrzkomórkowe węglowodany. Innym rozwiązaniem pozwalającym roślinom na przetrwanie na terenach zanieczyszczonych metalami ciężkimi jest tworzenie trwałych kompleksów z wydzielinami korzeniowymi, co ogranicza dostępność i toksyczność metali. Składnikami tych wydzielin są między innymi: aminokwasy, kwasy organiczne, jony nieorganiczne, węglowodany, proste związki fenolowe, wodorowęglany, polisacharydowy śluz roślinny, czy siderofory [17, 35]. Drugą strategią obrony roślin przed toksycznym oddziaływaniem metali ciężkich jest ich wewnątrzkomórkowa detoksykacja. Polega ona na zapobieganiu transportowi jonów metali w poprzek błony komórkowej i ich inaktywacji poprzez wiązanie w komórce i/lub modyfikowanie do form mniej toksycznych. W wychwytywaniu toksycznych jonów metali ciężkich w cytozolu komórek roślinnych i ich transporcie uczestniczą bogate w grupy – SH polipeptydy, jak fitochelatyny i metalotioneiny. Podobne właściwości wiązania metali posiada także glutation. Związane w kompleksy metale są transportowane wzdłuż tonoplastu do wakuoli głównie z udziałem antyportu metal/H⁺ lub transportera ABC (ATP-binding cassette), czy rodziny transporterów ZIP (iron-,

zinc-regulated transporter-like proteins). W tonoplaście metale ciężkie unieruchamiane są w drodze ich wiązania z kwasami organicznymi (mügeinowym, fitowym) lub siarczkami [15, 17, 36, 57, 86]. Nisko-cząsteczkowe kwasy organiczne, takie jak: cytrynian, jabłczan, szczawian, fumaran i malonian mogą również chelatować metale ciężkie (szczególnie Cr³⁺, Cd²⁺ i U⁻), co prowadzi do ich akumulacji w liściach [73]. Mechanizmy tolerancji metali ciężkich u roślin ilustruje rys. 2.

2. Koncepcja fitostabilizacji wspomaganej

Fitostabilizacja wspomagana jest to metoda stosunkowo nowa, opracowana na przestrzeni ostatniej dekady, polegająca na zastosowaniu dogłębowych dodatków immobilizujących metale w połączeniu z odpowiednio dobranymi gatunkami roślin (rys. 3). W charakterze dodatków do gleby stosuje się pojedyncze lub w układach kombinowanych różne materiały nieorganiczne, takie jak: związki wapnia (szczególnie CaO) i fosforany (np. apatyt, wodorofosforan amonu), materiały ilaste (np. montmorylonit i zeolit), hematyt czy Fe(0) i/lub związki organiczne, na przykład: węgiel brunatny i drzewny, osady ściekowe, kompost, torf, popiół, trociny czy korę drzew. Ich aplikacja alkalizuje glebę, wzmacnia efekt wiązania mobilnej frakcji metali ciężkich poprzez absorbowanie, kompleksowanie bądź strącanie metali, zmniejszając tym samym ich biodostępność i toksyczność oraz zwiększa zawartość materii organicznej i zdolność zatrzymywania wody [10, 11, 29,



Rys. 2. Mechanizmy tolerancji metali ciężkich u roślin

1) wiązanie Me ze ścianą komórkową i z wydzielinami komórkowymi; 2) blokowanie przepływu Me przez błonę komórkową; 3) aktywny transport Me do apoplastu; 4) wiązanie metali z wydzielinami korzeniowymi; 5) kompleksowanie metali z metalotioneinami w cytozolu; 6) chelatacja Me z fitochełatynami w cytozolu; 7) transport kompleksu FH-Me do wakuoli za pośrednictwem transportera białkowego wiążącego ATP; 8) antyport protonowy i akumulacja Me w wakuoli; 9) wiązanie metali z sideroforami w apoplastie. FH – fitochełatyna, Ko-Me – kompleks kwasu organicznego z metalem, Me – metal, MeS – siarczek metalu, MT – metalotioneina, Si – siderofory, Wk – wydzieliny korzeniowe [17, 67, zmodyfikowany]

31, 56, 59]. Obecnie nowym podejściem w ograniczaniu biodostępnych form metali ciężkich w glebie jest stosowanie nanomateriałów, takich jak nanocząstki apatytu czy wapnia i tlenku wapnia [49, 54].

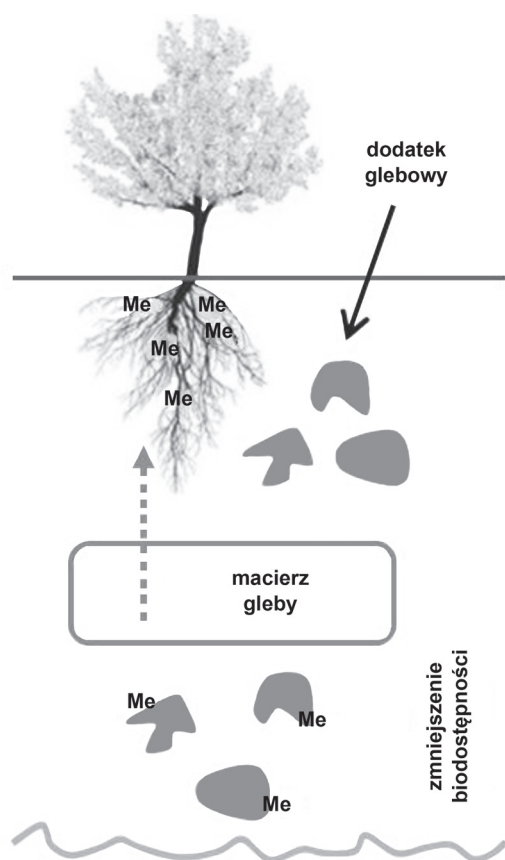
Dobór odpowiednich gatunków roślin na potrzeby fitostabilizacji jest najistotniejszym zadaniem poprzedzającym remediację skażonego terenu. Zaleca się używanie do tego celu roślin charakteryzujących się: tolerancją na wysokie stężenia metali ciężkich i ich magazynowaniem głównie w częściach podziemnych, małymi wymaganiami siedliskowymi, szybkim wzrostem i produkcją dużej biomasy, zdolnością tworzenia zwartej okrywy roślinnej oraz posiadających gęsty, wiązkowy system korzeniowy [18, 29, 64]. Przykłady roślin stosowanych w oczyszczaniu gleb skażonych metalami ciężkimi przedstawia tabela I.

Wzmocnienie efektu fitostabilizacji można również osiągnąć poprzez zwiększenie wzrostu roślin z wykorzystaniem bakterii promujących wzrost roślin (PGPB, plant growth-promoting bacteria) [10]. Mogą one stymulować proces fitoremediacji wpływając na biodostępność metali poprzez zmiany pH gleby, ułatwianie poboru z gleby azotu, fosforu i niezbędnych

mikroelementów przez rośliny, syntezę sideroforów i hormonów roślinnych (np. kwasu indoliloctowego) oraz zwiększenie wiązania metali ze związkami chelatującymi. Stymulacja wzrostu roślin przez PGPB lub inokulacja gleby PGPB może skutkować zwiększeniem tolerancji roślin na obecność metali ciężkich, dużym przyrostem biomasy roślinnej oraz zmniejszeniem

Tabela I
Wybrane rośliny jako fitostabilizatory metali ciężkich

Roślina	Metale	Źródło
<i>Lolium perenne</i> L.	As	[13]
	Pb, Cu	[37]
	Pb, Cu, Zn	[62]
<i>Festuca arundinacea</i> Schreb.	Cd, Pb i Zn	[31]
<i>Festuca ovina</i> L.	Pb, Cd, Zn	[51]
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Pb, Cd, Zn	[72]
<i>Lactuca sativa</i> L.	As, Pb, Cd, Zn	[43]
<i>Triticum aestivum</i> L.	Zn, Cd, Pb, Cu, Ni	[82]
<i>Spinacia oleracea</i> L.	Cu, Cd, Zn	[33]
<i>Trifolium repens</i> L.	Pb, Cd, Zn	[52]
<i>Miscanthus giganteus</i> L.	As	[34]



Rys. 3. Fitostabilizacja wspomagana metali ciężkich w glebie
Me – metal [opracowanie własne]

stresu środowiskowego. Takie podejście pozwala na zastosowanie mniejszej dawki dodatków stabilizujących metale ciężkie i stanowić może potencjalne źródło oszczędności finansowych [1, 19, 30, 75]. Liu i wsp. [50] badali na przykład wpływ PGPB z rodzajów: *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas*, *Agrobacterium* i *Ochrobactrum*, wyselekcjonowanych ze strefy ryzosferowej roślin rosnących na odpadach zanieczyszczonych Cu, na przyrost biomasy *Pennisetum purpureum* Schumach., *Oenothera erythrosepala* Borbás i *Medicago sativa* L. Po 60 dniach wzrostu roślin w obecności PGPB stwierdzili 4-krotnie większą biomasę części nadziemnych *P. purpureum* i 2-krotnie większą *O. erythrosepala* i *M. sativa* w stosunku do biomasy roślin kontrolnych. Inokulację gleby skażonej As, Cu, Pb i Zn bakteriami PGPB przeprowadzili również Grandlic i wsp. [30]. Celem tego eksperymentu było zbadanie wpływu trzech szczepów PGPB: *Clavibacter* sp. (MTR-21A), *Rhodanobacter* sp. (MTR-45B) i *Arthrobacter* sp. (K4-10C i MTR-44) na wzrost dwóch rodzimych, pustynnych gatunków traw *Atriplex lentiformis* Torr. i *Buchloe dactyloides* Nutt. Po upływie 72 dni od wysiewu traw stwierdzili, że biomasę *A. lentiformis* w glebie inokulowanej PGPB była 1,6–3-krotnie większa, a *B. dactyloides* 1,5–5-krotnie większa w porównaniu z biomasą traw w glebie kontrolnej.

3. Aktywność mikrobiologiczna gleby w warunkach fitostabilizacji wspomaganej

Utrzymanie wysokiej jakości gleby zapewniają organizmy glebowe, w tym przede wszystkim mikroorganizmy odpowiedzialne za zachodzące w niej procesy biogeochemiczne oraz za jej strukturę i produktywność [24]. Ze względu na to, że mikroorganizmy szybko reagują i dostosowują się do nowych warunków środowiskowych, skład i aktywność mikroflory gleby odzwierciedla interakcje pomiędzy czynnikami biotycznymi i abiotycznymi [9, 79]. Obecność w glebie metali/metaloidów może powodować w dłuższym czasie poważne skutki w funkcjonowaniu ekosystemu i negatywnie wpływać na biologiczne procesy glebowe [12, 78]. Aby rzetelnie ocenić skuteczność podjętych działań remediacyjnych w przywracaniu glebie jej funkcji i właściwości, wynikających ze standardów jakości określonych w Rozporządzeniu Ministra Środowiska z 9 września 2002 r. [20] powinno brać się pod uwagę nie tylko parametry fizykochemiczne gleby, ale również koniecznie uwzględniać jej aktywność biologiczną [43]. Takie podejście daje możliwość poznania słabo dotąd zbadanych reakcji mikroflory gleby w odpowiedzi na działanie czynnika zanieczyszczającego w zakresie zachodzących zmian w bioróżnorodności funkcjonalnej i strukturalnej zespołów mikroorganizmów. Na podstawie uzyskanych z takich badań informacji można wnioskować o charakterze zmian w całym ekosystemie oraz oceniać jakość biologiczną gleby [41, 58, 79]. Mimo, że takie podejście ma swoje uzasadnienie, wciąż stosunkowo niewiele jest prac o charakterze kompleksowym, poszerzających zakres prowadzonych pomiarów parametrów fizykochemicznych o szczegółowe analizy mikrobiologiczne i biochemiczne.

Mimo przewagi analiz fizykochemicznych nad mikrobiologicznymi, znane są doniesienia literaturowe o bardziej kompleksowym podejściu w ocenie odpowiedzi mikroflory gleby na zmiany stężenia metali podczas fitostabilizacji wspomaganej. Przykładem takich badań może być rekultywacja gleby skażonej Cd, Pb i Zn, wzbogaconej w kompost z odpadów rolniczych (ok. 269 t ha⁻¹ gleby) z wysianą trawą *Panicum virgatum* L. [6]. Wyniki tych badań wskazują, że po 711 dniach prowadzenia eksperymentu stężenia biodostępnych frakcji Zn, Cd i Pb w rekultywowanej glebie zmniejszyły się odpowiednio o 20, 30 i 75% w porównaniu do gleby kontrolnej. Dodatkowo stwierdzono, że całkowita biomasę mikroorganizmów (oznaczona na podstawie zawartości PLFAs) w tej glebie wynosiła 80,3 μmol kg⁻¹ s.m.⁻¹ gleby i była 2,5-krotnie wyższa od ich biomasy w glebie kontrolnej. W całkowitej biomasie mikroorganizmów biomasę bakterii Gram-dodatnich w glebie z dodatkiem kompostu stanowiła 53% i była ponad 3,5-krotnie wyższa od ich biomasy

w kontroli. Natomiast biomasy bakterii Gram-ujemnych, promieniowców i grzybów stanowiły odpowiednio 30, 2,5 i 20% i były 2-krotnie wyższe niż w glebie kontrolnej. Ponadto w glebie z dodatkiem kompostu wykazano 4-, 3-, 2 i 1,5-krotny wzrost aktywności enzymów, odpowiednio arylsulfatazy, fosfatazy zasadowej, β -glukozydazy i fosfatazy kwaśnej w stosunku do ich aktywności w kontroli. W innych badaniach Ascher i in. [5] stwierdzili, że biodostępność As w glebie poddanej chemicznej stabilizacji przez okres 6 lat w obecności beringitu (5%) i Fe (0) (1%) oraz ich mieszaniny była mniejsza niż w kontroli ($11,4 \mu\text{mol kg}^{-1}$ s.m. gleby) i wynosiła odpowiednio 8,14, 0,63 i $0,88 \mu\text{mol kg}^{-1}$ s.m. gleby. Dodatkowo w liściach sałaty (*Lactuca sativa* L.) po 2 miesiącach uprawy roślin w glebie z dodatkiem Fe (0) oraz Fe(0) i beringitu wykazano, że stężenie As było niższe odpowiednio o 50 i 79% niż w liściach roślin kontrolnych. Ponadto w układach tych oznaczono ponad 2-krotnie wyższą w odniesieniu do kontroli aktywność fosfatazy alkalicznej, fosfodiesterazy, β -glukozydazy i proteazy. W podobnych badaniach dotyczących wykorzystania Fe(0) (1%) i beringitu (5%) oraz kompostu (5%) w długoterminowej (4 lata) fitostabilizacji wspomaganiej gleby skażonej As Rajkumar i wsp. [69] stwierdzili 2,5–4-krotny wzrost stężenia biodostępnej frakcji tego metalu w stosunku do gleby kontrolnej. Jednocześnie w glebie z tymi dodatkami oznaczono znacznie wyższą aktywność wybranych enzymów glebowych w stosunku do kontroli. W szczególności wprowadzenie wszystkich dodatków w postaci skojarzonej wpłynęło na wzrost aktywności w glebie fosfatazy zasadowej (4-krotny), fosfodiesterazy (7-krotny), β -glukozydazy (5-krotny) i ureazy (10-krotny). Dodatki doglebowe stymulowały również wzrost 2 rodzimych gatunków roślin kłosówki wełniastej (*Holcus lanatus* L.) i sosny nadmorskiej (*Pinus pinaster* Aiton). Z kolei bogactwo gatunkowe bakterii wyrażone wartościami indeksu Shannona było największe w rekultywowanej glebie wzbogaconej w kompost.

Z badań Kohlera i wsp. [39] wynika, że aktywności dehydrogenaz i fosfatazy kwaśnej w glebie skażonej Zn, Cd, Cu i Pb, pochodzącej z terenów kopalni srebra i poddanej fitostabilizacji wspomaganiej, uzależnione były także od rodzaju dodatku doglebowego i gatunku hodowanej rośliny. Największą aktywność badanych enzymów stwierdzono w glebie z dodatkiem sfermentowanego odpadu z przetwórstwa buraka cukrowego, a najmniejszą w glebie z dodatkiem kompostu zielonego. Najwyższą aktywnością dehydrogenaz charakteryzowała się gleba z wysianym rodzimym gatunkiem *Bituminaria bituminosa* L., natomiast aktywność fosfatazy była najwyższa w glebie z wysianą trawą *Piptatherum miliaceum* L. Dla porównania aktywności tych enzymów w kontroli były niższe o 47% dla dehydrogenaz i o 19% dla fosfatazy. W innych badaniach

Mingorance i wsp. [59] mierzyli z kolei aktywność dehydrogenaz i fosfatazy alkalicznej w glebie skażonej Zn i Pb oraz stabilizowanej osadami ściekowymi, na której prowadzili uprawy pomidora jadalnego (*Lycopersicon esculentum* Mill.) i życicy trwałej (*Lolium perenne* L.). Podczas badań stwierdzili stymulujący wpływ osadów ściekowych na aktywności oznaczanych enzymów glebowych. Aktywności dehydrogenaz i fosfatazy zasadowej wzrastały w glebie wraz z aplikowanym stężeniem osadu. Ich aktywności w glebie z dodatkiem osadu w najwyższym stężeniu (10%) wynosiły odpowiednio $3664 \mu\text{g INTF g}^{-1} \text{godz.}^{-1}$ i $530 \mu\text{g PNP g}^{-1} \text{godz.}^{-1}$, natomiast w kontroli były znacznie niższe i wynosiły $60 \mu\text{g INTF g}^{-1} \text{godz.}^{-1}$ i $2,63 \mu\text{g PNP g}^{-1} \text{godz.}^{-1}$. Istotny wpływ na wzrost aktywności ureazy oraz fosfatazy w glebie skażonej Cd w wyniku aktywności górniczej miało również wzbogacenie jej w kompost oraz uprawa pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) [46]. W glebie tej z dodatkiem kompostu w najwyższej dawce (216 t ha^{-1}) w odniesieniu do kontroli oznaczono 4-krotnie wyższą aktywność ureazy, natomiast po dodaniu kompostu w najniższej dawce (27 t ha^{-1}) stwierdzono w niej 2-krotnie wyższą aktywność fosfatazy. Podobny materiał doglebowy w celu oceny jego wpływu na aktywność ureazy zastosowali Zornoza i wsp. [89]. Najwyższą aktywność enzymu oznaczyli w glebie z wysianą trawą *Piptatherum miliaceum* L. i łobodą solniskową (*Atriplex halimus* L.), natomiast w glebie kontrolnej ureaza była nieaktywna. Baker i wsp. [6] oceniali również w glebie skażonej Zn, Pb i Cd wpływ różnych stężeń nawozu krowiego na aktywność fosfataz kwaśnej i zasadowej w obecności proso różgowego (*Panicum virgatum* L.). Stwierdzili, że dodanie nawozu w dawce 269 t ha^{-1} powodowało ponad 2-krotny wzrost aktywności fosfatazy zasadowej i ponad 3-krotny aktywności fosfatazy kwaśnej niż w glebie z dawką nawozu 45 t ha^{-1} . Po 18 miesiącach eksperymentu aktywności fosfatazy kwaśnej i zasadowej w glebie z najwyższą aplikowaną dawką nawozu wzrosły odpowiednio o 24% i 34% w stosunku do ich aktywności w glebie kontrolnej.

Badaniom dotyczącym wpływu różnorodnych materiałów wprowadzanych do gleby na aktywność enzymatyczną i bioróżnorodność funkcjonalną mikroorganizmów towarzyszą niejednokrotnie analizy biomasy mikroorganizmów, oznaczanej na podstawie zawartości markerowych dla wybranych grup mikrobiologicznych fosfolipidowych kwasów tłuszczowych (PLFAs) [25]. Przykładem takich badań może być analiza biomasy bakterii i grzybów w glebie skażonej Pb-Ag i Zn z dodatkiem sfermentowanych odpadów roślinnych i popiołu lotnego [28]. Na podstawie analizy stężeń markerowych PLFAs dla bakterii, promieniowców i grzybów stwierdzono największą biomasę bakterii ($383,60 \mu\text{g kg}^{-1}$), promieniowców ($39 \mu\text{g kg}^{-1}$) i grzybów ($9,30 \mu\text{g kg}^{-1}$) w glebie z dodatkiem odpadu organicznego, a najmniej-

szą w glebie wymieszanej z popiołem (odpowiednio $174,00 \mu\text{g kg}^{-1}$, $26,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ i $1,00 \mu\text{g kg}^{-1}$). Z kolei Lee i wsp. [42] obserwowali 2-krotny wzrost biomasy mikroorganizmów w glebie z dodatkiem kompostu w porównaniu z ich biomasą w glebie kontrolnej. Podobnie Treonis i wsp. [81] stwierdzili wzrost całkowitej biomasy mikroorganizmów (o 37%) w następstwie wprowadzenia do gleby kompostu zielonego w porównaniu z ich biomasą w glebie kontrolnej. Odmienne natomiast wyniki uzyskali Watzinger i wsp. [85], którzy po wprowadzeniu do gleby węgla drzewnego stwierdzili spadek całkowitego stężenia PLFAs izolowanych z gleby o 13%.

Przykładem innych badań, w których przeprowadzono analizy PLFAs izolowanych bezpośrednio z gleby skażonej Zn i Pb, poddanej rekultywacji metodą fitostabilizacji wspomaganej w warunkach *in situ* na terenie kopalni, był eksperyment Zornoza i wsp. [89]. Badano w nim wpływ nawozu zwierzęcego dodanego do gleby na biomasę mikroorganizmów. Wyniki tych badań okazały się interesujące, ponieważ największą biomasę całkowitą bakterii oznaczono nie w glebie stabilizowanej, ale w glebie kontrolnej skażonej metalami (około $6,0 \mu\text{mol g}^{-1} \text{C}$). W glebie tej biomasy bakterii Gram-dodatnich ($1,6 \mu\text{mol g}^{-1} \text{C}$) i Gram-ujemnych ($1,4 \mu\text{mol g}^{-1} \text{C}$) były zbliżone. Dla porównania zawartość całkowita PLFAs w rekultywowanej glebie wynosiła $3\text{--}4 \mu\text{mol g}^{-1} \text{C}$, niezależnie od uprawianego gatunku rośliny. Ponadto dominowały w niej bakterie Gram-ujemne, których biomasa zawierała się w przedziale $0,5\text{--}0,9 \mu\text{mol g}^{-1} \text{C}$. W innych badaniach Baker i wsp. [6] oceniali między innymi wpływ nawozu krowiego dodanego do gleby zanieczyszczonej Zn, Pb i Cd na skład populacji mikroorganizmów. Rekultywację gleby prowadzono metodą fitostabilizacji wspomaganej w miejscu pierwotnego skażenia z wykorzystaniem prosa różgowego (*Panicum virgatum* L.). Analiza profili PLFAs wykazała, że w glebie z największą dawką materiału organicznego (269 t ha^{-1}) biomasa mikroorganizmów wynosiła $80,3 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{ s.m.}$ gleby i była o 62% wyższa niż w kontroli. W glebie tej dominowały bakterie, przy czym biomasa bakterii Gram-dodatnich była większa o 36% niż Gram-ujemnych. Z gleby tej wyizolowano również najwięcej markerowych PLFAs dla promieniowców i grzybów, których biomasy wynosiły odpowiednio $2,0$ i $16,4 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{ s.m.}$ gleby i były wyższe o 40% i 47% niż w kontroli.

4. Wskaźniki mikrobiologiczne a jakość gleby

Koncepcja „jakości gleby” powstała w latach 90. XX wieku. Termin ten definiowany jest jako „zdolność gleby do pełnienia swoistych dla niej funkcji” lub „stan funkcjonowania gleby odpowiedni do jej przeznaczenia” [38]. Dlatego też w ocenie skuteczności

podjętych działań w oczyszczaniu gleby skażonej metalami ciężkimi powinno się uwzględniać nie tylko parametry fizyczne gleby, ale także czynniki chemiczne i biologiczne [29, 59]. Dotychczas nie opracowano uniwersalnej formuły pozwalającej w sposób mierzalny przedstawić jakość gleby. Przyczyną tego może być brak standaryzacji wielu metod, powszechne stosowanie różnych metod na świecie, a także heterogeniczność gleby i warunki naturalne (roślinność i klimat) [8].

Z danych literaturowych wynika, że do oceny jakości gleby można stosować różne wskaźniki. Jednym z nich jest indeks jakości gleby, definiowany jako najmniejszy zestaw parametrów gleby, które w powiązaniu ze sobą dostarczają informacji o jej jakości i zdolności pełnienia określonej funkcji. Parametry te obejmują najczęściej: odczyn pH, zawartość substancji organicznych, biomasę mikroorganizmów, wydajność procesów oddechowych oraz aktywność enzymatyczną. Dotychczas wśród tych parametrów w charakterze jednej ze zmiennych indeksu jakości gleby nie znalazły zastosowania wskaźniki molekularne. Takie wskaźniki mogłyby być niezwykle przydatne w ustaleniu roli konkretnych mikroorganizmów w glebie oraz w selekcji kluczowych enzymów związanych z funkcjonowaniem gleby. Opracowanie takich wskaźników prawdopodobnie będzie możliwe dzięki osiągnięciom współczesnej genomiki, transkryptomiki i proteomiki [8].

Innym wskaźnikiem zaproponowanym przez Wyszowską i Wyszowskiego [87] w badaniach wpływu Cd i Mg na aktywność enzymów w glebie jest wskaźnik żyzności gleby M_w (soil fertility index). Jest on iloczynem procentowej zawartości węgla organicznego (%C) i sumy aktywności ureazy, dehydrogenaz, fosfatazy alkalicznej i kwaśnej. Kolejnym wskaźnikiem jakości gleby, opracowanym we wczesnych latach 90., jest indeks jakości gleby SQI (soil quality index), będący sumą i-tego wskaźnika wyrażonego jako iloczyn współczynnika regresji i linearnej lub nielilinearnej wartości i-tego wskaźnika [55, 76]. Jakość gleby można także wyrażać indeksem zmian w glebie SAI (soil alteration index), w którym zmiennymi mogą być aktywności wybranych enzymów glebowych lub stężenie określonych fosfolipidowych kwasów tłuszczowych (PLFAs). Indeks ten jest sumą iloczynu współczynnika a równania korelacji kanonicznej (raw canonical coefficients) i aktywności enzymów/stężeń PLFAs istotnych statystycznie w danych badaniach [66, 67].

Wyszowska i Wyszowski [87] na podstawie wartości indeksu M_w stwierdzili mniejszą żyzność gleby w obecności Cd. Poza tym nie stwierdzili wpływu ograniczenia mobilności tego metalu w glebie na jej żyzność. Puglisi i wsp. [67] wykazali wzrost wartości SAI w glebie pochodzącej z terenów kopalnianych, na których prowadzono zabiegi zmierzające do przywrócenia szaty roślinnej. Z kolei w innych badaniach indeks SAI

przyjmował niższe wartości dla gleb poddanych działalności antropogenicznej i intensywnemu nawożeniu niż dla gleb niezmiennych działalnością człowieka [66].

Jedynym opracowanym indeksem wiążącym parametry fizykochemiczne z biologicznymi jest indeks jakości gleby SQI. Badania Erkossa i wsp. [22] wykazały największy wzrost jakości gleby po wzbogaceniu jej w nawóz organiczny w porównaniu z innymi glebami poddanymi różnym zabiegom antropogenicznym. Indeks SQI znalazł również zastosowanie w badaniach dotyczących oceny wpływu rodzaju uprawianych roślin [77], częstotliwości [4] i rodzaju nawożenia [56] na jakość gleby. Pomimo, że autorzy różnych doniesień zwracają uwagę na istotność wyznaczania jakości gleby w oparciu o parametry fizyczne, chemiczne i biologiczne, to nie jest to powszechnie stosowaną praktyką.

5. Przykłady *in situ* fitostabilizacji wspomaganej

Fitostabilizacja wspomagana znalazła głównie zastosowanie w remediacji gleb terenów działalności wydobywczej i hutniczej. Była i jest ona szeroko praktykowana w wielu krajach Unii Europejskiej oraz w innych częściach świata. Badania w tym zakresie są jednak ograniczone częściej do kontrolowanych warunków laboratoryjnych niż do eksperymentów polowych. Takie badania pilotażowe mają swoje uzasadnienie, gdyż umożliwiają poznanie losów zanieczyszczeń w glebie i optymalizację fitotechnologii przed jej praktycznym zastosowaniem, ale niejednokrotnie nie są wdrażane na szerszą skalę [7].

Mimo potwierdzonej w wielu badaniach laboratoryjnych skuteczności fitostabilizacji wspomaganej w remediacji gleb skażonych metalami ciężkimi, wciąż niewiele jest publikacji na temat jej stosowania i efektywności w warunkach polowych. Pavel i wsp. [64] przeprowadzili badania w warunkach *in situ* na terenach przyległych do zamkniętej huty cynku i ołowiu w Rumunii. Autorzy pracy mieszały glebę z czerwonym szlamem i założyli na niej plantację trawy miskanta chińskiego (*Miscanthus giganteus* L.) W wyniku tych zabiegów udało się zmniejszyć stężenia biodostępnych frakcji Pb, Cd i Zn w glebie oraz uzyskać zmniejszoną akumulację metali ciężkich w korzeniach i częściach nadziemnych trawy. W innych badaniach prowadzonych bezpośrednio na terenach skażonych odciekami kopalnianymi w Hiszpanii oceniano potencjał kompostu bogatego w kwasy humusowe, leonardyty o dużej zawartości kwasów humusowych oraz wapna jako stabilizatorów Cd, Cu i Zn w glebie [88]. Aplikacja tych materiałów nie tylko znacząco wpłynęła na zmniejszenie stężeń biodostępnych frakcji metali ciężkich w skażonej glebie, ale również spowodowała ekspansję endemicznego gatunku *Cyndona dactylon* L.

na objętym badaniami terenie. Ponadto stwierdzono, że w obecności kompostu akumulacja Cu i Zn w tkankach nadziemnych tej rośliny była niewielka. Fitostabilizację wspomaganą wykorzystano również w warunkach polowych w Afryce do remediacji terenów silnie zanieczyszczonych Cu w wyniku działania huty [76]. Dodany do gleby wapień i kompost ograniczyły w niej mobilność jonów tego metalu. Dodatki doglebowe stymulowały także wzrost rodzimej rośliny *Microchloa altera* Rendle i ograniczały poziom akumulacji Cu w jej liściach. Próbkę immobilizacji Cd w glebie na terenie kopalni w Chinach poprzez intensywne jej nawożenie kompostem i uprawę pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) podjęli Li i wsp. [46]. Z badań tych wynika, że zabiegi te doprowadziły do redukcji biodostępnej frakcji Cd w glebie oraz zmniejszenia akumulacji tego metalu w łodygach roślin.

6. Podsumowanie

Zanieczyszczenie gleby metalami ciężkimi stanowi poważny problem ekologiczny, wymagający nie tylko monitorowania ich losów w środowisku, ale także opracowania i wdrażania innowacyjnych rozwiązań ich eliminacji i detoksykacji. Spośród różnych metod fitoremediacji obiecującą technologią w ograniczaniu mobilności metali ciężkich w glebie jest fitostabilizacja wspomagana, wykorzystująca zdolności roślin do redukcji stężeń bioprzyswajalnych zanieczyszczeń w obecności różnych dodatków doglebowych. Kluczowe znaczenie w intensyfikacji procesów usuwania metali z gleby oraz poprawy jej jakości ma dokładne poznanie relacji pomiędzy mikroorganizmami a roślinami, zbadanie mechanizmów unieruchamiania metali w obecności różnych materiałów oraz określenie wpływu czynników środowiskowych na zakres tych zależności i przebieg procesów. Znajomość takich zagadnień jest niezbędna, aby rekultywować skażone gleby zgodnie z unijnymi i krajowymi programami oraz strategiami w dziedzinie ochrony gleb i zapobieganiu dalszemu jej zanieczyszczeniu.

Aby określić stopień efektywności podjętych działań bioremediacyjnych na danym terenie z praktycznego punktu widzenia istnieje potrzeba wdrażania długoterminowego monitoringu ekologicznego. Monitoring obejmuje systematyczne prowadzenie empirycznych pomiarów wybranych parametrów i ich analizę przez okres minimum 10 lat. Taki długoterminowy program jest potrzebny, aby regularnie oceniać efekt zanieczyszczenia na zdrowie ludzi i środowisko [3, 19, 47]. Rozszerzeniem monitoringu ekologicznego jest proponowany przez Lindenmayera i wsp. [48] tzw. „monitoring adaptacyjny”. Obejmuje on powtarzające się cyklicznie w trakcie trwania remediacji danego obszaru

następujące działania: rozwój modeli koncepcyjnych, projektowanie eksperymentu, zbiór i analizę danych oraz ich interpretację. „Monitoring adaptacyjny” jest jedyną koncepcją, która może się rozwijać w odpowiedzi na pojawiające się problemy, nowe informacje, sytuacje lub warunki i wprowadzać w trakcie jego trwania stosowne rozwiązania.

Podziękowania

Artykuł powstał w wyniku realizacji projektu nr 2015/17/N/NZ9/01109 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

7. Piśmiennictwo

- Ahemad M.: Remediation of metalliferous soils through the heavy metal resistant plant growth promoting bacteria: paradigms and prospects. *Arab. J. Chem.*, DOI:10.1016/j.arabjc.2014.11.020 (2014)
- Ahmadpour P., Ahmadpour F., Mahmud T.M.M., Abdul A., Soleimani M., Tayefeh F.H.: Phytoremediation of heavy metals: a green technology. *Afr. J. Biotechnol.* **11**, 14036–14043 (2012)
- Alvarenga P., Palma P., de Varennes A., Cunha-Queda A.C.: A contribution towards the risk assessment of soils from the São Domingos Mine (Portugal): chemical, microbial and ecotoxicological indicators. *Environ. Pollut.* **161**, 50–56 (2012)
- Armenise E., Redmile-Gordon M.A., Stellacci A.M., Ciccarese A., Rubino P.: Developing a soil quality index to compare soil fitness for agricultural use under different managements in the Mediterranean environment. *Soil Tillage Res.* **130**, 91–98 (2013)
- Ascher J., Ceccherini M.T., Landi L., Mench M., Pietramellara G., Nannipieri P., Renella G.: Composition, biomass and activity of microflora, and leaf yields and foliar elemental concentrations of lettuce, after *in situ* stabilization of an arsenic-contaminated soil. *Appl. Soil Ecol.* **41**, 351–359 (2009)
- Baker L.R., White P.M., Pierzynski G.M.: Changes in microbial properties after manure, lime, and bentonite application to a heavy metal-contaminated mine waste. *Appl. Soil Ecol.* **48**, 1–10 (2011)
- Barbafieri M., Japenga J., Romkens P., Petruzzelli G.: Protocols for applying phytotechnologies in metal-contaminated soils (w) Plant-based remediation processes, red. D.K. Gupta, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2013, s. 19–37
- Bastida F., Zsolnay A., Hernández T., García C.: Past, present and future of soil quality indices: a biological perspective. *Geoderma*, **147**, 159–171 (2008)
- Bending G.D., Turner M.K., Jones J.E.: Interactions between crop residue and soil organic matter quality and the functional diversity of soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* **34**, 1073–1082 (2002)
- Bolan N.S., Park J.H., Robinson B., Naidu R., Huh K.Y.: Phytostabilization. A green approach to contaminant containment. *Adv. Agron.* **112**, 145–204 (2011)
- Bolan N.B., Kunhikrishnan A., Thangarajana R., Kumpiened J., Parke J., Makinof T., Kirkham M.B., Scheckel K.: Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils – to mobilize or to immobilize? *J. Hazard. Mater.* **266**, 141–166 (2014)
- Burns R.G., DeForest J.L., Marxsen J., Sinsabaugh R.L., Stromberger M.E., Wallenstein M.D., Weintraub M.N., Zoppini A.: Soil enzymes in a changing environment: current knowledge and future directions. *Soil Biol. Biochem.* **58**, 216–234 (2013)
- Cárcamo V., Bustamante E., Trángolao E., de la Fuente L.M., Mench M., Neaman A., Ginocchio R.: Simultaneous immobilization of metals and arsenic in acidic polluted soils near a copper smelter in central Chile. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **19**, 1131–1143 (2012)
- Causy D., Gochfeld M., Gurzau E., Neagu C., Ruedel H.: Lessons from case studies of metals: investigating exposure, bioavailability, and risk. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **56**, 45–51 (2003)
- Cobbett C.S.: Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.* **123**, 825–832 (2000)
- Cundy A.B., Bardos R.P., Church A., Puschenreiter M., Friesl-Hanl W., Müller I., Neu S., Mench M., Witters N., Vangronsveld J.: Developing principles of sustainability and stakeholder engagement for „gentle” remediation approaches: the European context. *J. Environ. Manage.* **129**, 283–291 (2013)
- Dalvi A., Bhalerao S.: Response of plants towards heavy metal toxicity: an overview of avoidance, tolerance and uptake mechanism. *Ann. Plant Sci.* **2**, 362–368 (2013)
- de-Bashan L.E., Hernandez J.P., Nelson K.N., Bashan Y., Maier R.M.: Growth of Quail bush in acidic, metalliferous desert mine tailings: effect of *Azospirillum brasilense* Sp6 on biomass production and rhizosphere community structure. *Microb. Ecol.* **60**, 915–927 (2010)
- de-Bashan L.E., Hernandez J.P., Bashan Y.: The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation – a comprehensive evaluation. *Appl. Soil Ecol.* **61**, 171–189 (2012)
- Dz.U. z 2002 r. Nr 165, poz. 1359
- Epelde L., Becerril J.M., Alkorta I., Garbisu C.: Adaptive long-term monitoring of soil health in metal phytostabilization: ecological attributes and ecosystem services based on soil microbial parameters. *Int. J. Phytoremediation*, **16**, 971–981 (2014)
- Erkossa T., Itanna F., Stahr K.: Indexing soil quality: a new paradigm in soil science research. *Soil Res.* **45**, 129–137 (2007)
- Fiałkowski K., Kacprzak M., Grobelak A., Placek A.: The influence of selected soil parameters on the mobility of heavy metals in soils. *Inż. Ochr. Środow.* **15**, 81–92 (2012)
- Frać M., Jezierska-Tys S.: Różnorodność mikroorganizmów środowiska glebowego. *Post. Mikrobiol.* **40**, 47–58 (2010)
- Frostegård Å., Tunlid A., Bååth E.: Use and misuse of PLFA measurements in soils. *Soil Biol. Biochem.* **43**, 1621–1625 (2011)
- Gadd G.M.: Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma*, **122**, 109–119 (2004)
- Gadd G.M., Bahri-Esfahani J., Li Q., Rhee Y.J., Wei Z., Fomina M., Liang X.: Oxalate production by fungi: significance in geomycology, biodeterioration and bioremediation. *Fungal Biol. Rev.* **28**, 36–55 (2014)
- García-Sánchez M., García-Romera I., Cajthaml T., Tlustoš P., Száková J.: Changes in soil microbial community functionality and structure in a metal-polluted site: the effect of digestate and fly ash applications. *J. Environ. Manage.* **162**, 63–73 (2015)
- Gómez-Sagasti M.T., Alkorta I., Becerril J.M., Epelde L., Anza M., Garbisu C.: Microbial monitoring of the recovery of soil quality during heavy metal phytoremediation. *Water Air Soil Pollut.* **223**, 3249–3262 (2012)
- Grandlic C.J., Palmer M.W., Maier R.M.: Optimization of plant growth-promoting bacteria-assisted phytostabilization of mine tailings. *Soil Biol. Biochem.* **41**, 1734–1740 (2009)
- Grobelak A., Nopora A.: The chemophytostabilisation process of heavy metal polluted soil. *Plos One*, **10**, 1–15 (2015)
- Guala S.D., Vega F.A., Covelo E.F.: The dynamics of heavy metals in plant-soil interactions. *Ecol. Modell.* **221**, 1148–1152 (2010)
- Hanauer T., Felix-Henningsen P., Steffens D., Kalandadze B., Navrozashvili L., Urushadze T.: *In situ* stabilization of metals

- (Cu, Cd, and Zn) in contaminated soils in the region of Bolnisi, Georgia. *Plant Soil*, **341**, 193–208 (2011)
34. Hartley W., Dickinson N.M., Riby P., Lepp N.W.: Arsenic mobility in brownfield soils amended with green waste compost or biochar and planted with *Miscanthus*. *Environ. Pollut.* **157**, 2654–2662 (2009)
 35. Kabata-Pendias A., Pendias H.: Trace elements in soils and plants. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, 2001
 36. Kabata-Pendias A., Mukherjee A.: Trace elements from soil to human. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2007
 37. Karami N., Clemente R., Moreno-Jiménez E., Lepp N.W., Beesley L.: Efficiency of green waste compost and biochar soil amendments for reducing lead and copper mobility and uptake to ryegrass. *J. Hazard. Mater.* **191**, 41–48 (2011)
 38. Karlen D.L., Ditzler C.A., Andrews S.S.: Soil quality: why and how? *Geoderma*, **114**, 145–156 (2003)
 39. Kohler J., Caravaca F., Azcón R., Diaz G., Roldán A.: Selection of plant species-organic amendment combinations to assure plant establishment and soil microbial function recovery in the phytostabilization of a metal-contaminated soil. *Water Air Soil Pollut.* **225**, 1930–1943 (2014)
 40. Komárek M., Vaněk A., Ettler V.: Chemical stabilization of metals and arsenic in contaminated soils using oxides – a review. *Environ. Pollut.* **172**, 9–22 (2013)
 41. Kumpiene J., Lagerkvist A., Maurice C.: Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments – a review. *Waste Manage.* **28**, 215–225 (2008)
 42. Lee J.J., Park R.D., Kim Y.W., Shim J.H., Chae D.H., Rim Y.S., Sohn B.K., Kim T.H., Kim K.Y.: Effect of food waste compost on microbial population, soil enzyme activity and lettuce growth. *Bioresour. Technol.* **93**, 21–28 (2004)
 43. Lee S.H., Kim E.Y., Park H., Yun J., Kim J.G.: *In situ* stabilization of arsenic and metal-contaminated agricultural soil using industrial by-products. *Geoderma*, **161**, 1–7 (2011)
 44. Leung K.T., Nandakumar K., Sreekumari K., Lee H., Trevors J.T.: A case study of bioremediation of polluted soil: biodegradation and toxicity of chlorophenols in soil (w) Modern soil microbiology, red. J.D. van Elsas, J.T. Trevors, E.M.H. Wellington, Marcel Dekker, Inc., New York, 1997
 45. Li M., Mohamed I., Raleve D., Chen W., Huang Q.: Field evaluation of intensive compost application on Cd fractionation and phytoavailability in a mining-contaminated soil. *Environ. Geochem. Health*, DOI 10.1007/s10653-015-9784-y (2015)
 46. Li Q., Csetenyi L., Gadd G.M.: Biomineralization of metal carbonates by *Neurospora crassa*. *Environ. Sci. Technol.* **48**, 14409–14416 (2014)
 47. Lindenmayer D.B., Likens G.E.: The science and application of ecological monitoring. *Biol. Conserv.* **143**, 1317–1328 (2010)
 48. Lindenmayer D.B., Likens G.E., Haywood A., Miezi L.: Adaptive monitoring in the real world: proof of concept. *Trends Ecol. Evol.* **26**, 641–646 (2011)
 49. Liu R., Zhao D.: Synthesis and characterization of a new class of stabilized apatite nanoparticles and applying the particles to *in situ* Pb immobilization in a fire-range soil. *Chemosphere*, **91**, 594–601 (2013)
 50. Liu W., Yang C., Shi S., Shu W.: Effects of plant growth-promoting bacteria isolated from copper tailings on plants in sterilized and non-sterilized tailings. *Chemosphere*, **97**, 47–53 (2014)
 51. Lopareva-Pohu A., Pourrut B., Waterlot C., Garçon G., Bidar G., Pruvot C., Shirali P., Douay F.: Assessment of fly ash-aided phytostabilisation of highly contaminated soils after an 8-year field trial. Part 1. Influence on soil parameters and metal extractability. *Sci. Total Environ.* **409**, 647–654 (2011a)
 52. Lopareva-Pohu A., Verdin A., Garçon G., Sahraoui A.L.H., Pourrut B., Debiane D., Waterlot C., Laruelle F., Bidar G., Douay F., Shirali P.: Influence of fly ash aided phytostabilisation of Pb, Cd and Zn highly contaminated soils on *Lolium perenne* and *Trifolium repens* metal transfer and physiological stress. *Environ. Pollut.* **159**, 1721–1729 (2011b)
 53. Ma Y., Prasad M.N.V., Rajkumar M., Freitas H.: Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnol. Adv.* **29**, 248–258 (2011)
 54. Mallampati S.R., Mitoma Y., Okuda T., Sakita S., Kakeda M.: Solidification and immobilization of heavy metals in soil using with nano-metallic Ca/CaO dispersion Mixture. *E3S Web of Conferences*, **35002**, 1–4 (2013)
 55. Mamindy-Pajany Y., Hurel C., Geret F., Roméo M., Marmier N.: Comparison of mineral-based amendments for *ex-situ* stabilization of trace elements (As, Cd, Cu, Mo, Ni, Zn) in marine dredged sediments: a pilot-scale experiment. *J. Hazard. Mater.* **252–253**, 213–219 (2013)
 56. Mastro R.E., Chhonkar P.K., Singh D., Patra A.K.: Alternative soil quality indices for evaluating the effect of intensive cropping, fertilisation and manuring for 31 years in the semi-arid soils of India. *Environ. Monit. Assess.* **136**, 419–435 (2008)
 57. Meagher R.B.: Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 153–162 (2000)
 58. Meharg A.: The mechanistic basis of interactions between mycorrhizal associations and toxic metal cations. *Mycol. Res.* **107**, 1253–1265 (2003)
 59. Mench M., Lepp N., Bert V., Schwitzguébel J.P., Gawronski S.W., Schröder P., Vangronsveld J.: Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: outcomes, assessment and outlook from COST Action 859. *J. Soils Sediments*, **10**, 1039–1070 (2010)
 60. Mingorance M.D., Olivia S.R., Valdés B., Gata F.J.P., Leidi E.O., Gurmán I., Peña A.: Stabilized municipal sewage sludge addition to improve properties of an acid mine soil for plant growth. *J. Soils Sediments*, **14**, 703–712 (2014)
 61. Mulligan C.N., Yong R.N., Gibbs B.F.: Remediation technologies for metal contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Eng. Geol.* **60**, 193–207 (2001)
 62. Nwachukwu O.I., Pulford I.D.: Soil metal immobilization and ryegrass uptake of lead, copper and zinc as affected by application of organic materials as soil amendments in a short-term greenhouse trial. *Soil Use Manag.* **25**, 159–167 (2009)
 63. Panagos P., Hiederer R., van Liedekerke M., Bampa F.: Estimating soil organic carbon in Europe based on data collected through an european network. *Ecol. Indic.* **24**, 439–450 (2013)
 64. Pandey V.C.: Invasive species based efficient green technology for phytoremediation of fly ash deposits. *J. Geochem. Explor.* **123**, 13–18 (2012)
 65. Pavel P.B., Puschenreiter M., Wenzel W.W., Diacu E., Barbu C.H.: Aided phytostabilization using *Miscanthus sinensis* × *giganteus* on heavy metal-contaminated soils. *Sci. Total Environ.* **479–480**, 125–131 (2014)
 66. Puglisi E., Nicelli M., Capri E., Trevisan M., Del Re A.A.M.: A soil alteration index based on phospholipid fatty acids. *Chemosphere*, **61**, 1548–1557 (2005)
 67. Puglisi E., Del Re A.A.M., Rao M.A., Gianfreda L.: Development and validation of numerical indexes integrating enzyme activities of soils. *Soil Biol. Biochem.* **38**, 1673–1681 (2006)
 68. Rajkumar M., Ae N., Prasad M.N.V., Freitas H.: Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnol.* **28**, 142–149 (2010)
 69. Rajkumar M., Sandhya S., Prasad M.N.V., Freitas H.: Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnol. Adv.* **30**, 1562–1574 (2012)
 70. Renella G., Landi L., Ascher J., Ceccherini M.T., Pietramellara G., Mench M., Nannipieri P.: Long-term effects of aided phytosta-

- bilisation of trace elements on microbial biomass and activity, enzyme activities, and composition of microbial community in the Jales contaminated mine spoils. *Environ. Pollut.* **152**, 702–712 (2008)
71. Robinson J.B., Tuovinen O.H.: Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury compounds: physiological, biochemical, and genetic analyses. *Microbiol. Rev.* **48**, 95–124 (1984)
 72. Ruttens A., Mench M., Colpaert J.V., Boissonc J., Carleerd R., Vangronsveld J.: Phytostabilization of a metal contaminated sandy soil. I: Influence of compost and/or inorganic metal immobilizing soil amendments on phytotoxicity and plant availability of metals. *Environ. Pollut.* **144**, 524–532 (2006)
 73. Ryan P.R., Delhaize E.F., Jones D.L.: Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 527–560 (2001)
 74. Schalk I.J., Hannauer M., Braud A.: New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environ. Microbiol.* **13**, 2844–2854 (2011)
 75. Shinwari K.I., Shah A., Afridi M.I., Zeeshan M., Hussain H., Hussain J., Ahmad O., Jamil M.: Application of plant growth promoting rhizobacteria in bioremediation of heavy metal polluted soil. *AJMS*, **3**, 179–185 (2015)
 76. Shutcha M.N., Faucon M.P., Kissi C.K., Colinet G., Mahy G., Luhembwe M.N., Visser M., Meerts P.: Three years of phytostabilisation experiment of bare acidic soil extremely contaminated by copper smelting using plant biodiversity of metal-rich soils in tropical Africa (Katanga, DR Congo). *Ecol. Eng.* **82**, 81–90 (2015)
 77. Sinha N.K., Mohanty M., Meena B.P., Das H., Chopra U.K., Singh A.K.: Soil quality indicators under continuous cropping systems in the arid ecosystem of India. *Afr. J. Agric. Res.* **9**, 285–293 (2014)
 78. Stefanis C., Alexopoulos A., Voidarou C., Vavias S., Bezirtoglou E.: Principle methods for isolation and identification of soil microbial communities. *Folia Microbiol.* **58**, 61–68 (2013)
 79. Stefanowicz A.: The Biolog plates technique as a tool in ecological studies of microbial communities. *Pol. J. Environ. Stud.* **15**, 669–676 (2006)
 80. Takáč P., Szabová T., Kozáková L., Benková M., Takáč, P.: Heavy metals and their bioavailability from soils in the long-term polluted central Spiš region of SR. *Plant Soil Environ.* **55**, 167–172 (2009)
 81. Treonis A.M., Austin E.E., Buyer J.S., Maul J.E., Spicer L., Zasada I.A.: Effects of organic amendment and tillage on soil microorganisms and microfauna. *Appl. Soil Ecol.* **46**, 103–110 (2010)
 82. Usman A.R.A., Kuzyakov Y., Lorenz K., Stahr K.: Remediation of a soil contaminated with heavy metals by immobilizing compounds. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **169**, 205–212 (2006)
 83. Venkatesh N.M., Vedaraman N.: Remediation of soil contaminated with copper using rhamnolipids produced from *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 2297 using waste frying rice bran oil. *Ann. Microbiol.* **62**, 85–91 (2012)
 84. Violante A., Cozzolino V., Perelomov L., Caporale A., Pigna M.: Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids in soil environments. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **10**, 268–292 (2010)
 85. Watzinger A., Feichtmair S., Kitzler B., Zehetner F., Kloss S., Wimmer B., Zechmeisters-Boltenstern S., Soja G.: Soil microbial communities responded to biochar application in temperate soils and slowly metabolized ¹³C-labelled biochar as revealed by ¹³C PLFA analyses: results from a short-term incubation and pot experiment. *Eur. J. Soil Sci.* **65**, 40–51 (2014)
 86. Wu G., Kanga H., Zhang X., Shao H., Chu L., Ruand C.: A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metals from contaminated soils: issues, progress, eco-environmental concerns and opportunities. *J. Hazard. Mater.* **174**, 1–8 (2010)
 87. Wyszowska J., Wyszowski M.: Effect of cadmium and magnesium on enzymatic activity in soil. *Pol. J. Environ. Stud.* **12**, 473–479 (2003)
 88. Xiong J., Madejón P., Madejón E., Cabrera F.: Assisted natural remediation of a trace element-contaminated acid soil: an eight-year field study. *Pedosphere*, **25**, 250–262 (2015)
 89. Zornoza R., Acosta J.A., Martínez-Martínez S., Faz A., Bååth E.: Main factors controlling microbial community structure and function after reclamation of a tailing pond with aided phytostabilization. *Geoderma*, **245–246**, 1–10 (2015)

Aleksandra Góralczyk¹, Anna Jasińska¹, Jerzy Długoński^{1*}

¹ Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

Wpłynęło w kwietniu 2016 r.
Zaakceptowano w sierpniu 2016 r.

1. Wprowadzenie. 2. Barwniki syntetyczne – budowa, podział i zastosowanie. 3. Barwniki a środowisko. 4. Metody usuwania barwników syntetycznych ze ścieków. 4.1. Metody chemiczne i fizyczne. 4.2. Metody biologiczne. 4.2.1. Biosorpcja. 4.2.2. Bioakumulacja. 4.2.3. Biodegradacja. 4.3. Sposoby zwiększania wydajności procesu mikrobiologicznej dekoloryzacji barwników. 4.4. Zaawansowane techniki analityczne wykorzystywane w badaniach nad dekoloryzacją barwników. 5. Podsumowanie

Microbial elimination of toxic industrial dyes

Abstract: Many industrial dyes are commonly present in wastewater and, due to its toxicity, mutagenicity and carcinogenicity, can cause serious pollution of the aquatic environment. So far, a number of strategies has been developed for dye elimination from wastewater, however, the most promising method seems to be bioremediation involving various microorganisms such as bacteria, fungi and microscopic algae. This article presents the latest research on microbial decolourisation of synthetic dye. Microorganisms capable for decolourisation, mechanisms involved in the bioremoval of dyes and analytical tools applied in process characterization have been summarised. In addition, this review discusses genetic manipulation of microorganisms and enzymes used for dye decolourisation.

1. Introduction. 2. Synthetic dyes – structure, classification and application. 3. Impact of dyes on the environment. 4. Methods for dye removal. 4.1. Chemical and physical methods. 4.2. Biological methods. 4.2.1. Biosorption. 4.2.2. Bioaccumulation. 4.2.3. Biodegradation. 4.3. Enhancement of the microbial decolourisation of dyes. 4.4. Advanced analytical tools in the decolourisation studies. 5. Conclusions

Słowa kluczowe: barwniki, biodegradacja, dekoloryzacja, enzymy, mikroorganizmy

Key words: dyes, biodegradation, decolourisation, enzymes, microorganisms

1. Wprowadzenie

Do połowy XIX wieku związki używane przez człowieka do barwienia tkanin, skór czy przedmiotów codziennego użytku otrzymywano wyłącznie z naturalnych źródeł nieorganicznych i organicznych np. hematytu, sadzy, liści, kwiatów i krwi zwierząt. Dopiero w XIX wieku opracowano metody otrzymywania barwników syntetycznych na skalę przemysłową. Pionierem w tej dziedzinie był 18-letni student Wiliam Henry Perkin, który na drodze nieudanej próby syntezy chininy uzyskał niebieską substancję, opatentowaną później jako purpura anilinowa. Od tej pory do produkcji przemysłowej wprowadzono ok. 10 000 różnych syntetycznych środków barwiących, które całkowicie wyparły barwniki pochodzenia naturalnego [72].

2. Barwniki syntetyczne – budowa, podział i zastosowanie

Z technologicznego punktu widzenia barwnikami nazywamy związki chemiczne, które po zetknięciu się z materiałami takimi jak np. włókna naturalne i sztuczne, papier czy tworzywa syntetyczne, wiążą się z nimi

w sposób trwały nadając im odpowiednie zabarwienie. Pod względem chemicznym barwniki to związki, które posiadają zdolność do wybiórczego pochłaniania promieniowania elektromagnetycznego w zakresie widzialnym, czyli dla fal o długości 400–700 nm. Pochłanianie promieniowania widzialnej części widma jest możliwe dzięki obecności w cząsteczce barwnika jonów, atomów lub ugrupowań chemicznych, w których pod wpływem światła następuje przejście elektronu ze stanu podstawowego w stan wzbudzony. Ugrupowanie takie nazywamy chromoforem (z łac. *chroma* – barwa, *foros* – niosący) i najczęściej występuje ono w postaci wiązania $-C=C-$, $-C=N-$, $-C=O-$, $-N=N-$, $-NO_2$ lub pierścienia chininowego. Drugą niezwykle istotną strukturą jest auksochrom – elektrodonorowe ugrupowanie atomów powodujące intensyfikację barwy. Do auksochromów należą m.in. ugrupowania $-NH_2$, $-COOH$, $-SO_3H$, $-OH$ [68].

Pod względem struktury chemicznej oraz rodzaju obecnego w cząsteczce barwnika chromoforu wyróżnia się ok. 20–30 klas barwników [75]. Najważniejsze spośród nich to barwniki azowe (mono-, di-, tri-, poliazowe), trójfenylometanowe, antrachinonowe, nitrowe, nitrozowe, ftaleinowe, indygoideowe i inne. Inna klasyfikacja opiera się na stosowanej metodzie barwienia

* Autor korespondencyjny: Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki; Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: jdlugo@biol.uni.lodz.pl

oraz rodzaju sił odpowiadających za wiązanie barwnika z substratem. W proces ten zaangażowane mogą być różne typy oddziaływań chemicznych, do których najczęściej należą siły Van der Waalsa, wiązania wodorowe, jonowe lub kowalencyjne [19].

Barwniki najpowszechniej używane są w przemyśle tekstylnym, papierniczym, kosmetycznym, podczas produkcji farb, lakierów i tworzyw syntetycznych. Stosuje się je również do kontroli skuteczności procesów oczyszczania ścieków, w celu określenia powierzchni właściwej osadu czynnego i monitorowania stanu wód gruntowych. Wiele z tych związków znalazło zastosowanie w naukach biologicznych i medycynie, a te nietoksyczne używane są także w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym [58].

3. Barwniki a środowisko

Barwniki syntetyczne dostając się do środowiska naturalnego w postaci ścieków przemysłowych stanowią poważne zagrożenie dla człowieka i innych organizmów żywych. Z uwagi na dużą skalę produkcji oraz nieskuteczność procesów technologicznych do środowiska może przedostawać nawet do 50% użytego barwnika, przy czym stężenie takiego związku w ścieku sięgać może nawet 300 mg/ml [41]. Obecność barwnika nadaje wodzie zabarwienie, a to skutkuje ograniczeniem fotosyntezy, prowadzi do eutrofizacji, zakłóca prawidłowy obieg pierwiastków biogennych oraz bezpośrednio lub pośrednio niekorzystnie oddziałuje na wszystkie poziomy łańcucha troficznego [31, 62]. Barwniki obniżają także efektywność oczyszczania ścieków metodami biologicznymi poprzez hamowanie wzrostu i aktywności enzymatycznej mikroorganizmów, a także ograniczenie bioróżnorodności drobnoustrojów wchodzących w skład kłaczek osadu czynnego i błony biologicznej złożeń zraszanych.

Toksyczne działanie barwników syntetycznych wynika z faktu, że wiele z tych związków to ksenobiotyki o złożonej strukturze, odznaczające się wysoką stabilnością oraz opornością na rozkład chemiczny, fotolityczny i biologiczny. Bardzo często ich obecność może wywołać u organizmów żywych efekt toksyczny, mutageny i/lub kancerogeny [78]. Przykładem jest zieleń malachitowa (barwnik z grupy trójfenylometanowych), dla której udowodnione szkodliwe działanie obejmuje m.in. uszkodzenie chromosomów, zaburzenie działania enzymów oddechowych oraz niekorzystny wpływ na funkcjonowanie wątroby, nerek czy układu rozrodczego [74]. Ponadto, jak wykazał Cha i wsp. [12] barwnik ten może również powodować powstawanie nowotworów.

Liczne doniesienia dotyczące szkodliwego działania barwników na środowisko naturalne doprowadziły do utworzenia stowarzyszenia ETAD (*Ecological and*

Toxicological Association of Dyes and Pigments Manufacturers) zajmującego się klasyfikacją barwników niebezpiecznych, sporządzaniem wytycznych ich użycia oraz popularyzacją wśród producentów danych o toksyczności barwników [61]. Spośród 4 000 barwników przetestowanych przez ETAD ponad 90% wykazywało wartość $LC_{50/24}$ większą niż 2×10^3 mg/kg masy ciała. Najbardziej toksyczne okazały się być związki z grupy zasadowych i dwuazowych barwników bezpośrednich.

4. Metody usuwania barwników syntetycznych ze ścieków

Duża różnorodność barwników stosowanych w przemyśle sprawia, że brak jest jednej, uniwersalnej metody usuwania tych związków ze ścieków i zanieczyszczonych akwenów wodnych [69, 79]. Wyróżnia się trzy podstawowe metody eliminacji barwników syntetycznych: fizyczne, chemiczne i biologiczne. Jednak najczęściej stosowane są technologie będące kombinacją wymienionych metod, a ich wybór zależy od czynników takich jak rodzaj oraz stężenie barwnika, skład chemiczny ścieku, obecność dodatkowych zanieczyszczeń czy planowane koszty procesu [38, 61].

4.1. Metody chemiczne i fizyczne

Fizyczne metody eliminacji barwników ze ścieków przemysłowych opierają się na zjawiskach takich jak: filtracja membranowa, flokulacja, sedymentacja czy adsorpcja. Ze względu na wysoką wydajność eliminacji związków zaliczanych do różnych klas oraz niskie koszty procesu jedną z najbardziej powszechnych metod dekoloryzacji jest adsorpcja [66, 79]. Polega ona na wiązaniu rozpuszczalnych bądź zawieszonych zanieczyszczeń przez stałą matrycę i przebiega na skutek oddziaływań elektrostatycznych, wymiany jonowej, działania sił van der Waalsa lub reakcji kompleksowania. Efektywność procesu może być z powodzeniem zwiększana po optymalizacji warunków takich jak: temperatura, pH, czas kontaktu czy rodzaj adsorbentu. Najbardziej popularnym sorbentem jest węgiel aktywowany, jednak ze względu na wysoki koszt jego użycia i regeneracji trwają badania m.in. nad wykorzystaniem w adsorpcji odpadów takich jak: torf, wióry drzewne, popioły lotne, makuch rzepakowy, pestki i skórki owoców, biomasa bakteryjna i grzybowa [8, 32, 34, 61]. Pomimo swej wysokiej skuteczności, adsorpcja barwników syntetycznych ze ścieków przemysłowych, posiada również pewne ograniczenia. Najpoważniejszą wadą jest fakt, że adsorpcja prowadzi wyłącznie do skoncentrowania cząsteczek barwnika na powierzchni sorbentu bez zmiany ich struktury chemicznej, a tym samym obniżenia toksyczności [73].

Ze względu na prostotę użycia, spośród chemicznych metod eliminacji barwników syntetycznych ze ścieków, na uwagę zasługują głównie reakcje utleniania. Czynnikiem utleniającym najczęściej jest nadtlenek wodoru, który ze względu na swoje właściwości wymaga uprzedniej aktywacji (jako aktywator nadtlenu wodoru używany jest zazwyczaj odczynnik Fentona). Reakcja Fentona pozwala prowadzić równolegle proces utleniania i koagulacji ścieków, co znacznie zwiększa efektywność oczyszczania. Jednak ze względu na powstawanie dużych ilości osadów, zawierających zatężone barwniki i żelazo w formie koloidu wodorotlenku żelazowego (III), użycie tej metody jest nieznaczne. Nadtlenek wodoru może być także aktywowany na drodze ozonowania. Poważnymi barierami ozonowania jest jednak krótki czas półtrwania ozonu w wodzie oraz koszty procesu. O wiele bardziej ekonomiczną i równie efektywną metodę eliminacji barwników (głównie azowych), stanowi utlenianie z użyciem chloru gazowego lub podchlorynu sodu, jednak uwalnianie toksycznych i kancerogennych związków sprawia, że metoda ta stosowana jest coraz rzadziej. Największą przewagą metod chemicznych nad fizycznymi jest fakt, że cząsteczki barwników przekształcane są do nietoksycznych pochodnych. Jednak ze względu na wysokie koszty procesu, ich użycie na skalę przemysłową jest mało opłacalne [61].

4.2. Biologiczne metody usuwania barwników

Wysokie koszty, niska efektywność procesu, powstawania toksycznych produktów ubocznych sprawiły, że podjęto próby usuwania barwników z wykorzystaniem procesów zachodzących przy udziale różnych grup organizmów żywych [9, 21]. Jedną z najbardziej obiecujących i intensywnie rozwijanych technologii jest bioremediacja wykorzystująca do oczyszczania środowiska głównie potencjał metaboliczny drobnoustro-

jów. Metody mikrobiologicznej eliminacji barwników opierają się na trzech głównych procesach: biosorpcji, bioakumulacji i biodegradacji lub kombinacji tych mechanizmów (rys. 1). Biosorpcja jest niezależnym do metabolizmu procesem wiązania zanieczyszczeń przez martwe lub żywe komórki mikroorganizmów. Bioakumulacja polega na pobieraniu polutanta do wnętrza żywej komórki i jego akumulacji w obrębie cytoplazmy. Biodegradacja z kolei obejmuje przekształcanie polutanta z wykorzystaniem zewnątrz- lub wewnątrzkomórkowych enzymów [19].

4.2.1. Biosorpcja

Biosorpcja jest selektywnym, wydajnym i uniwersalnym procesem, w którym cząsteczki barwników przyłączane są do powierzchni ściany komórkowej w sposób bierny, niezależny od metabolizmu. Za wiązanie cząsteczek barwników są odpowiedzialne grupy aminowe, tiolowe, karboksylowe i fosforowe obecne na powierzchni komórek bakteryjnych i grzybowych. Biosorpcja nie wymaga wysokich nakładów inwestycyjnych, bo materiał biologiczny wiążący barwniki syntetyczne jest często tani i może pochodzić z przemysłowej hodowli biomasy lub stanowić produkt odpadowy lub uboczny. Związane z sorbentem barwniki mogą być ponadto odzyskane na drodze desorpcji, a biosorbent po uprzedniej regeneracji wykorzystany w kolejnym cyklu usuwania zanieczyszczeń [38, 82]. Do biosorpcji różnych grup barwników wykorzystywane są liczne gatunki zarówno bakterii, grzybów jak i mikroskopowych glonów.

Jasińska i wsp. [33] wykorzystali martwą biomasę grzyba *Penicillium pinophilum* IM 6480 do wiązania zieleni malachitowej z roztworów wodnych. Już w 30 minucie procesu udało się uzyskać niemal całkowitą eliminację barwnika. Co więcej biomasa grzybowa efektywnie wiązała barwnik także z roztworów zawierających inne barwniki lub metale ciężkie.

Biosorpcja	Biodegradacja	Bioakumulacja
• Proces pasywny • Żywa lub martwa biomasa • Barwnik związany z powierzchnią komórki • Proces odwracalny • Substancje odżywcze nie są wymagane • Metoda szybka • Metoda niezależna od metabolizmu	• Proces aktywny • Żywa biomasa • Barwnik degradowany przez enzymy • Proces nieodwracalny • Substancje odżywcze są wymagane • Metoda wolna • Metoda zależna od metabolizmu	• Proces aktywny • Żywa biomasa • Barwnik związany z powierzchnią komórki • Proces częściowo odwracalny • Substancje odżywcze są wymagane • Metoda wolna • Metoda zależna od metabolizmu

Rys. 1. Porównanie mechanizmów mikrobiologicznej eliminacji barwników

Tabela I
Przykłady drożdży zdolnych do bioakumulacji barwników

Mikroorganizm	Barwnik (wg Colour Index)	Dekoloryzacja [%]	Źródło
<i>Candida utilis</i>	Remazol Turquoise Blue G 50 mg l ⁻¹	59,2	[28]
<i>Pichia fermentans</i>	Basic Violet 3 10 mg l ⁻¹	69,8	[17]
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Reactive Red 11 20 mg l ⁻¹	72,5	[65]
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Remazol Blue 50 mg l ⁻¹	96,0	[23]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Remazol Black B 400 mg l ⁻¹	62,0	[2]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Basic Yellow 2 40 mg l ⁻¹	93,0	[40]

Należy jednak pamiętać, że biosorpcja barwników nie rozwiązuje problemu obecności tych zanieczyszczeń w środowisku, ponieważ toksyczne związki nie są rozkładane, a tylko wiązane przy użyciu biosorbentu. Dlatego zastosowanie żywej biomasy, która wiąże barwniki wewnątrz komórek na drodze akumulacji, wydaje się być metodą korzystniejszą, niż biosorpcja. W przypadku żywej biomasy biosorpcja stanowi z reguły początkowy etap eliminacji barwnika. Mou i wsp. [50] zaobserwowali, że żywa biomasa *Myrothecium verrucaria* w ciągu pierwszych 10 godzin reakcji wiąże ponad 50% barwnika, który następnie ulega stopniowej biodegradacji. Przysaś i wsp. [55] wykazali, że eliminacja błękitu Evansa i zieleni brylantowej przebiega szybciej i z większą wydajnością w układach zawierających żywą biomasę grzybową lub bakteryjną. Co więcej obserwuje się wówczas istotny spadek toksyczności barwnika.

Naturalne właściwości sorpcyjne biomasy grzybowej lub bakteryjnej mogą być zwiększone poprzez modyfikacje chemiczne i/lub fizyczne ich powierzchni. Na przykład w badaniach z wykorzystaniem *Pseudomonas* sp. DY1 wykazano, że poddana obróbce termicznej biomasa wiąże barwnik azowy Acid Black 172 z wydajnością 150 razy większą, niż żywe, nie poddawane obróbce termicznej komórki [20]. Oprócz obróbki termicznej biosorbent można modyfikować poddając go liofilizacji, ucieraniu, a także traktując roztworami kwasów, zasad lub rozpuszczalników organicznych [4, 25].

4.2.2. Bioakumulacja

Bioakumulacja polega na wiązaniu barwnika do ściany komórkowej, a następnie jego akumulacji obrębie cytoplazmy [16, 84]. Jest to bardzo złożony, zależny od wielu czynników (takich jak skład podłoża, pH, temperatura i obecność innych zanieczyszczeń) proces [40]. W przeciwieństwie do biosorpcji, bioakumulacja nie wymaga oddzielania biomasy od podłoża wzrostowego, jej suszenia, przetwarzania i przechowywania. Jednak proces bioakumulacji wiąże się z pewnymi ograniczeniami np. konieczność zapewnienia odpowiedniego źródła węgla i azotu, hamowanie wzrostu drobnoustrojów w obecności wysokich stężeń barwnika i innych

toksycznych zanieczyszczeń zawartych w ściekach [84]. Najpowszechniej stosowaną do bioakumulacji toksycznych barwników grupą drobnoustrojów są drożdże. Ich przydatność wykazano m.in. w eliminacji barwników azowych, reaktywnych, czy trójfenylometanowych (Tab. I).

4.2.3. Biodegradacja

Biodegradacja to zależny od metabolizmu proces rozkładu cząsteczki barwnika do związków prostszych zachodzący przy udziale zewnątrz- i/lub wewnątrzkomórkowych enzymów. Proces ten prowadzi nie tylko do dekoloryzacji roztworów barwnych, ale także do przekształcenia barwników do związków prostszych, które zazwyczaj charakteryzują się niższą toksycznością, niż związki wyjściowe. W niektórych przypadkach, biodegradacja prowadzi do mineralizacji barwników czyli ich rozkładu do dwutlenku węgla, wody i/lub innych produktów nieorganicznych [57].

Najlepiej poznaną grupę drobnoustrojów zdolnych do dekoloryzacji barwników stanowią tzw. grzyby białej zgnilizny drewna m.in. szczepy z gatunku *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Funalia troglia*, *Phlebia tremellosa*, *Irpex lacteus*, *Dichomitus squalens* i *Pleurotus ostreatus* [11, 22, 26, 51, 52]. Jednak efektywną eliminację barwników opisano również u grzybów należących do *Ascomycota* i *Deuteromycota* takich jak *Rhizopus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Mucor* sp., *Fusarium* sp. [38, 86]. Ze względu na dynamiczny wzrost i łatwą adaptację do zmieniających się warunków środowiska, dekoloryzacja barwników z wykorzystaniem grzybów mikroskopowych jest procesem szybkim i wydajnym. Wiele spośród badanych szczepów to izolaty pochodzące ze środowisk skażonych [1, 47, 85].

W bioremediacji środowisk skażonych toksycznymi barwnikami wykorzystywane są także szczepy bakterii zdolne do transformacji i mineralizacji tych związków. Wysoką wydajność eliminacji barwników zaobserwowano w hodowlach bakterii z rodzaju *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Kurthia* sp., *Shewanella* sp., *Desulfovibrio* sp., *Staphylococcus* sp., *Alcaligenes* sp. Procesy odbarwiania ścieków przemysłowych prowadzone są także

Tabela II
Przykłady enzymów odpowiadających za eliminację barwników przez bakterie i grzyby

Gatunek	Barwnik (wg Colour Index)	Dekoloryzacja [%]	Enzymy zaangażowane w degradację	Źródło
<i>Alishewanella</i> sp.	Reactive blue 59 2,5 g l ⁻¹	95,0	Cyt P-450, AR, reduktaza NADH-DCIP	[43]
<i>Bacillus</i> sp.	Metanil Yellow 200 mg l ⁻¹	100,0	AR	[5]
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	Remazol red 50 mg l ⁻¹	100,0	reduktaza NADH-DCIP, VAO, AR	[45]
<i>Enterobacter</i> sp.	Reactive red 195 30 mg l ⁻¹	91,0	AR	[36]
<i>Fusarium solani</i>	Crystal violet 2,5 mg l ⁻¹	98,0	Lac	[1]
<i>Irpex lacteus</i>	Reactive black 5 200 mg l ⁻¹	98,4	MnP	[52]
<i>Kocuria rosea</i>	Malachite green 50 mg l ⁻¹	100,0	reduktaza ZM, reduktaza DCIP	[53]
<i>Lentinus polychrous</i>	Indigo carmine 20 mg l ⁻¹	97,6	Lac	[67]
<i>Myrothecium roridum</i>	Malachite green 10 mg l ⁻¹	97,0	Lac	[35]
<i>Penicillium ochrochloron</i>	Cotton blue 50 mg l ⁻¹	93,0	LiP	[70]
<i>Proteus vulgaris</i>	Scarlet R 150 mg l ⁻¹	100,0	reduktaza NADH-DCIP	[64]
<i>Trametes</i> sp.	Congo red 100 mg l ⁻¹	100,0	Lac	[83]

AR – azoreduktazy; Cyt P-450 – cytochrom P-450; Lac – lakaza; LiP – peroksydaza ligninowa; MnP – peroksydaza manganowa; reduktaza ZM – reduktaza zieleni malachitowej; VAO – oksydaza alkoholu weratrylowego

przy użyciu niektórych mieszanych kultur bakteryjnych [7, 13, 15, 59].

Zarówno u grzybów jak i bakterii głównym mechanizmem tych grzybów odpowiadającym za transformacje barwników są reakcje katalizowane przez enzymy utleniająco-redukujące, z których najszerzej opisywane są lakazy, peroksydazy i reduktazy [69].

Lakazy to enzymy katalizujące utlenianie szerokiego spektrum związków organicznych i nieorganicznych, któremu towarzyszy redukcja tlenu cząsteczkowego do wody. Podczas każdego cyklu katalitycznego lakazy dochodzi do redukcji 1 cząsteczki tlenu do 2 cząsteczek wody, czemu towarzyszy utlenienie 4 cząsteczek substratu do 4 rodników substratów [18, 44]. W procesach usuwania barwników syntetycznych zastosowanie znalazły głównie mechanizmy, w których lakaza współdziała z prostymi mediatorami chemicznymi takimi jak 2,2'-azino-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian), syryngaldazyna czy wanilina [6, 60]. Najbardziej podatne na przekształcanie przy udziale lakaz są barwniki antrachinonowe i trójfenylometanowe, a ich odbarwienie jest proporcjonalne do aktywności enzymu [71].

Drobnoustrojowe peroksydazy, takie jak peroksydaza ligninowa (LiP) czy peroksydaza manganozależna (MnP), charakteryzują się niską specyficznością, co umożliwia tym enzymom utlenianie całego spektrum ksenobiotyków, w tym toksycznych barwników syntetycznych [54, 70]. LiP katalizuje jednoelektronowe utlenianie związków fenolowych i niefenolowych, podczas gdy MnP przekształca Mn²⁺ do Mn³⁺, który zdolny jest do utleniania związków stanowiących pochodne fenolu [30]. Wykazano, że dekoloryzację barwników przy udziale peroksydaz wzmacnia obecność alkoholu weratrylowego jako mediatora reakcji. W reakcji takiej alko-

hol ulega utlenieniu przez pojedynczy elektron tworząc kation, który następnie utlenia związek barwny [3].

Barwniki syntetyczne mogą być także dekoloryzowane na drodze zależnych od obecności NADH/NADPH reakcji katalizowanych przez enzymy z grupy reduktaz [10, 32, 63]. Najszerzej zbadano dotąd związane z błoną komórkową azoreduktazy katalizujące rozszczepianie wiązania azowego [42]. Enzymy te w pierwszym etapie redukują substrat azowy do hydrazyny, która następnie zredukowana jest do 2 amin. Wrażliwe na obecność tlenu azoreduktazy po raz pierwszy zostały zidentyfikowane w hodowlach *Clostridium* i *Eubacterium* [56]. Drugą ważną grupę reduktaz dekoloryzujących barwniki stanowią reduktazy trójfenylometanowe. Produkcję tych enzymów stwierdzono u *Citrobacter* sp. KCTC 18061P, *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 2074, *Exiguobacterium* sp. MG2 i *Mucor mucedo* [32, 37, 49, 80]. Zestawienie enzymów biorących udział w dekoloryzacji barwników przedstawiono w Tabeli II.

Dane literaturowe wskazują, że w procesie dekoloryzacji barwników mogą brać udział nieenzymatyczne, niskocząsteczkowe związki np. rodniki hydroksylowe, wytwarzane przez grzyby białej i brązowej zgnilizny drewna na drodze reakcji Fentona [26, 27, 39, 48, 81].

4.3. Sposoby zwiększania wydajności procesu mikrobiologicznej dekoloryzacji barwników

Zdolność drobnoustrojów do rozkładu barwników syntetycznych wynika przede wszystkim z uzdolnień metabolicznych. Jednak dobierając odpowiednio warunki procesu można wielokrotnie podwyższyć wydajność dekoloryzacji. Duży wpływ na efektywność procesu mają czynniki takie jak: struktura i stężenie

barwnika, pH środowiska, temperatura, dostępność składników odżywczych i tlenu czy obecność innych zanieczyszczeń, w tym jonów metali ciężkich. Spośród dostępnych źródeł węgla glukoza najbardziej sprzyja dekoloryzacji barwników. Jednak ze względu na jej koszt coraz częściej wykorzystuje się tańsze źródła węgla np. skrobię czy melasę. Wykazano, że biodegradacji barwników sprzyja dodatek do podłoża wzrostowego organicznych źródeł azotu oraz tzw. induktorów chemicznych wzmagających aktywność enzymów ligninolitycznych [18].

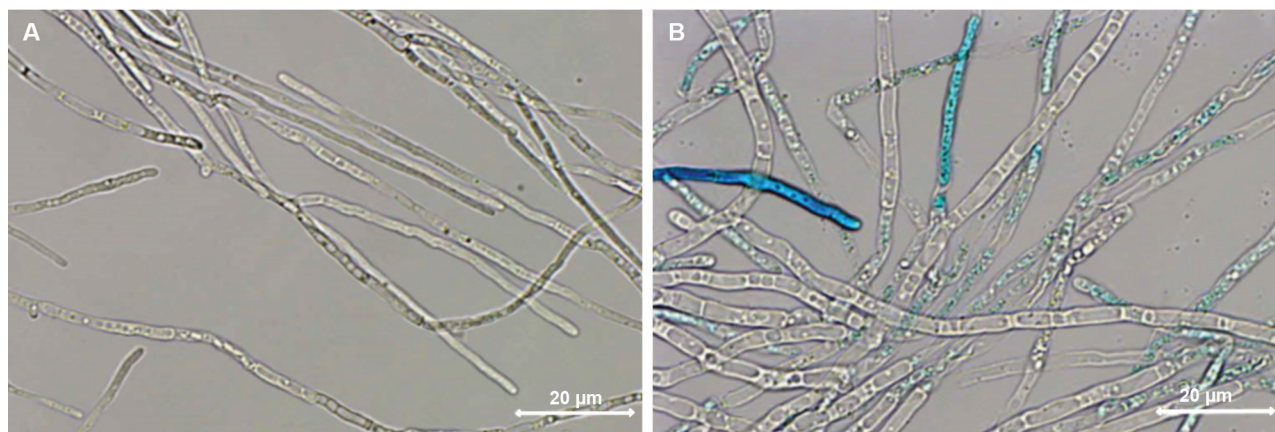
Bardzo często również w celu uzyskania efektywnej eliminacji barwników wybiera się te mikroorganizmy, które narażone były przez długi czas na działanie toksycznych zanieczyszczeń i dzięki temu wykształciły mechanizmy unieszkodliwiające te związki. Proces ten nazywany jest aklimatyzacją i najczęściej polega na nadekspresji genów kodujących enzymy umożliwiające biodegradację ksenobiotyków obecnych w środowisku wzrostu drobnoustroju. Tom-Sinoy i wsp. [77] z gleby pochodzącej z terenu zakładu barwiarskiego wyizolowali dwa szczepy *Pseudomonas* sp., które okazały się być niezwykle efektywne w eliminacji wielu barwników np. zieleni brylantowej, fioletu krystalicznego, fuksyny oraz zieleni malachitowej. Podobnie Thorat i Sayyad [76] w warunkach laboratoryjnych przeprowadzili aklimatyzację próbek gleby w rosnących stężeniach fioletu krystalicznego, co pozwoliło na izolację kilku szczepów bakteryjnych skuteczny w degradacji tego barwnika. Jednak rozwój genomiki i proteomiki przyczynił się do opracowania technik umożliwiających przyspieszenie tych naturalnie zachodzących procesów. Badania prowadzone w tym obszarze polegają głównie na zmianie, z wykorzystaniem metod inżynierii genetycznej, ekspresji, swoistości i powinowactwa enzymów bakteryjnych i grzybowych biorących udział w dekoloryzacji. Lu i wsp. [46] uzyskali ekspresję lakazy z *Pycnoporus sanguineus* w komórkach *Pichia pastoris*

i stwierdzili, że oczyszczony enzym z wysoką wydajnością dekoloryzuje fiolet krystaliczny. Jang i wsp. [32] po raz pierwszy przeprowadzili klonowanie genu reduktazy trójfenylometanowej pochodzącej z *Citrobacter* sp. Podobnie Chengalroyen i Dabbs [14] zidentyfikowali geny zaangażowane w biodegradację barwników trójfenylometanowych, które po wklonowaniu do komórek *Mycobacterium* sp. i *Rhodococcus* sp. nadawały im zdolność do odbarwiania fioletu krystalicznego.

4.4. Zaawansowane techniki analityczne wykorzystywane w badaniach nad dekoloryzacją barwników

Monitorowanie procesu dekoloryzacji barwnika polega na ilościowej ocenie ubytku substratu w hodowli oraz na jakościowej analizie metabolitów powstających podczas tego procesu. Stężenie barwnika może być oceniane poprzez pomiar całkowitego węgla organicznego (CWO), chemicznego zapotrzebowania na tlen (CHZT) lub pomiar absorpcji roztworu przy długości fali dla której barwnik wykazuje maksymalną absorpcję światła. Jednak metody te mogą być obciążone pewnym błędem np. z uwagi na obecność w roztworze dodatkowych zanieczyszczeń, niską selektywność itp. Dlatego obecnie w badaniach nad dekoloryzacją stosuje się bardziej specyficzne i zaawansowane techniki analityczne, które można podzielić na dwie kategorie: techniki separacyjne oraz spektroskopowe [24].

Techniki separacji, takie jak wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) oraz chromatografia gazowa i cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (GCMS, LCMS), a także metody spektroskopowe np. spektroskopia NMR lub spektroskopia fourierowska, pozwalają monitorować intermediały powstające w trakcie dekoloryzacji, a także identyfikować końcowe produkty biodegradacji. Do oceny ubytku barwnika najczęściej używa się spektroskopii UV-VIS [29].



Rys. 2. Akumulacja zieleni malachitowej wewnątrz komórek *Penicillium pinophilum* [35, zmodyfikowany]
A – hodowla prowadzona bez dodatku barwnika; B – hodowla w obecności zieleni malachitowej



Rys. 3. Testy wykorzystywane do oceny toksyczności barwników i ich pochodnych [72, zmodyfikowany]

W analizie procesów dekoloryzacji zachodzących przy udziale drobnoustrojów bardzo często oceniany jest również udział enzymów. Do tego celu wykorzystuje się liczne testy kolorymetryczne, w których specyficzne substraty są utleniane lub redukowane do barwnych pochodnych przez interesujące nas enzymy. Izolacja, oczyszczanie i identyfikacja białek biorących udział w dekoloryzacji barwników możliwa jest dzięki zaawansowanym technikom elektroforetycznym (1-D i 2-D PAGE), spektrometrycznym (MALDI – TOF, ESI) i bioinformatycznym (wykorzystującym oprogramowania do analizy peptydów i białek takie jak ProFound, MASCOT czy MS-Fit).

Przy ocenie udziału biosorpcji/bioakumulacji w procesie eliminacji barwnika nieodzowne wydają się być obserwacje mikroskopowe komórek. Dla przykładu na rysunku 2 przedstawiono obraz grzybni *P. pinophilum* hodowanej bez dodatku (rys. 2A) oraz w obecności (rys. 2B) zieleni malachitowej uzyskany przy pomocy mikroskopii konfokalnej i obrazujący wewnątrzkomórkową akumulację barwnika [35].

Końcowym etapem badań nad dekoloryzacją powinna być ocena toksyczności powstających podczas procesu produktów. W tym celu stosuje się liczne testy toksyczności wykorzystujące jako organizmy wskaźnikowe najczęściej bakterie, skorupiaki, rośliny, a także linie komórkowe (rys. 3).

5. Podsumowanie

Mikrobiologiczna eliminacja toksycznych barwników syntetycznych stanowi bardzo obiecujący sposób usuwania tych związków ze ścieków. Badania wskazują, że wiele gatunków bakterii, grzybów i mikroskopowych glonów zdolnych jest do usuwania tych substancji ze środowiska wzrostu. Także zastosowanie biosorpcji przy udziale odpadowej biomasy bakterii i grzybów stanowi dobrą alternatywę np. do adsorpcji na węglu aktywowanym. Szczególnie interesujące wydaje się być użycie preparatów opartych na drobnoustrojowych enzymach np. lakazach, peroksydazach, reduktazach. Aby to było możliwe konieczne jest poszukiwanie nowych szczepów efektywnie eliminujących barwniki ze środowiska wzro-

stu, wnikliwa ocena mechanizmów odpowiadających za dekoloryzację połączona z oceną toksyczności powstających produktów oraz izolacja i analiza enzymów biorących udział w procesie odbarwiania.

Podziękowania

Artykuł powstał w wyniku realizacji projektu finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki w Krakowie przyznanych na podstawie umowy nr UMO 2013/11/D/NZ9/02776.

Piśmiennictwo

1. Abedin R.M.A.: Decolorization and biodegradation of Crystal Violet and Malachite Green by *Fusarium solani* (martius) saccardo. A comparative study on biosorption of dyes by the dead fungal biomass. *American-Eurasian J. Bot.* **1**, 17–31 (2008)
2. Aksu Z.: Reactive dye bioaccumulation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Biochem.* **38**, 1437–1444 (2003)
3. Alam M.Z., Mansor M.F., Jalal K.C.A.: Optimization of lignin peroxidase production and stability by *Phanerochaete chrysosporium* using sewage-treatment-plant sludge as substrate in a stirred-tank bioreactor. *J. Ind. Microbiol.* **36**, 757–764 (2009)
4. Ambrósio S.T., Vilar Júnior J.C., da Silva C.A.A., Okada K., Nascimento A.E., Longo R.L., Campos-Takaki G.M.: A bio-sorption isotherm model for the removal of reactive azo dyes by inactivated mycelia of *Cunninghamella elegant* UCP542. *Molecules*, **17**, 452–462 (2012)
5. Anjaneya O., Souche S.Y., Santoshkumar M., Karegoudar T.B.: Decolorization of sulfonated azo dye Metanil Yellow by newly isolated bacterial strains: *Bacillus* sp. strain AK1 and *Lysinibacillus* sp. strain AK2. *J. Hazard. Mater.* **190**, 351–358 (2011)
6. Arora D.S., Sharma R.K.: Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Appl. Biochem. Biotech.* **160**, 1760–1788 (2010)
7. Ayed L., Chaieb K., Cheref A., Bakhrouf A.: Biodegradation and decolorization of triphenylmethane dyes by *Staphylococcus epidermidis*. *Desalination*, **260**, 137–146 (2010)
8. Bello O.S., Ahmad M.A., Siang T.T.: Utilization of cocoa pod husk for the removal of remazol black b reactive dye from aqueous solutions: Kinetic, equilibrium and thermodynamic studies. *Trends Appl. Sci. Res.* **6**, 794–812 (2011)
9. Bhatnagar A., Sillanpää M.: Utilization of agro-industrial and municipal waste materials as potential adsorbents for water treatment – A review. *Chem. Eng. J.* **157**, 277–296 (2010)
10. Bhosale S., Saratale G., Govindwar S.: Biotransformation enzymes in *Cunninghamella blakesleeana* (NCIM-687). *J. Basic. Microb.* **46**, 444–448 (2006)
11. Casas N., Parella T., Vicent T., Caminal G., Sarra M.: Metabolites from the biodegradation of triphenylmethane dyes by *Trametes versicolor* or laccase. *Chemosphere*, **75**, 1344–1349 (2009)

12. Cha Ch.-J., Doerge D.R., Cerniglia C.E.: Biotransformation of Malachite Green by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl. Environ. Microb.* **67**, 4358–4360 (2001)
13. Chen Ch.-Ch., Chen Ch.-Y., Cheng Ch.-Y., Teng P.-Y., Chung Y.-Ch.: Decolorization characteristics and mechanism of Victoria Blue R removal by *Acinetobacter calcoaceticus* YC210. *J. Hazard. Mater.* **196**, 166–172 (2011)
14. Chengalroyen M.D., Dabbs E.R.: Identification of genetic elements from *A. orientalis* contributing to triphenylmethane decolorization. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci* **2**, 41–56 (2013)
15. Cheriaa J., Khaireddine M., Rouabhia M., Bakhrouf A.: Removal of triphenylmethane dyes by bacterial consortium. *Sci. World J.* DOI: 10.1100/2012/512454 (2012)
16. Chojnacka K.: Biosorption and bioaccumulation – the prospects for practical applications. *Environ. Int.* **36**, 299–307 (2010)
17. Das D., Charumathi D., Das N.: Combined effects of sugarcane bagasse extract and synthetic dyes on the growth and bioaccumulation properties of *Pichia fermentans* MTCC 189. *J. Hazard. Mater.* **183**, 497–505 (2010)
18. Desai S.S., Nityanand C.: Microbial laccases and their applications: a review. *Asian J. Biotechnol.* **3**, 98–124 (2011)
19. Dos Santos A.B., Cervantes F.J., van Lier J.B.: Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresource Technol.* **98**, 2369–2385 (2007)
20. Du L.-N., Wang S., Li G., Wang B., Jia X.-M., Zhao Y.-H., Chen Y.-L.: Biodegradation of malachite green by *Pseudomonas* sp. strain DY1 under aerobic condition: characteristics, degradation products, enzyme analysis and phytotoxicity. *Ecotoxicology*, **20**, 438–446 (2011)
21. Dubey A., Mishra N., Deb A.: Isolation of dye degrading micro-organism. *E.J. Environ. Agricul.* **9**, 1534–1539 (2010)
22. Eichlerova I., Homolka L., Nerud F.: Synthetic dye decolorization capacity of white rot fungus *Dichomitus squaleus*. *Bioresource Technol.* **97**, 2153–2159 (2006)
23. Ertugrul S., San N.O., Donmez G.: Treatment of dye (Remazol Blue) and heavy metals using yeast cells with the purpose of managing polluted textile wastewaters. *Ecol. Eng.* **35**, 128–134 (2009)
24. Fernández C., Larrechi M.S., Callao M.P.: An analytical overview of processes for removing organic dyes from wastewater effluents. *Trend. Anal. Chem.* **10**, 1202–1211 (2010)
25. Fu Y., Viraraghavan T.: Fungal decolorization of dye wastewaters. A review. *Bioresource Technol.* **79**, 251–262 (2001)
26. Gomaa O.M., Linz J.E., Reddy C.A.: Decolorization of Victoria blue by the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 2349–2356 (2008)
27. Gomaa O.M.: Ethanol induced response in *Phanerochaete chrysosporium* and its role in the decolorization of triarylmethane dye. *Ann. Microbiol.* **62**, 1403–1409 (2012)
28. Gonen F., Aksu Z.: Single and binary dye and heavy metal bioaccumulation properties of *Candida tropicalis*: Use of response surface methodology (RSM) for the estimation of removal yields. *J. Hazard. Mater.* **172**, 1512–1519 (2009)
29. Gupta V.K., Khamparia S., Tyagi I., Jaspal D., Malviya A.: Decolorization of mixture of dyes: A critical review. *Glob. J. Env. Sci. Manag.* **1**, 71–94 (2015)
30. Husain Q.: Potential applications of the oxidoreductive enzymes in the decolorization and detoxification of textile and other synthetic dyes from polluted water: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* **26**, 201–221 (2006)
31. Imran M., Crowley D.E., Khalid A., Hussain S., Mumtaz M.W., Arshad M.: Microbial biotechnology for decolorization of textile wastewaters. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **14**, 73–92 (2015)
32. Jang M.S., Lee Y.M., Kim C.H., Lee J.H., Kang D.W., Kim S.-J., Lee Y.-Ch.: Triphenylmethane reductase from *Citrobacter* sp. strain KCTC 18061P: purification, characterization, gene cloning and overexpression of a functional protein in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microb.* **71**, 7955–7960 (2005)
33. Jasińska A., Bernat P., Paraszewicz K.: Malachite green removal from aqueous solution using the system rapeseed press cake and fungus *Myrothecium roridum*. *Desalin. Water Treat.* **1–9**, (2013)
34. Jasińska A., Paraszewicz K.: Charakterystyka procesu sorpcji zieleni malachitowej oraz jonów kadmu, cynku i ołowiu przez odpadowy makuch rzepakowy. *Ochr. Śr. Zasobów Nat.* **48**, 112–122 (2011)
35. Jasińska A., Różalska S., Bernat P., Paraszewicz K., Długoński J.: Malachite green decolorization by non-basidiomycete filamentous fungi of *Penicillium pinophilum* and *Myrothecium roridum*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **73**, 33–40 (2012)
36. Jirasripongpun K., Nasanit R., Niruntasook J., Chotikasatien B.: Decolorization and degradation of C. I. Reactive Red 195 by *Enterobacter* sp. Thammasat. *Int. J. Sci. Technol.* **12**, 6–11 (2007)
37. Kalyani D.C., Telke A.A., Surwase S.N., Jadhav S.B., Lee J.-K., Jadhav J.P.: Effectual decolorization and detoxification of triphenylmethane dye Malachite Green (MG) by *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 2074 and its enzyme system. *Clean Techn. Environ. Policy*, **14**, 989–1001 (2012)
38. Kandelbauer A., Guebitz G.M.: Bioremediation for the decolorization of textile dyes – a review (w) Environmental Chemistry, red. E. Lichtfouse, J. Schwarzbauer, D. Robert, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2004, s. 269–288
39. Karimi A., Aghbolaghy M., Khataee A., Bargh S.S.: Use of enzymatic bio-Fenton as a new approach in decolorization of Malachite Green. *Sci. World J.*, 691569, 1–5 (2012)
40. Kelewou H., Merzouki M., Hassani A.L.: Biosorption of textile dyes Basic Yellow 2 (BY2) and Basic Green 4 (BG4) by the live yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mater. Environ.* **5**, 633–640 (2014)
41. Khan R., Bhawana P., Fulekar M.H.: Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **12**, 75–97 (2013)
42. Kodam K.M., Kolekar Y.M.: Bacterial Degradation of Textile Dyes (w) Microbial Degradation of Synthetic dyes in Waste waters, Environmental Science and Engineering, red. S.N. Singh, Springer International Publishing, Switzerland, 2015, s. 243–266
43. Kolekar Y.M., Kodam K.M.: Decolorization of textile dyes by *Alishewanella* sp. KMK6. *Appl. Microbiol. Biot.* **95**, 521–529 (2012)
44. Kunamneni A., Ballesteros A., Plou F.J., Alcalde M.: Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications (w) Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, red. A. Mendez-Vilas, Formatex, Badajoz, 2007, s. 233–245
45. Kurade M.B., Waghmode T.R., Tamboli D.P., Govindwar S.P.: Differential catalytic action of *Brevibacillus laterosporus* on two dissimilar azo dyes Remazol red and Rubine GFL. *J. Basic Microb.* **53**, 136–146 (2013)
46. Lu L., Zhao M., Liang S.-C., Zhao L.-Y., Li D.-B., Zhang B.-B.: Production and synthetic dyes decolourization capacity of a recombinant laccase from *Pichia pastoris*. *J. Appl. Microbiol.* **107**, 1149–1156 (2009)
47. Mahmood S., Arshad A., Khalid A., Nazli Z.H., Mahmood T.: Isolation and screening of azodye decolorizing bacterial isolates from dye contaminated textile wastewater. *Soil Environ.* **30**, 7–12 (2011)
48. Moldes D., Fernández-Fernández M., Ángeles Sanromán M.: Role of laccase and low molecular weight metabolites from *Trametes versicolor* in dye decolorization. *Sci. World J.*, 398725, 1–9 (2012)

49. Moturi B., Singara Charya M.A.: Decolourisation of Crystal Violet and Malachite Green by fungi. *Sci. World J.* **4**, 28–33 (2009)
50. Mou D.G., Lim K.K., Shen H.P.: Microbial agents for decolorization of dye wastewater. *Biotechnol. Adv.* **9**, 613–622 (1991)
51. Novotný Č., Rawal B., Bhatt M., Patel M., Šásek V., Molitoris H.P.: Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. *J. Biotechnol.* **89**, 113–122 (2001)
52. Novotný Č., Svobodová K., Kasinath A., Erbanová P.: Biodegradation of synthetic dyes by *Irpex lacteus* under various growth conditions. *Int. Biodeterior. Biodegr.* **54**, 215–223 (2004)
53. Parshetti G., Kalme S., Saratale G., Govindwar S.: Biodegradation of Malachite green by *Kocuria rosea* MTCC 1532. *Acta Chim. Slov.* **53**, 492–498 (2006)
54. Parshetti G., Saratale G., Telke A., Govindwar S.: Biodegradation of hazardous triphenylmethane dye Methyl Violet by *Rhizobium radiobacter* (MTCC 8161). *J. Basic Microb.* **49**, 36–42 (2009)
55. Przysłaś W., Zabłocka-Godlewska E., Grabińska-Sota E.: Biological removal of azo and triphenylmethane dyes and toxicity of process by-products. *Water Air Soil Poll.* **223**, 1581–1592 (2012)
56. Rafii F., Franklin W., Cerniglia C.E.: Azoreductase activity of anaerobic bacteria isolated from human intestinal microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2146–2151 (1990)
57. Rai H.S., Bhattacharyya M.S., Singh J., Bansal T.K., Vats P., Banerjee U.C.: Removal of dyes from the effluent of textile and dyestuff manufacturing industry: A review of emerging techniques with reference to biological treatment. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* **35**, 219–238 (2005)
58. Rauf M.A., Ashraf S.S.: Survey of recent trends in biochemically assisted degradation of dyes. *Chem. Eng. J.* **209**, 520–530 (2012)
59. Ren S., Guo J., Zeng G., Sun G.: Decolorization of triphenylmethane, azo, and anthraquinone dyes by a newly isolated *Aeromonas hydrophila* strain. *Appl. Microbiol. Biot.* **72**, 1316–1321 (2006)
60. Riva S.: Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol.* **24**, 219–226 (2006)
61. Robinson T., McMullan G., Marchant R., Nigam P.: Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresour. Technol.* **77**, 247–255 (2001)
62. Rodríguez Couto S.R.: Dye removal by immobilised fungi. *Biotechnol. Adv.* **27**, 227–235 (2009)
63. Saratale G.D., Bhosale S.K., Kalme S.D., Govindwar S.P.: Biodegradation of Kerosene in *Aspergillus ochraceus* (NCIM 1146). *J. Basic Microb.* **47**, 400–405 (2007)
64. Saratale R.G., Saratale G.D., Kalyani D.C., Chang J.S., Govindwar S.P.: Enhanced decolorization and biodegradation of textile azo dye Scarlet R by using developed microbial consortium-GR. *Bioresour. Technol.* **100**, 2493–2500 (2009)
65. Saravanan P., Sivakumar P., Suganya T., Nagendra N.: Bioaccumulation of reactive Red 11 using live yeast *Rhodotorula glutinis*. *Indian J. Environ. Prot.* **32**, 249–255 (2012)
66. Sarayu K., Sandhya S.: Current technologies for biological treatment of textile wastewater – a review. *Appl. Biochem. Biotech.* **167**, 645–661 (2012)
67. Sarnthima R., Khammuang S., Svasti J.: Extracellular ligninolytic enzymes by *Lentinus polychrous* Lev. under solid-state fermentation of potential agro-industrial wastes and their effectiveness in decolorization of synthetic dyes. *Biotechnol. Bioproc Eng.* **14**, 513–522 (2009)
68. Sathiy M.P., Periyar S., Sasikalaveni A., Murugesan K., Kalai-chelvan P.T.: Decolorization of textile dyes and their effluents using white rot fungi. *Afr. J. Biotechnol.* **6**, 424–429 (2007)
69. Shah M.P. Microbe-Mediated Degradation of Synthetic Dyes in Wastewater. (w) Microbial Degradation of Synthetic dyes in Waste waters, Environmental Science and Engineering, red. S.N. Singh, Springer International Publishing, Switzerland, 2015, s. 205–241
70. Shedbalkar U., Dhanve R., Jadhav J.: Biodegradation of triphenylmethane dye cotton blue by *Penicillium ochrochloron* MTCC 517. *J. Hazard. Mater.* **157**, 472–479 (2008)
71. Singh H.: Fungal Decolorization and Degradation of Dyes (w) *Mycoremediation: Fungal Bioremediation*, red. H. Singh, John Wiley & Sons, NJ, USA, 2006, s. 420–483
72. Singh L., Singh V.P.: Textile Dyes Degradation: A Microbial Approach for Biodegradation of Pollutants (w) Microbial Degradation of Synthetic dyes in Waste waters, Environmental Science and Engineering, red. S.N. Singh, Springer International Publishing, Switzerland, 2015, s. 187–204
73. Srinivasan A., Viraraghavan T.: Decolorization of dye wastewaters by biosorbents: a review. *J. Environ. Manage.* **91**, 1915–1929 (2010)
74. Srivastava S., Sinha R., Roy D.: Toxicological effects of Malachite Green. *Aquat. Toxicol.* **66**, 319–329 (2004)
75. Sudha M., Saranya A., Selvakumar G., Sivakumar N.: Microbial degradation of Azo dyes: A review. *Int. J. Curr. Microbiol. Applied Sci.* **3**, 670–690 (2014)
76. Thorat P.R., Sayyad M.: Microbial decolourization and degradation of Crystal Violet by aerobic bacteria, *The Bioscan*, **5**, 591–594 (2010)
77. Tom-Sinoy E.S., Mohan D.A., Shaikh H.: Biodegradation of textile dyes by *Pseudomonas* species and *E. coli*. VSRD-TNTJ., **2**, 238–248 (2011)
78. Vaithanomsat P., Apiwatanapiwat W., Petchoy O., Chedchant J.: Decolorization of reactive dye by white-rot fungus *Datronia* sp. KAPI0039. *Kasetart J. (Nat. Sci.)* **44**, 879–890 (2010)
79. Verma A.K., Dash R.R., Bhunia P.: A review on chemical coagulation/flocculation technologies for removal of colour from textile wastewaters. *J. Environ. Manage.* **93**, 154–168 (2012)
80. Wang J., Gao F., Liu Z., Qiao M., Niu X., Zhang K.Q., Huang X.: Pathway and molecular mechanisms for Malachite Green biodegradation in *Exiguobacterium* sp. MG2. *PLoS ONE*, **7**, e51808 (2012)
81. Wang J., Qiao M., Wei K., Ding J., Liu Z., Zhang K.Q., Huang X.: Decolorizing activity of Malachite Green and its mechanisms involved in dye biodegradation by *Achromobacter xylosoxidans* MG1. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 220–227 (2011)
82. Won S.W., Kim H.-J., Choi S.-H., Chung B.-W., Kim K.-J., Yun Y.-S.: Performance, kinetics and equilibrium in biosorption of anionic dye Reactive Black 5 by the waste biomass of *Corynebacterium glutamicum* as a low-cost biosorbent. *Chem. Eng. J.* **121**, 37–43 (2006)
83. Yang X.Q., Zhao X.X., Liu C.Y., Zheng Y., Qian S.J.: Decolorization of azo, triphenylmethane and anthraquinone dyes by a newly isolated *Trametes* sp. SQ01 and its laccase. *Process Biochem.* **44**, 1185–1189 (2009)
84. Yilmazer P., Saracoğlu N.: Bioaccumulation and biosorption of copper(II) and chromium(III) from aqueous solutions by *Pichia stipitis* yeast. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **84**, 604–610 (2009)
85. Youssef A.S., El-Sherif M.F., El-Assar S.A.: Studies on the decolorization of Malachite Green by the local isolate *Acremonium kiliense*. *Biotechnology*, **7**, 213–223 (2008)
86. Youzhu F., Viraraghavan T.: Fungal decolourization of dye wastewaters: a review. *Bioresour. Technol.* **79**, 251–262 (2001)

Wiesław Kurzątkowski^{1*}, Anita Gębska-Kuczerowska²,
Katarzyna Oliwa-Dobieszewska², Anna Gaber², Marcin Kuczerowski³

¹Independent Laboratory of Streptomycetes and Fungi Imperfecti,
National Institute of Public Health-National Institute of Hygiene, Warsaw

²Department of Health Promotion and Postgraduate Education,
National Institute of Public Health-National Institute of Hygiene, Warsaw

³Medical University of Warsaw

Submitted on May, 2016

Accepted on July, 2016

1. Introduction. 2. The pathway of penicillin G biosynthesis. 3. Ultrastructural arrangements in penicillin G secretion by industrial strains. 4. "The assembly line – machinery" of penicillin G biosynthesis. 5. The ABC-transporters in penicillin G secretion. 6. Pexophagy and exocytosis in penicillin G secretion by high-yielding strains. 7. Strain improvement. 8. The future of β -lactams. 9. Conclusions

Wydalanie penicyliny G z przemysłowej grzybni *Penicillium Chrysogenum*

Streszczenie: W hodowlach przemysłowych penicylina G jest wydalana z komórek grzybni wysokowydajnych szczepów *Penicillium chrysogenum* w ilości 50–55 g w litrze podłoża. Efektywne wydalenie tak olbrzymiej ilości antybiotyku z komórek grzybni przemysłowej wymaga licznych dostosowań ultrastrukturalnych. Doniesienia literaturowe wskazują, że transportery ABC są całkowicie niewydajne w tym zakresie aktywności biosyntezy penicyliny G. Obecnie, inny mechanizm sekrecji antybiotyku z komórek grzybni szczepów przemysłowych powinien być brany pod uwagę, tj. proces egzocytozy. Ostatnie dwa enzymy na szlaku biosyntezy penicyliny G są zlokalizowane w peroksyzomach, gdzie antybiotyk jest gromadzony. Wyniki naszych wieloletnich badań wspierają hipotezę, że peksosofagia (selektywne pochłanianie i degradacja dużych peroksyzomów w wakuolach), a następnie egzocytoza, tj. pączkowanie wakuoli i tworzenie wakuolarnych zbiorników oraz fuzja tych zbiorników z błoną cytoplazmatyczną są procesami, które mogą uczestniczyć w transportowaniu penicyliny G z komórek przemysłowej grzybni do podłoża fermentacyjnego.

Abstract: In industrial cultures, the extracellular penicillin G is secreted by the overproducing strains of *Penicillium chrysogenum* in amounts of 50–55 g per liter of the liquid fermentation medium. Such an abundant amount of the produced antibiotic requires a specially adopted ultra-structural organization to secrete the antibiotic from the industrial mycelium, because the traditional ABC-transporters are not efficient enough. Thus, a novel secretory mechanism, i.e. the process of exocytosis, should be now also taken into account. The last step in penicillin G biosynthesis is located in peroxisomes, in which the final product is subsequently entrapped. The results of our long-term experiments support the hypothesis that vacuolar pexophagy (phagy of peroxisomes) combined with exocytosis, i.e. vacuolar budding resulting in the formation of numerous vacuolar vesicles followed by their fusion with the plasma membrane, might be directly involved in penicillin G secretion from the industrial mycelium of *P. chrysogenum*.

1. Wprowadzenie. 2. Szlak biosyntezy penicyliny G. 3. Strukturalna organizacja komórek przemysłowej grzybni podczas sekrecji penicyliny G. 4. „Taśma montażowa – maszynaria” biosyntezy penicyliny G. 5. Transportery ABC penicyliny G. 6. Peksofagia i egzocytoza w procesie sekrecji penicyliny G z przemysłowej grzybni. 7. Ulepszanie szczepów przemysłowych. 8. Przyszłość antybiotyków β -laktamowych. 9. Wnioski

Key words: exocytosis, *P. chrysogenum*, penicillin G, pexophagy

Słowa kluczowe: egzocytoza, *P. chrysogenum*, peksosofagia, penicylina G

1. Introduction

The last two enzymes in penicillin G biosynthesis, i.e. phenylacetyl-CoA ligase and acyl-CoA:6-aminopenicillanic acid acyltransferase are located in peroxisomes called also microbodies. Secretion of penicillin G from the interior of peroxisomes first across the peroxisomal membrane and then through the plasma membrane of the high-penicillin-yielding mycelial cells of *P. chrysogenum* is at present poorly understood [1, 19]. Actually, there are no known transporters involved in the large-scale secretion of penicillin G from the industrial mycelia [8, 16, 17].

This article is designed to overview details concerned with the hypothesis that pexophagy and exocy-

toxis might be immediately involved in the process of penicillin G secretion from the industrial mycelium of *P. chrysogenum* into the fermentation medium. Another goal was to discuss further ultra-structural organization of the industrial mycelium which is combined with the large-scale biosynthesis and secretion of penicillin G.

2. The pathway of penicillin G biosynthesis

β -Lactams have unusual chemical structures, like many other secondary metabolites [7]. All β -lactams are composed of a four-membered β -lactam ring closed by an amide bond. Penicillins contain a bicyclic penam nucleus formed by fused β -lactam and

* Autor korespondencyjny: Independent Laboratory of Streptomycetes and Fungi Imperfecti, National Institute of Public Health – National Institute of Hygiene, Chocimska 24, 00-791 Warsaw, Poland; phone: 22 54 21 228; e-mail: wkurzatkowski@pzh.gov.pl

thiazolidine rings and an acyl side-chain bound to the amino group at C-6. The biosynthesis of penicillin G starts by the condensation of activated precursor amino acids L- α -aminoadipic acid, L-cysteine and L-valine to δ -L- α -aminoadipyl-L-cysteinyl-D-valine (ACV) tri-peptide formed by the ACV synthetase – encoded by the *pcbAB* gene. This tri-peptide is converted to isopenicillin N (IPN) by the action of IPN synthase – encoded by the *pcbC* gene. In this ring closure reaction the bi-cyclic penam nucleus is formed consisting of β -lactam and thiazolidine rings. In the last step, the acyl-CoA:6-aminopenicillanic acid acyltransferase encoded by the *penDE* gene synthesizes penicillin G by substitution of the L- α -aminoadipyl side chain of IPN by the phenylacetyl side chain [7].

3. Ultrastructural arrangements in penicillin G secretion by industrial strains

At the highest activity of penicillin G secretion, the industrial hyphae of *P. chrysogenum* is composed of apical regions, growing sub-apical cells, sub-apical metabolically active non-growing vacuolated cells, and late-apical degenerating highly vacuolated cells. At the high activity of penicillin G secretion about 75% of the mycelial cells were characterized as vacuolated cells [7]. In the sub-apical non-growing cells the widely extending endoplasmic reticulum is frequently placed at the periphery of the cytoplasm and around the vacuoles transforming into numerous peroxisomes from 0.1 μ m up to 1.0 μ m in diameter which are characteristically accompanied by the rough endoplasmic reticulum and polyribosomes. The abundant pexophagy of mature peroxisomes and exocytosis are important features characterizing the non-growing mycelia cells of the high-yielding strains.

4. The “assembly line – the machinery” of penicillin G biosynthesis

Penicillin G biosynthesis and secretion by *P. chrysogenum* is a compartmentalized process. The enzymes of the penicillin biosynthetic pathway are located in different cellular compartments. For this reason, the precursors of penicillin G biosynthesis and the biologically active end-product have to cross one or more membranes. The final enzyme step in penicillin G biosynthesis is mediated by acyl-CoA:6-aminopenicillanic acid acyltransferase which is located in peroxisomes. At the high activity, the “machinery” of penicillin G overproduction build a strictly adjusted structurally arranged “assembly line” consisting of peroxisome entrapped phenylacetyl-CoA ligase and acyl-CoA:6-aminopenicillanic acyltransferase. These enzymes are close co-located with the IPN synthase which is mainly accu-

mulated in the cytosol between the peroxisome and the peroxisome surrounding polyribosomes that are abundantly accompanied by the endoplasmic reticulum [7]. The pH in the lumen of peroxisomes is around 7.5 and is in the same range as the cytosolic pH. It corresponds to the highest activity of all key enzymes of the penicillin biosynthetic pathway which are inactive at pH values below 6.0 [18]. These findings are in accordance with the active status of the cytosolic ACV synthetase in penicillin G biosynthesis [18]. The purified enzyme has a sharp pH optimum about 7.5 [15] corresponding with the cytosolic pH of approximately 7.0–7.5.

The productive mycelial cells of the high-yielding strain exhibit numerous mature peroxisomes frequently located at the periphery of the cytoplasm and around the vacuoles. Such an arrangement may increase the peroxisome accompanied IPN synthase supplying efficacy in penicillin biosynthesis from the medium and from the cytosol as well as from the vacuolar pool. These discoveries are consistent with the reported positive correlation between the number of mature peroxisomes and penicillin G biosynthesis [3, 4, 10, 11]. Two models of peroxisome development have been documented, the *de novo* synthesis from the endoplasmic reticulum and multiplication by fission of pre-existing organelles [2, 10, 12, 13].

5. The ABC-transporters in penicillin G secretion

At present, secretion of penicillin G from the mycelium of the industrial strains to the fermentation medium is only poorly understood [19]. Penicillin G is secreted from the industrial mycelium in very large quantities. Since the last two steps in penicillin G biosynthesis are located in peroxisomes the antibiotic has to be transported from the peroxisomes to the culture medium. In spite of significant effort that has been made to explain the role of the ABC transporters in penicillin G secretion by the high-yielding strains, the lack of clear involvement of any of these transporters may indicate that secretion of this antibiotic does not proceed through the classical ABC pump, although this might be the case in the wild-type strains [9]. Therefore, at present, new secretory pathways are considered for penicillin G secretion by the industrial strains that were absent or inefficient in the low-yielding wild-type strains.

6. Pexophagy and exocytosis in penicillin G secretion by high-yielding strains

Pexophagy was detected mainly in sub-apical non-growing productive vacuolated cells and in late-apical degenerating highly vacuolated cells of the mycelium of the high-penicillin-producing strain *P. chrysogenum* PQ-96 [7]. Inside of vacuolar invaginations

abundant pexophagy of large and middle size peroxisomes is a characteristic feature at the period of intensive penicillin G secretion (Fig. 1). A dominant feature of the productive and late-apical hyphal cells of the industrial strain is the high cellular vacuoliza-

tion and abundant budding of vacuoles, resulting in formation of numerous vacuolar vesicles of about 0.3 μm to 0.4 μm in diameter. The intensive vacuolar budding (Fig. 2) is characteristic during the period

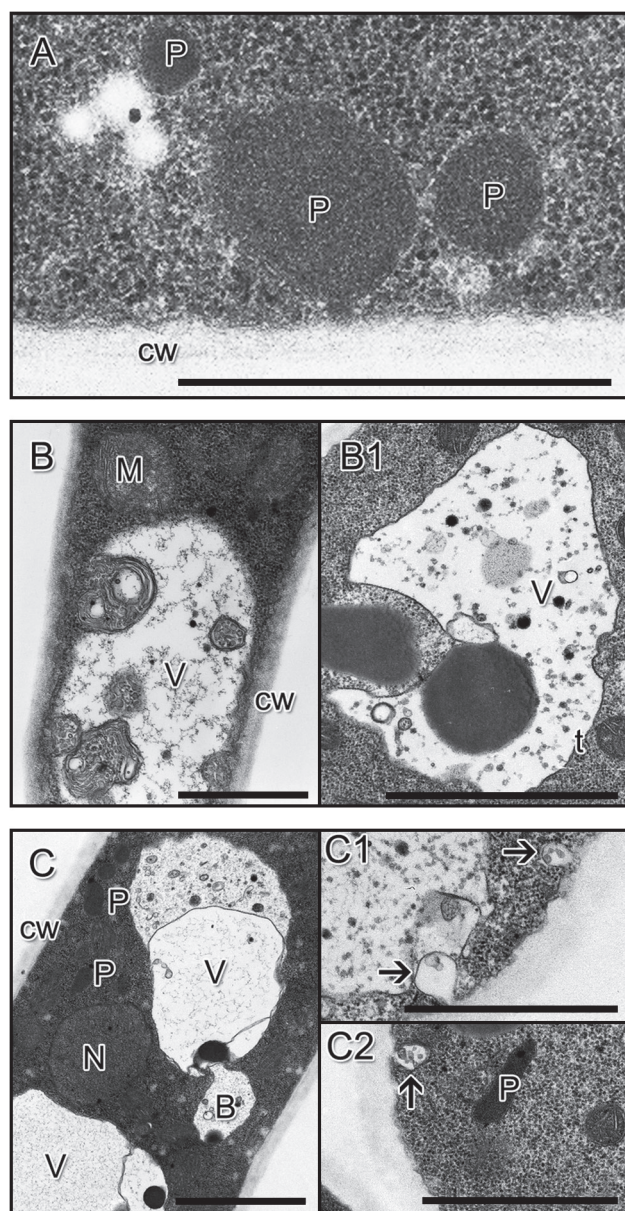


Fig. 1. *P. chrysogenum* PQ-96, 72 h culture, high-penicillin-producing strain, activity of penicillin G biosynthesis (U/ml): total yield at 72 h of cultivation – 8400, increase of yield between 48 h and 72 h of fermentation – 5800. (A) Penicillin G is produced in peroxisomes (P), which are frequently located in the peripheral cytoplasm. (B) Autophagy – vacuole (V) engulfed mitochondria (M) and (B1) abundant pexophagy are characteristic ultra-structural features of the vacuolated mycelial cells at the highest activity of penicillin G secretion from the mycelium into the fermentation medium. In the tonoplast (t) surrounded vacuole numerous organelle debris including the damaged peroxisomal matrix (black spots) can be observed. (C) At the cell wall (cw) located peroxisomes (P) and vacuole (V) engulfed peroxisomes are associated with the process of vacuolar budding (B). (C1 and C2) The exocytosis (fusion of vacuolar vesicles with plasma membrane – arrows) is shown. Scale bar = 1 μm .

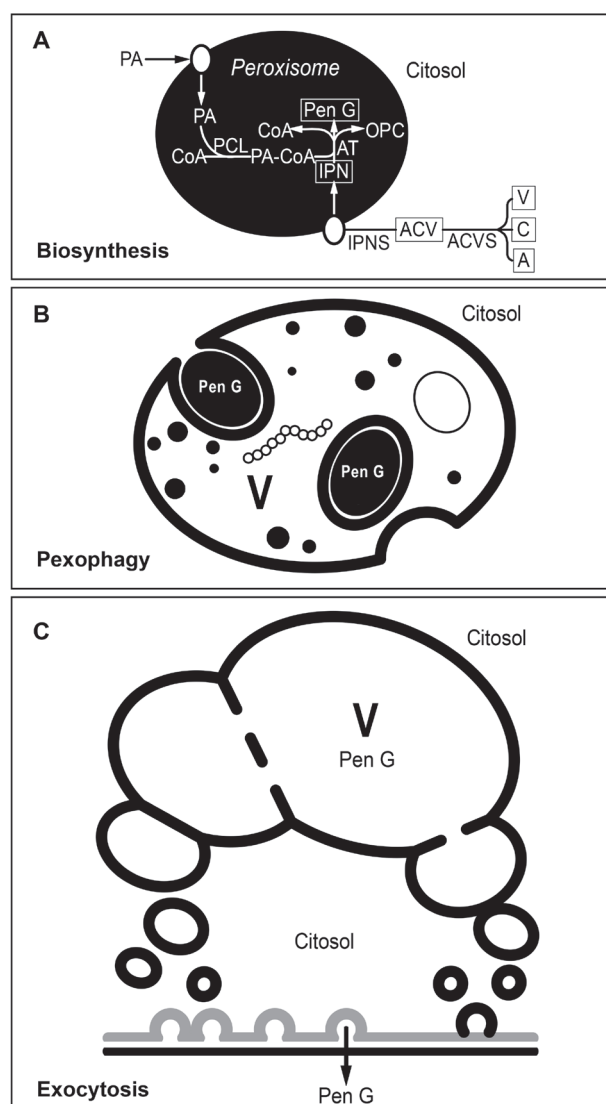


Fig. 2. A hypothetical overview of penicillin G secretion from the productive cells of the industrial mycelium of *P. chrysogenum* is depicted. (A) The process of penicillin G biosynthesis. The precursor amino acids L- α -aminoadipic acid (A), L-cysteine (C), L-valine (V) and the tri-peptide δ -L- α -aminoadipyl-L-cysteinyl-D-valine (ACV) as well as the ACV synthetase (ACVS) and isopenicillin N (IPN) synthase (IPNS) are located in the cytosol. The last two enzymes of penicillin G biosynthesis, i.e. phenylacetyl (PA)-CoA ligase (PCL) and acyl-CoA:6-aminopenicillanic acid acyltransferase (AT) are located in peroxisomes where isopenicillin N (IPN) is converted to penicillin G (Pen G). In this process the 6-oxopiperidine-2-carboxylic acid (OPC) is produced by the conversion of the substituted side chain. (B) In the abundant vacuolar pexophagy, penicillin G is transported to the interior of vacuoles. (C) Finally, penicillin G is secreted from the vacuoles into the fermentation medium in the process of exocytosis, i.e. abundant cellular vacuolization, vacuolar budding and fusion of vacuolar vesicles with the plasma membrane. In spite of numerous attempts, at present, alternative ABC transporters for large-scale secretion of penicillin G by the industrial mycelia of *P. chrysogenum* are not known.

of the highest activity of penicillin G secretion from the peroxisomes to the fermentation medium. At the time of penicillin secretion abundant fusion of vacuolar vesicles with the cytoplasm membrane was observed [6]. The vacuolar vesicles are characteristically packed with organelle debris. In the mature non-growing hyphal cells of the low-yielding strain *P. chrysogenum* Q-176 a lack of large peroxisomes could be observed [5].

We suggest that the abundant pexophagy of large peroxisomes as well as the vacuolar budding observed in the productive and late-apical cells of *P. chrysogenum* PQ-96 might be directly involved in large-scale secretion of penicillin G. In these cellular arrangements the penicillin G formed in peroxisomes might be transferred to vacuoles and late secreted out of the cells by an exocytosis process. A hypothetical overview of penicillin G secretion from the productive mycelial cells of *P. chrysogenum* PQ-96 is shown in Fig. 2. The vacuolar pH about 5–6 is suitable for the stability of penicillin G. Our discoveries are consistent with the reported positive correlation between the number of large peroxisomes and penicillin G secretion [3, 4, 10, 11], as well as between the extended vacuolization and antibiotic secretion [6]. At a late stage of the cultures, peroxisomes are known to be integrated into vacuoles by the pexophagy phenomenon [4, 14].

7. Strain improvement

Selected strains of *P. chrysogenum* have been used for more than 65 years for the industrial manufacture of penicillins. Classical strain improvement has yield industrial strains that produce high titers of penicillin G [19]. Large-scale penicillin G production is a result of industrial strain improvement, including numerous mutagenesis and selection [17]. These strains contain up to eight copies of the penicillin G biosynthetic gene clusters (*pcbAB* gene, *pcbC* gene and *penDE* gene). The phenylacetyl-CoA ligase encoded by *phl* gene is not a part of the penicillin G biosynthetic gene cluster [19].

8. The future of β -lactams

Penicillin G is the first compound that was used in medical treatment beginning the era of antibiotic therapy. β -Lactams have been used extensively for treatment of various bacterial infections for more than half a century. Over many decades, the always increasing resistance of bacteria to β -lactams was forcing as to modify the chemical structures of these antibiotics to obtain novel compounds which are not accepted by β -lactamases and widely accepted by DD-peptidases.

Inhibition of DD-peptidases is the mode of action of these antibiotics [5]. So far, we always modify the β -lactams to get efficient antimicrobial compounds, but as a response to our modifications the bacteria are doing exactly the same, modifying their mechanisms of resistance. Nevertheless, the search for novel β -lactams is at present the order of the day and should be mainly directed against the resistant DD-peptidases (not accepting the β -lactams) and the sensitive β -lactamases (accepting the β -lactams). At present, despite the widespread use over about sixty years the β -lactams are compounds with annual production volumes exciting 65,000 tons. The future of β -lactams must be protected by the correct medical application and novel strategies of treatment, e.g. the rotational use of β -lactams.

9. Conclusions

Our findings suggest that in penicillin G biosynthesis the structurally grouped organelles build the well-organized “machinery” composed of cytosol concentrated and membrane encompassed enzymes, substrates, intermediates, precursors, side- and end-products [7]. We have come also to the conclusions that in large-scale secretion of penicillin G the pexophagy phenomenon and the exocytosis should be currently considered as putative alternative for active secretion by the ABC transporters. Our ultra-structural findings [5, 6] provide evidence to support that pexophagy and exocytosis, i.e., vacuolar budding and fusion of vacuolar vesicles with the plasma membrane might be a major “machinery” of penicillin G secretion from the high-penicillin-producing cells of the industrial mycelium. We have also come to the conclusion that the sub-apical non-growing vacuolated cells are privileged in the biosynthesis and intensive secretion of Penicillin G. Moreover, the senescent mycelial cells are mainly involved in penicillin G secretion by the exocytosis process.

Acknowledgements

This work was supported by PTP No 90/95 grant from Polfa-Tarchomin Pharmaceutical Works in Warsaw, Poland and by the statutory activity No. 10/EM/6N of the National Institute of Public Health – National Institute of Hygiene, Warsaw.

References

1. Antonenkov V.D., Hiltunen J.K.: Transport of metabolites across the peroxisomal membrane. *Biochem. Biophys. Acta*, **1822**, 1374–1386 (2012)
2. Bartoszevska M., Opaliński Ł., Veenhuis M., van der Klei I.J.: The significance of peroxisomes in secondary metabolite biosynthesis in filamentous fungi. *Biotechnol. Let.* **33**, 1921–1931 (2011)

3. Kiel J.A., van den Berg M.A., Fusetti F., Poolman B., Bovenberg R.A., Veenhuis M., van der Klei I.J.: Matching the proteome to the genome: the microbody of penicillin-producing *Penicillium chrysogenum* cells. *Funct. Inter. Genomics*. **9**, 167–184 (2009)
4. Kiel J.A., van der Klei I.J., van den Berg M.A., Bovenberg R.A., Veenhuis M.: Overproduction of a single protein, Pe-Pex11p, results in 2-fold enhanced penicillin production by *Penicillium chrysogenum*. *Fungal Genet. Biol.* **42**, 165–164 (2005)
5. Kurzątkowski W., Gębska-Kuczerowska A.: Compartmentalization in cephalosporin C biosynthesis by industrial strains of *Acremonium chrysogenum*. *Post. Mikrobiol.* **54**, 375–379 (2015)
6. Kurzątkowski W., Gębska-Kuczerowska A.: Pexophagy in penicillin G secretion by *Penicillium chrysogenum* PQ-96. *In press* (2016).
7. Kurzątkowski W., Staniszevska M., Bondaryk M., Gębska-Kuczerowska A.: Penicillin G production by industrial strains of *Penicillium chrysogenum*. *Post. Mikrobiol.* **53**, 366–370 (2014)
8. Martin J-F., Ullán R.V., Garcia-Estrada C. Regulation and compartmentalization of β -lactam biosynthesis. *Microbiol. Biotechnol.* **3**, 285–299 (2010)
9. Martin J.F., Ullán R.V., Garcia-Estrada C. Role of peroxisomes in biosynthesis and secretion of β -lactams and other secondary metabolites. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 367–382 (2012)
10. Meijer W.H., Gidijala L., Fekken S., Kiel J.A.K.W., van den Berg M.A., Lascaris R., Bovenberg R.A.L., van der Klei I.J.: Peroxisomes are required for efficient penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 5702–5709 (2010)
11. Nagotu S., Veenhuis M., van der Klei I.J.: Divide et impera: The dictum of peroxisomes. *Traffic*, **11**, 175–184 (2010)
12. Nuttall J.M., Motley A., Hetteema E.H.: Peroxisome biosynthesis: recent advances. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **23**, 421–426 (2011)
13. Opaliński Ł., Bartoszevska M., Fekken S., Liu H., de Boer R., van der Klei I.J., Veenhuis M., Kiel J.A.K.W.: *De Novo* peroxisome biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* is not dependent on the Pex11 family members or Pex16. *PLoS ONE* **7**: e 35490, DOI:10.1371/journal.pone.0035490 (2012)
14. Sakai Y., Oku M., van der Klei I.J., Kiel J.A.K.W.: Pexophagy: autophagic degradation of peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1743**, 1767–1775 (2006)
15. Theilgaard H.B., Kristiansen K.N., Henriksen C.M., Nielsen J. Purification and characterization of δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase from *Penicillium chrysogenum*. *J. Biochem.* **327**, 185–191 (1997)
16. van den Berg, 2001, patent description number WO 2001/32904
17. van den Berg M.A., Bovenberg R.A., et al.: Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1161–1168 (2008)
18. van der Lende T.R., Breeuwer P., Abbe T., Konings W.N., Driessen A.J.M.: Assessment of the microbody luminal pH in the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Biochim. Biophys. Acta*. **1589**, 104–111 (2002)
19. Weber S.S., Bovenberg R.A., Driessen A.J.: Biosynthetic concepts for the production of β -lactam antibiotics in *Penicillium chrysogenum*. *J. Biotechnol.* **7**, 225–236 (2012)

SPIS TREŚCI

K. Adamczewski, J. Kowalik, A. Łobacz – <i>Listeria monocytogenes</i> – przeżywalność i metody eliminowania w produktach mleczarskich	337
K. Wolska, A. Górską, A. Adamiak – Właściwości przeciwbakteryjne propolisu	343
K. Stasiak, J. Rola, J.F. Żmudziński – Herpeswirus koni typ 1 – dobrze poznany, lecz ciągle stanowiący wyzwanie	351
P. Roszkowska, S. Giedrys-Kalemba, K. Galant, A. Pruss, I. Wojciechowska-Koszko – Rys historyczny oraz aktualna taksonomia pałeczek z rodzaju <i>Campylobacter</i>	361
J. Pawlicka-Kaczorowska, K. Czaczyk – Klasyczne bakterie propionowe – taksonomia, warunki hodowlane oraz zastosowanie	367
M. Michalak, K. Gustaw, A. Waśko, M. Polak-Berecka – Biosorpcja jonów kadmu przez struktury powierzchniowe bakterii z rodzaju <i>Lactobacillus</i>	381
H. Antolak, D. Kręgiel – Bakterie kwasu octowego <i>Asaia</i> sp. i ich unikalne zdolności adaptacyjne	392
B. Łabiszak, R. Koczura – Integrony bakterii Gram-dodatnich	398
A. Piński, K. Hupert-Kocurek – Genetyczne podłoże oddziaływań bakterii endofitycznych z roślinami	404
D. Wasilkowski, A. Mroziak – Rekultywacja gleb skażonych metalami ciężkimi metodą fitostabilizacji wspomaganej	413
A. Góralczyk, A. Jasińska, J. Długoński – Mikroorganizmy w usuwaniu toksycznych barwników przemysłowych	424
W. Kurzątkowski, A. Gębska-Kuczerowska, K. Oliwa-Dobieszewska, A. Gaber, M. Kuczerowski – Wydalanie penicyliny G z przemysłowej grzybni <i>Penicillium chrysogenum</i>	433

CONTENTS

K. Adamczewski, J. Kowalik, A. Łobacz – <i>Listeria monocytogenes</i> – survival and methods of its elimination from dairy products	337
K. Wolska, A. Górską, A. Adamiak – Antibacterial properties of propolis	343
K. Stasiak, J. Rola, J.F. Żmudziński – Equine Herpesvirus type 1 – well known, but still challenging	351
P. Roszkowska, S. Giedrys-Kalemba, K. Galant, A. Pruss, I. Wojciechowska-Koszko – The history and the current taxonomy of <i>Campylobacter</i> species	361
J. Pawlicka-Kaczorowska, K. Czaczyk – Dairy propionibacteria – taxonomy, culture conditions and application	367
M. Michalak, K. Gustaw, A. Waśko, M. Polak-Berecka – Biosorption of cadmium ions by cell surface structures of bacteria from <i>Lactobacillus</i> species	381
H. Antolak, D. Kręgiel – Acetic acid bacteria <i>Asaia</i> sp. and their unique adaptive abilities	392
B. Łabiszak, R. Koczura – Integrons in Gram-positive bacteria	398
A. Piński, K. Hupert-Kocurek – Genetic basis of endophytic bacteria-plant interactions	404
D. Wasilkowski, A. Mroziak – Recultivation of heavy metal-contaminated soils using aided phytostabilization	413
A. Góralczyk, A. Jasińska, J. Długoński – Microbial elimination of toxic industrial dyes	424
W. Kurzątkowski, A. Gębska-Kuczerowska, K. Oliwa-Dobieszewska, A. Gaber, M. Kuczerowski – Penicillin G secretion by industrial mycelia of <i>Penicillium chrysogenum</i>	433

