

Kwartalnik

**Tom 56**

**Zeszyt 1•2017**

STYCZEŃ – MARZEC

CODEN:

PMKMAV 56 (1)

2017

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

# Postępy Mikrobiologii

Advances in Microbiology

Index Copernicus ICV = 111,53 (2015)

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),  
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 800 egz., Objętość 20 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

## WSPOMNIENIE

### Prof. dr hab. Józef Wojciech Kur (1955–2016)

Józef Wojciech Kur urodził się 23 kwietnia w 1955 r. w Wejherowie. Tutaj ukończył Szkołę Podstawową nr 6 im. T. Kościuszki oraz I Liceum Ogólnokształcącego im. Jana III Sobieskiego. Jako laureat ogólnopolskiej olimpiady biologicznej podjął studia na Uniwersytecie Gdańskim na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi bez egzaminów wstępnych. W roku 1979 ukończył studia z wyróżnieniem i uzyskał tytuł magistra biologii z zakresu biochemii. Praca magisterska pt. „Enzymatyczna modyfikacja białek *Escherichia coli* produktami rozkładu NAD<sup>+</sup>” wykonana pod kierunkiem dr Romualda Skórko w Zakładzie Biochemii Uniwersytetu Gdańskiego, kierowanym wówczas przez prof. dr hab. Karola Taylora, rozpoczęła karierę młodego naukowca. Wyniki badań jego pracy magisterskiej zostały opublikowane w renomowanym czasopiśmie *European Journal of Biochemistry*. Wkrótce został zatrudniony w Zakładzie Mikrobiologii kierowanym przez prof. dr hab. Annę Podhajską na Wydziale Biologii, Geografii i Oceanologii Uniwersytetu Gdańskiego na stanowisku asystenta (1980–1988), a następnie adiunkta (1988–1991). Współpraca z Katedrą Biologii Molekularnej pozwoliła młodemu naukowcowi zdobyć nowe doświadczenia naukowe związane z replikacją DNA wirusów bakteryjnych i plazmidów. Stąd też wziął się temat pracy doktorskiej – „Wpływ mutacji *dnaA* *Escherichia coli* na replikację plazmidów pochodzących od bakteriofaga  $\lambda$ ”, którą wykonał pod kierunkiem prof. dr hab. Karola Taylora. Praca została wyróżniona Nagrodą Ministra, a wyniki opublikowane w *Journal of Molecular Biology*. Postawiona w rozprawie teza „niesprawiedliwego dziedziczenia” zainicjowała nową tematykę badawczą w wielu światowych zespołach eksperckich pracujących nad replikacją DNA. Po uzyskaniu stopnia doktora nauk przyrodniczych w dziedzinie biologii w roku 1987 Józef Kur wyjechał na dwuletni staż naukowy do jednego z największych ośrodków badań nad nowotworami, McArdle Laboratory for Cancer Research, University of Wisconsin, Madison w Stanach Zjednoczonych Ameryki, gdzie kierownikiem laboratorium i jednocześnie jego mentorem był znany w świecie nauki prof. Wacław Szybalski. Podróż ta zainicjowała wieloletnią przyjaźń pomiędzy znanym już naukowcem a młodym pasjonatem



biologii molekularnej i mikrobiologii, która wpłynęła na relacje między dwiema uczelniami tj. Politechniką Gdańską a University of Wisconsin oraz Polskim Towarzystwem Mikrobiologów.

Tematyka badawcza podjęta w laboratorium na Uniwersytecie w Wisconsin związana była z badaniem funkcji białka IHF (Integration Host Factor) *E. coli* w kontroli transkrypcji oraz jego wykorzystaniem w metodzie rzadkiego i precyzyjnego cięcia DNA, zwanego „Cięciem w Pięcie Achillesa” (Achilles’ Heel Cleavage). Bogaty dorobek publikacyjny i wysoka cytowalność prac w tej tematyce umożliwiły przygotowanie rozprawy habilitacyjnej zatytułowanej „Histonopodobne białko *Escherichia coli* IHF – właściwości i zastosowanie”. Stopień naukowy doktora habilitowanego nauk biologicznych w zakresie biologii molekularnej nadała Jemu w 1993 roku Rada Wydziału Biologii, Geografii i Oceanologii Uniwersytetu Gdańskiego. Jednakże już wcześniej, bo w roku 1991 w czasie krótkiego pobytu w Polsce przed kolejnym wyjazdem do Stanów Zjednoczonych, swoją przyszłość związał z Politechniką Gdańską. Wówczas to zaproponowano Profesorowi utworzenie nowej jednostki na Politechnice Gdańskiej – Zakładu Mikrobiologii. Zakład początkowo składał

się z trzech osób (kierownika, pracownika naukowo-dydaktycznego i technika laboratoryjnego), które zajęły się organizacją nowych laboratoriów naukowych i dydaktycznych. W 1998 roku Józef Kur uzyskał z rąk Prezydenta RP Aleksandra Kwaśniewskiego tytuł profesora nauk biologicznych i został najmłodszym profesorem Politechniki Gdańskiej. W roku 2001 został zatrudniony na stanowisku profesora zwyczajnego. W latach 2002–2012 pracował równolegle na stanowisku profesora nadzwyczajnego na Uniwersytecie Szczecińskim na Wydziale Biologii, tam też nawiązał bliskie przyjaźnie z pracownikami Uniwersytetu, między innymi z prof. Wiesławem Deptułą i jego żoną prof. Beatą Tokarz-Deptułą. Wielkim marzeniem Profesora było stworzenie dobrego zespołu, który będzie realizował tematykę w dziedzinie biotechnologii i biologii molekularnej. W 1995 roku Zakład został przekształcony w Katedrę Mikrobiologii, która w 2014 roku zmieniła nazwę na Katedrę Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii. W ciągu całej działalności Katedry kierowanej przez prof. dr hab. Józefa Kura pojawiali się nowi magistranci, następnie doktoranci oraz pracownicy ze stopniem doktora i doktora habilitowanego.

Tematyka naukowa, początkowo związana z białkiem IHF, rozszerzyła się o badania podstawowe i stosowane dotyczące zastosowania metod biologii molekularnej w medycynie i weterynarii, molekularnych mechanizmów patogenności uropatogennych szczepów bakteryjnych, produkcję i wykorzystanie białek organizmów ekstremofilnych w biotechnologii przemysłowej i medycznej, konstrukcji nowych fuzyjnych i chimerycznych polimeraz DNA o różnych właściwościach aplikacyjnych, biotechnologicznej produkcji antygenów rekombinowanych i konstrukcji nowych testów immunodiagnostycznych oraz szczepionek nowej generacji głównie przeciwko toksoplazmozie. Przeprowadzane były badania genetyczne leżące u podstaw oporności na antybiotyki, wirulencji, patogenezę, poruszany był również temat bakteriemii i sepsy o etiologii *E. coli* oraz prowadzono prace badawcze nad opracowaniem nowych metod genotypowania drobnoustrojów.

Jako jedna z pierwszych uczelni w Polsce, Katedra kierowana przez Profesora Kura, zaczęła stosować w swoich badaniach w latach 90. technikę PCR. Produkcja w Katedrze rekombinowanych termostabilnych polimeraz DNA dała możliwość szybkiego rozwoju różnych technik opartych o PCR. W 2002 roku Katedra otrzymała finansowanie z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w postaci grantu aparaturowego, co umożliwiło zakup nowoczesnego sprzętu, komór laminarnych do PCR i stworzenie infrastruktury laboratorium diagnostyki molekularnej. Zakres badań poszerzył się o nowe możliwości.

Tematyka badawcza z zakresu mikrobiologii udokumentowana licznymi wspólnymi publikacjami nauko-

wymi była wynikiem współpracy Katedry z Laboratorium Mikrobiologii Klinicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Kliniczne aspekty prowadzonych badań były wielokrotnie dyskutowane i konsultowane z ówczesnym kierownikiem laboratorium Dr Alfredem Sametem, a ze spotkań tych narodziła się wieloletnia, prawdziwa przyjaźń.

Natomiast temat dotyczący molekularnych mechanizmów patogenności szczepów UPEC *E. coli*, zaowocował współpracą z ekspertem w dziedzinie chorób infekcyjnych, ginekologii i położnictwa, prof. Bogdanem Nowickim z University of Texas Medical Branch (UTMB) w Galveston, USA.

Diagnostyka i immunoprofilaktyka toksoplazmozy stały się podstawą nawiązania współpracy z Profesorem Mirosławem Stankiewiczem z University of Lincoln w Nowej Zelandii, Profesorem Henryką Długońską z Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego oraz profesorem Ursulą Wiedermann z Medical University of Vienna w Austrii.

Tematyka badawcza związana z organizmami termofilnymi i psychrofilnymi to również duży rozdział w życiu Katedry. Badania nad enzymami zaadaptowanymi do zimna, tzw. psychrozymami, zostały zapoczątkowane w roku 2002 po nawiązaniu przez Profesora Kura współpracy z Profesorem Marianną Turkiewicz i Profesorem Stanisławem Bieleckim z Instytutu Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej. W wyniku tej współpracy powstał cykl publikacji poświęcony badaniom właściwości adaptowanych do zimna  $\beta$ -galaktozydaz i esteraz. Dalszy rozwój współpracy Katedry z Instytutem zaowocował także badaniami nad unikalnymi strukturami psychrozymów prowadzonymi przez dr hab. inż. Annę Bujacz wraz ze współpracownikami z zespołu Profesora Grzegorza Bujacza. Profesor Kur przyczynił się też do zainteresowania tą tematyką badań Profesora Wiesława Deptuły z Katedry Mikrobiologii Uniwersytetu Szczecińskiego. Owocem tej współpracy były badania nad adaptowanymi do zimna hydrolazami.

Najważniejsze osiągnięcia poznawcze zespołu naukowego stworzonego przez Profesora to opracowanie nowych metod genotypowania mikroorganizmów w badaniach epidemiologicznych; zdefiniowanie molekularnego mechanizmu biogenezy fimbrii uropatogennych szczepów *E. coli* oraz ich wykorzystanie do konstrukcji potencjalnych szczepionek (fimbrie chimeryczne z heterologicznymi epitopami pochodzenia bakteryjnego i wirusowego); opracowanie biotechnologicznej produkcji kilkudziesięciu różnych form rekombinowanych białek antygenowych pasożyta *Toxoplasma gondii* oraz ich wyselekcjonowanie do różnicowania fazy wczesnej i przewlekłej toksoplazmozy w serologicznych testach diagnostycznych; odkrycie nowej klasy białek SSB-podobnych, konstrukcja systemów ekspresyjnych,

oczyszczanie, charakterystyka oraz zastosowanie jako wzmacniaczy reakcji PCR; izolacja, charakterystyka i zastosowanie  $\beta$ -galaktozydaz z mikroorganizmów ekstremofilnych.

Opublikowany do końca października 2016 roku dorobek naukowy to 190 pozycji (165 oryginalnych opublikowanych prac twórczych, 25 artykułów monograficznych; 390 punktów IF, 25 indeks Hirscha). Profesor uczestniczył również w pisaniu podręczników i rozdziałów w podręcznikach. W ostatnim roku ukazał się rozdział w renomowanym wydawnictwie Springer International Publishing AG Switzerland na temat  $\beta$ -galaktozydaz izolowanych z zimmolubnych organizmów i ich znaczenia biotechnologicznego.

Profesor J. Kur dążył do nawiązania współpracy z różnymi jednostkami naukowymi i instytucjami, w czym widział możliwości rozwoju młodego zespołu. Silne więzi Politechniki Gdańskiej z Profesorem Waławem Szybalskim zainicjowały nazwaniem jednego z budynków Wydziału Chemicznego jego imieniem (ufundowanie tablicy pamiątkowej), a sam Profesor Kur został zaproszony do działalności w Fundacji Profesora Waławy Szybalskiego. To dzięki wsparciu Fundacji były sponsorowane nagrody dla młodych naukowców Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów oraz konferencje mikrobiologiczne. Profesor Szybalski, który lubi i potrafi rozmawiać z młodymi ludźmi, często przyjeżdżał do Polski i był goszczony w ówczesnej Katedrze Mikrobiologii. Profesor J. Kur jako jego uczeń również miał dobry kontakt z młodzieżą oraz ze swoimi współpracownikami. Wiedział, że dobry zespół naukowy to dobre relacje pomiędzy ludźmi i rozwój naukowy. Organizował wspólne pikniki i wypady w teren (grzybobranie, pikniki rybne, grillowanie), które skracają dystans pomiędzy kierownikiem a współpracownikami.

Popularyzowanie nauki i nawiązywanie naukowych kontaktów prowadził poprzez organizowanie ogólnopolskich konferencji naukowych pod nazwą *BioMillennium*, skupiających się wokół biotechnologii molekularnej i mikrobiologii, których 3 edycje odbyły się w Gdańsku w latach 2001–2009.

Józef Kur był wzorem profesora, potrafił połączyć naukę z dydaktyką. W trosce o odpowiedni poziom kształcenia, powstały przy jego współautorstwie i redakcji podręczniki i skrypty uczelniane: Podstawy Inżynierii Genetycznej (1994, 2014), Ćwiczenia z Mikrobiologii Ogólnej (1993; 2009), Podstawy Mikrobiologii Przemysłowej (2007), Diagnostyka Molekularna w Mikrobiologii (2008), Laboratory Exercises in Microbiology (2008), Biotechnologia molekularna (2009). Był też opiekunem prężnie działającego naukowego Koła Studentów Biotechnologii oraz licznej grupy studentów studiujących według Indywidualnego Toka Studiów.

Profesor Józef Kur cieszył się autorytetem zarówno w nauce krajowej jak i międzynarodowej. Był wielo-

krotnie nagradzany za osiągnięcia naukowe Nagrodami Rektora Uniwersytetu Gdańskiego i Rektora Politechniki Gdańskiej I stopnia. Został odznaczony Srebrnym i Złotym Krzyżem Zasługi, Medalem Komisji Edukacji Narodowej.

W trakcie pracy Prof. Kur służył swoją wiedzą i doświadczeniem różnym instytucjom i organizacjom naukowym w Polsce, np. jako członek Komitetu Mikrobiologii PAN (2003–2014), członek Komitetu Biotechnologii PAN (2003–2008), członek Interdyscyplinarnego Zespołu do Spraw Rozwoju Biogospodarki w Ministerstwie Nauki i Szkolnictwa Wyższego (1998–2008), członek Polskiej Platformy Biotechnologicznej, członek i przewodniczący Rady Naukowej Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdyni, członek Rady Naukowej Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi, Przewodniczący Oddziału Gdańskiego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Był także członkiem Zespołów Redakcyjnych takich czasopism jak: *Acta Biochimica Polonica Environmental Biotechnology*, *Postępy Mikrobiologii*, *Advances in Agricultural Sciences* czy *Polish Journal of Microbiology*.

Profesor J. Kur przez wiele lat organizował corocznie ogólnokrajowe kursy naukowe z zakresu diagnostyki molekularnej i inżynierii genetycznej. Był współautorem ramowego programu studiów kierunku Biotechnologia oraz autorem ramowego programu kierunku dyplomowania Biotechnologia Molekularna. Był członkiem Uniwersyteckiej Komisji Akredytacyjnej dla kierunku studiów Biologia. Wygłosił wiele wykładów na temat nowoczesnej diagnostyki molekularnej w medycynie na zaproszenie wielu uczelni i dużych szpitali.

Jego wielkie marzenie o założeniu własnej firmy biotechnologicznej spełniło się w roku 1994, kiedy powstała mała firma biotechnologiczna w Gdańsku o wymownej nazwie „DNA Gdańsk”. To właśnie w tej firmie powstają pierwsze polskie testy diagnostyczne oparte o PCR do wykrywania wirusów CMV, HBV, bakterii z rodzaju *Chlamydia*, *Anaplasma*, *Borrelia* czy prątków gruźlicy. Katedra Mikrobiologii i firma biotechnologiczna wspólnie podejmowały działania zmierzające do opracowania nowych produktów w zakresie diagnostyki molekularnej i biotechnologii. W roku 2008 powstała druga biotechnologiczna firma BLIRT, której Józef Kur był współzałożycielem i pomysłodawcą. Dwa lata później firma DNA Gdańsk została włączona w struktury prężnie rozwijającej się firmy Blirt z siedzibą w Gdańskim Parku Naukowo-Technologicznym imienia Profesora Hilarego Koprowskiego, a syn Krzysztof (dr nauk chemicznych w zakresie biotechnologii) „przejmując pałeczkę” od ojca i czuwa nad jej rozwojem. Uwaga Profesora skupiła się już nie tylko na nauce, ale również na firmie większych rozmiarów, której był współtwórcą, akcjonariuszem i przewodniczącym rady naukowej i nadzorczej. Teraz to już była prawdziwa biotechnologia.

Prywatnie Profesor był również zaangażowany w sport. Jego najważniejszym hobby było wędkarstwo, zarówno rekreacyjne jak i sportowe. Jak sam mówił, ten sport to jego „drugie życie”. To wędkarstwo zbliżyło go do Profesora Zbigniewa Religii, najśłynniejszego kardiochirurga, z którym wspólnie planowali wyjazdy na „duże ryby”.

Łowił między innymi dwumetrowe jesiotry w Missisipi, dorsze, czarniaki, halibuty podczas wielokrotnych wypraw na Morzu Norweskim, okonie, leszcze, szczupaki w kaszubskich jeziorach, pstrągi i lipienie w okolicznych rzekach, czy mureny i różnokolorowe ryby w Egipcie. Odnosił sukcesy w licznych okręgowych zawodach wędkarskich, brał także udział w spławikowych mistrzostwach Polski w Krakowie. Był lokalnym patriotą. Z pasją opowiadał o swoim rodzinnym Wejherowie, a także Gdańsku, gdzie spędził większość swojego życia zawodowego. Zgromadził obszerną kolekcję starych pocztówek z Wejherowa i okolic. Każdą wolną chwilę próbował spędzać na łonie natury, w ukochanym Lewinku, w okolicy którego znał najlepsze miejsca borowikowe i gdzie złowił najwięcej szczupaków, a także innych miejscach Pojezierza Kaszubskiego.

Kochał sport i emocje z nim związane. W liceum i na studiach grał na pozycji bramkarza w piłkę ręczną. Lubił grać w koszykówkę, siatkówkę, tenisa i brydża sportowego. W ostatnich latach jeździł na nartach biegowych i uprawiał Nordic Walking. Był też zagorzałym kibicem poczynań reprezentacji Polski w różnorodnych

dyscyplinach, jak i zmagani syna Mateusza w bilardzie i wnuka Jakuba w piłce nożnej.

Profesor Józef Kur zmarł niespodziewanie 27 października 2016 roku, odszedł pełen planów na przyszłość, z głową pełną nowych pomysłów naukowych, organizacyjnych i wdrożeniowych, zaangażowany i oddany sprawom swojej Katedry i firmy. Profesor Józef Kur był zawsze pomocny, życzliwy, otwarty na naukę i nowe wyzwania.

Śmierć Profesora wywołała wśród jego przyjaciół, współpracowników, doktorantów i studentów ogromny smutek i żal. Mieli jednak szczęście, że stanął na drodze ich życia, bo „zaraził” ich swoją pasją naukową i miłością do mikrobiologii i biotechnologii.

Profesor dr hab. Józef Kur zbudował od podstaw i rozwinął jedną z jednostek organizacyjnych Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej – Katedrę Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii. Wypromował 40 doktorów. Obecnie Katedra liczy ośmiu samodzielnych pracowników nauki, trzech doktorów, dwóch pracowników inżyniersko-technicznych oraz licznych słuchaczy Studium Doktoranckiego.

„Człowiek żyje tak długo jak długo trwa pamięć o nim” – Profesor Józef Kur na zawsze pozostanie w sercach i pamięci wielu ludzi a wiedza, którą przekazał trafi do następnych pokoleń młodych biotechnologów.

*Pracownicy Katedry Biotechnologii Molekularnej  
i Mikrobiologii*

1. Wstęp. 2. Naturalne i antropogeniczne źródła krezoli w środowisku. 3. Toksyczność krezoli. 4. Drobnoustroje uczestniczące w rozkładzie krezoli. 5. Tlenowy katabolizm krezoli. 6. Beztlenowy katabolizm krezoli. 7. Mikrobiologiczna degradacja krezoli w środowisku glebowym. 8. Podsumowanie

### Cresols and the microorganisms of the soil environment

**Abstract:** Phenolic compounds, including cresols, in the soil environment are a result of natural processes such as: biodegradation of lignins and tannins, and anthropogenic activity. Cresols are present in disinfectants as well as in the wastewater from chemical, petrochemical, pharmaceutical, paper and textile industry. They are also used in the production of insecticides, herbicides, medicines and antioxidants and have been classified as hazardous substances. Exposure of microorganisms to cresols can bring about changes in the structure of their cell membranes, resulting in their growth inhibition and cell lysis. However, there is still an untapped bioremediation potential in microorganisms, which are able to participate in the catabolism of cresols, both under aerobic and anaerobic conditions. The typical strategies of the aerobic degradation of cresols include the use of monooxygenase and dioxygenase enzymes. Thanks to these enzymes, atoms of molecular oxygen initiate fission of the aromatic ring structure. Under anaerobic conditions, the mechanisms of cresol decomposition currently focus on the addition of fumarate, hydroxylation or carboxylation. The effectiveness of microorganisms in the degradation of cresols is not only due to their occurrence in consortia. They are also effective as single strains. The only controversial aspect involves using genetically modified organisms (GMOs) or their genes in the bioaugmentation process. This is because they are strictly selected and target only specific substrates. Due to this, they do not compete with autochthonous microorganisms undergoing natural selection.

1. Introduction. 2. Natural and anthropogenic sources of cresols in the environment. 3. Toxicity of cresols. 4. The microorganisms participating in the distribution of cresols. 5. Aerobic catabolism of cresols. 6. Anaerobic catabolism of cresols. 7. Microbial degradation of cresols in the soil environment. 8. Summary

**Słowa kluczowe:** biodegradacja, gleba, katabolizm, krezole, mikroorganizmy

**Key words:** biodegradation, soil, catabolism, cresols, microorganisms

## 1. Wstęp

Krezol ( $C_7H_8O$ ) jest to organiczny związek chemiczny z grupy fenoli o masie cząsteczkowej 108,14 mg mol<sup>-1</sup>. Jest hydroksylową pochodną toluenu lub metylową pochodną fenolu. Występuje w postaci trzech izomerów strukturalnych różniących się nieznacznie strukturą chemiczną: 2-metylofenol (*o*-krezol), 3-metylofenol (*m*-krezol) i 4-metylofenol (*p*-krezol) [68, 94, 95]. Ich ogólną charakterystykę i wybrane właściwości fizykochemiczne podano w tabeli I.

## 2. Antropogeniczne i naturalne źródła krezoli w środowisku

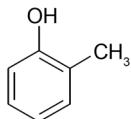
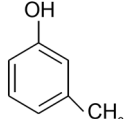
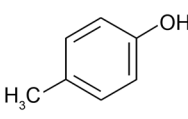
W środowisku naturalnym krezole, podobnie jak inne związki fenolowe powstają w procesie biodegradacji polimerów takich jak ligniny i taniny [45]. Są również składnikami barwników kwiatów i owoców. Wchodzą w skład wydzielin korzeniowych roślin, jako kwasy hydroksybenzoesowe (galusowy, protokatechowy, syringinowy i wanilinowy) oraz kwasy hydroksycynamonowe (*p*-kumarowy, ferulowy, kwas kofeinowy) [15, 93]. Wśród związków fenolowych

roślinnych wyróżnia się również alkohole cynamylowe (gwajakol, syringol, alkohol koniferylowy) i flawonoidy (katechiny i epikatechiny). Są one odpowiedzialne za pigmentację, wzrost i rozmnażanie roślin, a także odporność na patogeny i drapieżniki. Naturalnym źródłem prostych związków fenolowych, w tym krezoli, są warzywa, zboża, rośliny strączkowe, owoce, orzechy oraz produkty roślinne takie jak: wino, cydr, piwo, herbata i kakao [15]. Ich obecność w ekosystemach związana jest również ściśle z negatywnymi skutkami działalności antropogenicznej. Do 2005 r. Europa Zachodnia wiodła prym w wykorzystaniu *o*-krezolu. Przypuszcza się, że w środkach dezynfekujących, czyszczących i klejach wykorzystano rocznie 550 Mg tego ksenobiotyku [69]. Światowa produkcja *m*-krezolu wynosiła około 28.500 Mg, *p*-krezolu – 59.500 Mg, a mieszaniny tych dwóch izomerów – 128.000 Mg. Zdecydowana większość krezoli wykorzystywana jest w półproduktach, a bezpośrednio ich zastosowanie stanowi zaledwie około 1% produkcji światowej [68].

Spośród najstarszych metod otrzymywania krezoli na uwagę zasługuje kraking benzyny ciężkiej oraz destylacja frakcjonowana smoły węglowej będącej produktem suchej destylacji węgla kamiennego [60, 95]. *o*-krezol

\* Autor korespondencyjny: Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Plac Łódzki 3, 10-727 Olsztyn; tel. 89 5233589; e-mail: m.zaborowska@uwm.edu.pl

Tabela I  
 Ogólna charakterystyka i wybrane właściwości fizykochemiczne krezolu

Analizowane dane	<i>o</i> -krezol	<i>m</i> -krezol	<i>p</i> -krezol	Mieszanka <i>o</i> -, <i>m</i> -, <i>p</i> - krezolu
Wzór strukturalny				
Nazwa CAS	2-methylphenol	3-methylphenol	4-methylphenol	methylphenol
Numer CAS	95-48-7	108-39-4	106-44-5	1319-77-3
Synonimy	2-hydroksytoluen, kwas <i>o</i> -krezolowy	3-hydroksytoluen, kwas <i>m</i> -krezolowy	4-hydroksytoluen, kwas <i>p</i> -krezolowy	hydroksytoluen, kwas krezolowy
Temp. topnienia (°C)	30,94	12,22	34,74	11 ÷ 35
Temp. wrzenia (1013 hPa) (°C)	191	202,2	201,9	191 ÷ 203
Ciężar właściwy (w temp. 20°C)	1,0273 g cm <sup>-3</sup>	1,0336 g cm <sup>-3</sup>	1,0336 g cm <sup>-3</sup>	1,0336 g cm <sup>-3</sup>
Rozpuszczalność w wodzie	25,95 g dm <sup>-3</sup>	22,7 g dm <sup>-3</sup>	21,52 g dm <sup>-3</sup>	brak danych
Postać	białe kryształy	żółta lub bezbarwna ciecz	ciało stałe	Bezbarwna, żółta lub różowa ciecz

otrzymywany jest obecnie z 2,6-ksylenolu na drodze alkirowania metanolem fenolu w fazie gazowej, w obecności MgO jako katalizatora. Temperatura tego procesu waha się pomiędzy 673 a 773K [29]. Alkaliczna hydroлиза chlorotoluenu bądź rozszczepienie wodoronadtlenku cymenu skutkuje uzyskaniem mieszaniny krezoli o dużej zawartości *m*-krezolu. Z kolei *p*-krezol powstaje w procesie sulfonowania toluenu kwasem siarkowym, zgodnie z mechanizmem substytucji elektrofilowej [82]

Krezole są uwalniane ze ściekami z zakładów przemysłu chemicznego, petrochemicznego, farmaceutycznego, papierniczego i tekstylnego [4, 60]. W ściekach z procesu konwersji węgla w piecach koksowniczych 60% zanieczyszczeń stanowią fenole, a 30% krezole [101]. Z płynnymi odpadami z pirolizy węgla w 1 dm<sup>3</sup> wprowadzane jest do wód 10 g fenolu, katecholu, rezorcyny, ksylenu, pirogalolu oraz *o*-, *m*-, *p*-krezolu [27].

Metylofenole w pozycji *orto*-, *para*-, i *meta*- są stosowane powszechnie do syntezy leków, herbicydów, przeciwutleniaczy i barwników [82]. 4,6-dinitro-*o*-krezol (DNOC) posiada działanie owadobójcze, grzybobójcze i chwastobójcze. Do 2000 r. był on wykorzystany jako selektywny herbicyd w uprawie zbóż, chmielu, winorośli i owoców [26]. 4-chloro-*o*-krezol (PCPOC) jest materiałem wyjściowym dla ważnych selektywnych herbicydów. *p*-krezol w postaci 2,6-di-tetra-butyl-*p*-krezolu, znany jest jako butylowany hydroksytoluen (BHT) do wytwarzania żywic fenolowych, przeciwutleniaczy oraz inhibitorów polimeryzacji. Jest również stosowany do produkcji *p*-hydroksybenzoniuryli (*p*-HBN), ważnego związku stosowanego podczas zabiegów agrochemicznych [53], natomiast *o*-krezol do wytwarzania żywic epoksydowych, stosowanych jako materiał uszczelniający do układów scalonych (chipów) [21, 85]. Z *m*-krezolu jako surowca produkowane są pyretroidy,

insektycydy trzeciej generacji [83]. Olej krezotowy, produkt uboczny destylacji smoły węglowej zawiera 45% fenoli, w tym fenoli i krezoli [76].

### 3. Toksyczność krezoli

Ze względu na ich potencjalne skutki toksyczne, mutagenne, rakotwórcze i teratogenne, krezole sklasyfikowano jako priorytetowe substancje niebezpieczne [67]. Uwzględniając stopień szkodliwości można uszeregować je następująco: 4,6-dinitro-*o*-krezol > *p*-krezol > *o*-krezol > krezole [6]. Według Starka [94] krezole są substancjami toksycznymi i żrącymi. Wywierają negatywny wpływ na ośrodkowy układ nerwowy, układ oddechowy, skórę wątrobę oraz nerki. Co istotne, destabilizują rozrodzność w modelu wielopokoleniowym i są promotorami procesu nowotworowego. *p*-krezol został przypisany przez US Environmental Protection Agency (EPA) do zanieczyszczeń z Grupy C, skupiającej związki o możliwym działaniu rakotwórczym dla człowieka [1]. Niemniej jednak Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC) nie zakwalifikowała krezoli do puli związków kancerogennych [6]. Obwarowane prawnie są również dopuszczalne stężenia krezoli (mg kg<sup>-1</sup> s.m.) w glebie. W zależności od głębokości, wynoszą one odpowiednio: 0,1 mg (0–0,3 m), 0,5–20 mg (0,3–15 m), 3–40 mg (> 15 m). Dotyczy to gruntów zaliczonych do użytków rolnych, z wyłączeniem gruntów pod stawami i gruntów pod rowami, gruntów leśnych oraz zadrzewionych i zakrzewionych, nieużytków, a także gruntów zabudowanych i zurbanizowanych. W glebie z terenów przemysłowych, użytków kopalnych oraz terenów komunikacyjnych te wytyczne kształtują się następująco: 50 mg – (0–2 m), 3–100 mg (2–15 m) [24]. Z racji



tego, że głównym źródłem krezoli są ścieki z różnych gałęzi przemysłu również w nich należy monitorować zawartość fenoli. Indeks fenolowy dotyczący wszystkich ich rodzajów wprowadzanych do wód wynosi obecnie  $0,1 \text{ mg dm}^{-3}$  [23]. Szczególnym zagrożeniem dla wód są chlorowane pochodne fenolu – chlorometylofenole, stosowane szeroko w produkcji barwników, leków i środków ochrony roślin [3]. Z kolei wartość najwyższego dopuszczalnego stężenia krezoli – mieszaniny izomerów w powietrzu, w miejscu pracy wynosi  $22 \text{ mg m}^{-3}$  [22].

Toksyczność tej grupy fenoli jest związana z dwoma procesami: toksycznością nieokreśloną związaną z hydrofobowością pojedynczego związku i tworzeniem się wolnych rodników [61]. Na skutek działania peroksydaz i prostaglandyn tworzą się m.in. rodniki fenoksylowe wchodzące w interakcje z biocząsteczkami w komórce. Fenole wykorzystujące większą reaktywność prowokują peroksydację lipidów błony komórkowej. Z kolei te charakteryzujące się niższą reaktywnością są odpowiedzialne za uszkodzenia retikulum endoplazmatycznego, mitochondriów oraz jądra, a w nim enzymów i kwasów nukleinowych [33]. Bardziej efektywna penetracja błony komórkowej przez związki fenolowe jest również wynikiem spadku wartości pKa (gdzie Ka jest stałą dysocjacji związku) oraz wzrostu wartości logP (gdzie P jest współczynnikiem podziału danego związku w układzie oktanol – woda z kwasów niezdysocjowanych) i hydrofobowości tych ksenobiotyków [62]. Według Sikkema i wsp. [91] w przypadku drobnoustrojów istotne jest również aktualne stężenie tych związków w błonie cytoplazmatycznej i ich oddziaływanie z jej składnikami. Ekspozycja drobnoustrojów na działanie toksycznych związków aromatycznych, w tym krezoli, prowadzi do zmian właściwości błony komórkowej, jej struktury, a przede wszystkim składu fosfolipidowych kwasów tłuszczowych (PLFAs) [47], identyfikowanych w błonie jako acylowe składniki fosfolipidów, glikolipidów i glikofosfolipidów [40]. Dzięki dużemu powinowactwu tych ksenobiotyków do błony komórkowej następuje ograniczenie interakcji między łańcuchami kwasów tłuszczowych, czego skutkiem jest zahamowanie oddychania i wzrostu drobnoustrojów. Najmniej oczekiwanym następstwem może być także liza komórek [20, 35]. Toksyczność metylofenoli obrazuje wartość  $EC_{50}$  dla *Pseudomonas putida* w odniesieniu do *m*-krezolu, która po 16 h ekspozycji wynosiła  $53 \text{ mg dm}^{-3}$  [68].

#### 4. Drobnoustroje uczestniczące w rozkładzie krezoli

Drobnoustroje indukujące rozkład krezoli są szeroko rozpowszechnione w środowisku (Tab. II, III, IV) [52]. Wykorzystanie bogactwa potencjału bioremediacyjnego mikroorganizmów w integracji z podstawami genetyki, uwzględniającymi wysoką przepustowość na poziomie genomu, daje nadzieję na powstanie nowych

metod biotechnologicznych. Geny kodujące enzymy odpowiedzialne za katabolizm krezoli ewaluowały wśród wielu szczepów bakteryjnych w wyniku zanieczyszczenia środowiska tymi ksenobiotykami. Informacja genetyczna o syntezie enzymów zaangażowanych w rozkład pierścienia aromatycznego może być zlokalizowana w chromosomach bakteryjnych oraz w plazmidach degradacyjnych. Procedura sekwencjonowania genomów bakteryjnych dostarcza ogromniej ilości danych na temat działania genów. Na szczególną uwagę

Tabela II  
Drobnoustroje tlenowe uczestniczące w rozkładzie krezoli

Drobnoustroje tlenowe	Piśmiennictwo
1. <i>Comanonas testosteroni</i> E23	[106]
2. <i>Pseudomonas putida</i> F1-Te	[89]
3. <i>Pseudomonas putida</i> DOT-T1-Km	[38, 100]
4. <i>Pseudomonas putida</i> NCIMB9869	[49]
5. <i>Pseudomonas</i> sp. B13	[38, 100]
6. <i>Pseudomonas</i> sp. CF600	[38, 100]
7. <i>Rhodococcus erythropolis</i> UVP-1	[81]
8. <i>Rhodococcus erythropolis</i> M1	[28]
9. <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> NCIMB 8250	[65, 102]
10. <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> NCIMB 9867	[49, 102]
11. <i>Cupriavidus necator</i> JMP134	[71]
12. <i>Citrobacter farmeri</i> SC01	[77]
13. <i>Ewingella americana</i>	[48]
14. <i>Serratia plymuthica</i> GC	[74]
15. <i>Burkholderia</i> sp.	[65]
16. <i>Ralstonia</i> sp.	[65]
17. <i>Pseudomonas stutzeri</i> 0X1	[16]
18. <i>Pseudomonas</i> sp. HH35	[87]
19. <i>Sphingomonas xenophaga</i> BN6	[78]
20. <i>Pseudomonas mendocina</i> PC1	[34]
21. <i>Pseudomonas fluorescens</i> P1, PC18, PC20	[34]
22. <i>Pseudomonas mendocina</i> KR1	[105]

Tabela III  
Grzyby uczestniczące w rozkładzie krezoli

Grzyby	Piśmiennictwo
1. <i>Candida tropicalis</i>	[43]
2. <i>Trichosporon montevidense</i> PHE1	[39]
3. <i>Trichosporon cutaneum</i> R57	[2]
4. <i>Aspergillus</i> sp.	[5]
5. <i>Cladosporium</i> sp.	[5]
6. <i>Fusarium</i> sp.	[5]
7. <i>Monicillium</i> sp.	[5]
8. <i>Trichoderma</i> sp.	[5]
9. <i>Penicillium</i> sp.	[5]
10. <i>Pleurotus</i> sp.	[5]
11. <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	[5, 45, 94]

Tabela IV  
Drobnoustroje beztlenowe uczestniczące w rozkładzie krezoli

Drobnoustroje beztlenowe	Piśmiennictwo
1. <i>Desulfobacterium phenolicum</i>	[7]
2. <i>Desulfobacterium cetonicum</i>	[64]
3. <i>Magnetospirillum</i> sp.	[86, 90]
4. <i>Thauera aromatica</i>	[86, 90]
5. <i>Azoarcus buckelli</i>	[86, 90]
6. <i>Desulfosarcina cetonica</i> DSM 7267	[58]
7. <i>Geobacter metallireducens</i>	[58]
8. <i>Desulfobacula toluolica</i>	[75]
9. <i>Paracoccus</i> sp.	[80]

Tabela V  
Drobnoustroje uczestniczące w beztlenowym rozkładzie benzoilo-CoA z wykorzystaniem *p*-krezolu jako substratu

Mikroorganizm	Akceptor elektronów	Piśmiennictwo
1. <i>Aromatoleum aromaticum</i>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	[104]
2. <i>Desulfobacula toluolica</i> Tol2	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	[103]
3. <i>Geobacter metallireducens</i>	Fe <sup>3+</sup>	[108]
4. <i>Magnetospirillum</i> TS-6	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	[90]

zasługuje grupa bakterii modyfikowanych genetycznie (GMMs), wyizolowanych z wykorzystaniem metod inżynierii genetycznej. Należą do niej m.in.: *Comamonas testosteroni* E23, *Pseudomonas putida* F1-Te, *Pseudomonas putida* DOT-T1-Km, *Pseudomonas* sp. B13, czy *Pseudomonas* sp. CF600 [38, 89, 100, 106].

W szczepie *Rhodococcus erythropolis* UVP-1 Saa i wsp. [81] zidentyfikowali dwa białka, kodowane przez dwa geny pheA1 (542 aminokwasy) i pheA2 (189 aminokwasów), o wysokiej homologii do dwuskładnikowej hydroksylazy fenolowej inicjującej m.in. biodegradację krezoli. Podobnie *Acinetobacter calcoaceticus* NCIMB 8250 oraz *Pseudomonas pseudoalcaligenes* NCIMB 9867 są w stanie katalizować tlenową hydroksylację *p*-krezolu, w którym ostatecznym akceptorem elektronów jest tlen [102]. Niektóre drobnoustroje posiadają zestaw genów kodujących enzymy uczestniczące w degradacji różnych pochodnych fenolu w obrębie jednej komórki [67]. I tu przykładem jest *Cupriavidus necator* JMP134 (były *Alcaligenes eutrophus*). Jest to szczep wyróżniający się wysoką liczbą genów biorących udział w rozkładzie fenolu i jego pochodnych, w tym 2-, 3-, i 4-metylofenolu. Geny kodujące enzymy oraz białka regulacyjne uczestniczące w katabolizmie krezoli umieszczone są zarówno w plazmidach jak i w chromosomach [71].

Do listy mikroorganizmów istotnych w biodegradacji krezoli należy dopisać także drożdże *Candida tropicalis* [43], *Trichosporon montevidense* PHE1 [39], *Trichosporon cutaneum* R57 [2] oraz grzyby z rodzaju: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Monicillium*, *Tri-*

*choderma*, *Penicillium*, *Pleurotus*, *Phanerochaete* [5]. Za utlenianie roślinnych związków fenolowych przez grzyby odpowiedzialne są oksydoreduktazy, do których należą m.in. metaloenzymy – lakkazy (EC 1.10.32), zewnątrzkomórkowe peroksydazy (VPS) zawierające hem (EC 1.11.1), LiP – ligninazy I (EC 1.11.1.14) oraz tanazy produkowane przez *Aspergillus* i *Penicillium* tolerujące nawet do 20% tanin [66, 59].

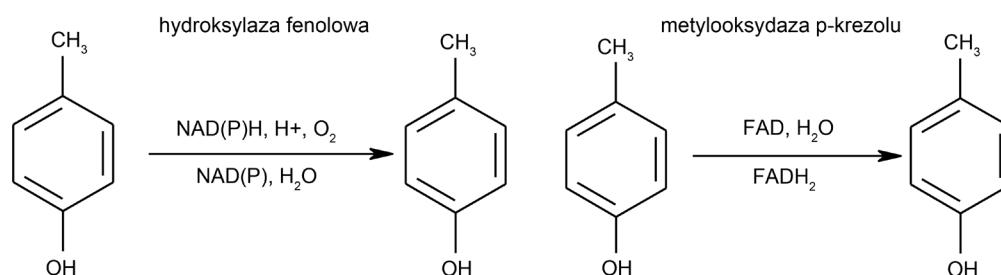
Przeważającą większość wśród izolatów pozyskanych ze środowisk zanieczyszczonych krezolami stanowią jednak gatunki z rodzaju *Pseudomonas* [80]. Potwierdzają to również Jain i wsp. [42], którzy przeanalizowali różne szlaki metaboliczne *m*-krezolu z udziałem *Pseudomonas putida* NCIMB9869 z 3,5-ksylenolem oraz *m*-krezolem jako źródłem energii. Tschek i Fuchs [96] także zidentyfikowali bakterie z rodzaju *Pseudomonas* wśród analizowanych izolatów. Katabolizm krezolu przebiegał w obecności azotanów (V), jako końcowego akceptora elektronów. Skuteczny w biodegradacji *m*-krezolu okazał się także *Citrobacter farmeri* SC01 wyizolowany w warunkach tlenowych w zlewni oczyszczalni ścieków koksowniczych [77]. Dobrze poznanymi pod względem biochemicznym i genetycznym są również szczepy *Ewingella americana* i *Serratia plymuthica* GC [48, 74].

Drobnoustroje wykazują także potencjał degradacyjny w środowisku beztlenowym. Zdolność do rozkładu fenoli i ich pochodnych w warunkach pozbawionych tlenu wykazano u drobnoustroju redukującego siarczany – *Desulfobacterium phenolicum* [7] oraz *Desulfobacterium cetonicum* [64]. Według badań Shinoda i wsp. [90] i Schmeling'a i wsp. [86] istotną rolę w tym procesie odgrywają bakterie denitryfikacyjne *Magnetospirillum* sp. oraz *Thauera aromatica* i *Azoarcus buckelli*, dla którego ostatecznym akceptorem elektronów są azotany (V). Beztlenową karboksylację *m*- i *p*-krezolu jest w stanie indukować również *Desulfosarcina cetonica* DSM 7267. Przyjmującymi parę elektronów stają się wówczas siarczany. W pulę drobnoustrojów posiadających zdolności biodegradacyjne metylofenoli wpisuje się także *Geobacter metallireducens* przeprowadzający proces utlenienia *p*-krezolu redukując Fe<sup>3+</sup> do Fe<sup>2+</sup> [58]. Ponadto izomer ten jest wykorzystywany jako źródło energii przez *Desulfobacula toluolica* [75].

## 5. Tlenowy katabolizm krezoli

Związki aromatyczne są wszechobecnym podłożem wzrostowym dla mikroorganizmów, źródłem węgla i energii. Aby substraty te mogły być wykorzystane, kluczowym etapem jest pojawienie się w środowisku grup hydroksylowych, równoznaczny z obecnością tlenu cząsteczkowego, jako ko-substratu [31].

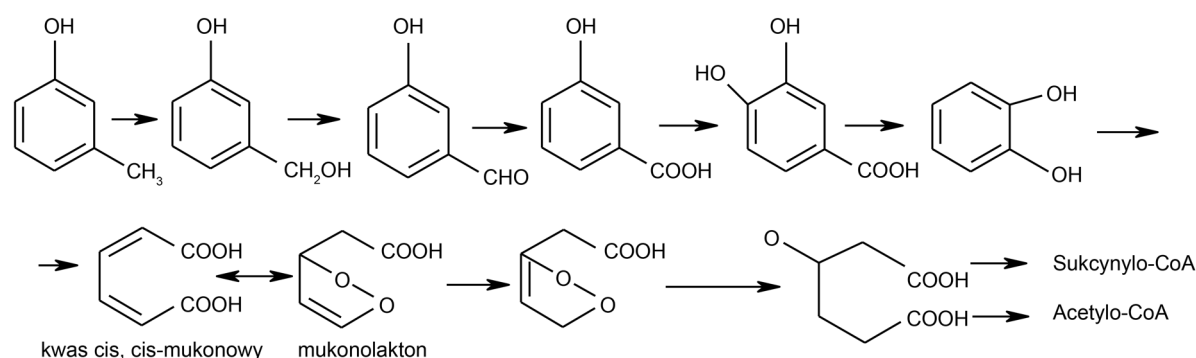
Tlenowy katabolizm krezoli jest inicjowany przez hydroksylazę fenolową (MHS), enzym należący do monooksygenaz z grupy hydroksylaz, przeprowadzający

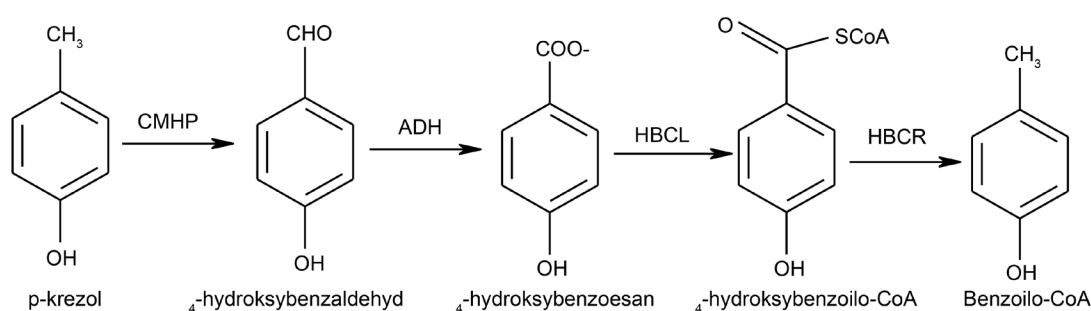
Rys. 1. Schemat etapu inicjującego mikrobiologiczny rozkład *p*-krezolu

hydroksylację pierścienia aromatycznego (Rys. 1) [54]. Do grupy monooksygenaz fenolowych (EC 1.14.13.7) należą enzymy indukcyjne, pochodne cytochromu P-450, zawierające w swym centrum aktywnym jony żelaza na różnych stopniach utlenienia [70]. Uwzględniając liczbę podjednostek białkowych można wyróżnić: wieloskładnikowe (mMHS), dwuskładnikowe (MHS) oraz jednoskładnikowe (MHS) hydroksylazy. Wieloskładnikowe (mMHS) wyizolowano ze szczepów bakterii *G-Proteobacteria*. Hydroksylazę fenolową składającą się z sześciu różnych podjednostek opisano u następujących rodzajów drobnoustrojów: *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Ralstonia*, *Cupriavidus* [65]. Hydroksylaza fenolowa wbudowuje jeden z atomów tlenu cząsteczkowego do pierścienia aromatycznego lub, w przypadku krezoli, do grupy metylowej. Na tym etapie elektrony z dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADH) są przenoszone przez białka żelazowo-siarkowe, pośrednio na flawinę reduktazy (NADPH) i ostatecznie na terminalną oksygenazę, za co odpowiada ferrodoksyna. Pierwszy elektron pochodzi zatem od kofaktora NAD(P)H [73, 89, 97]. Po jego przyjęciu kation  $Fe^{2+}$  wiąże cząsteczkowy tlen. Kompleks żelazo-nadtlenkowy jest skutkiem przyłączenia drugiego elektronu. W wyniku rozszczepienia tego kompleksu powstaje cząsteczka wody. Usunięcie z niej wodoru skutkuje powstaniem wolnego rodnika. Po jego uwolnieniu żelazo powraca do stanu wyjściowego [97]. Cafaro i wsp. [16] podkreślają, iż w genomie *Pseudomonas stutzeri* OX1 odkryto dwie różne monooksygenazy, hydroksylazę fenolową i monooksygenazę toluenu/o-xyłenu (TOMO). Uwzględniając szeroki

zakres specyficzności substratowej i zdolności hydroksylowania więcej niż jednej pozycji pierścienia aromatycznego przez enzym TOMO, można przypuszczać, że jest on w głównej mierze odpowiedzialny za reakcje monooksygenacji krezoli [8].

Kluczowymi związkami pośrednimi wytwarzanymi na szlaku biodegradacji tlenowej krezoli, które zostały zidentyfikowane są: katechol, kwas protokatechowy i kwas gentyzynowy [17]. Z badań Hopper'a i Taylor'a [37] wynika, że najczęstszymi ścieżkami biodegradacji *m*-krezolu jest szlak gentyzynowy i katecholowy (Rys. 2). Ren i wsp. [77] wskazują również na trzy najważniejsze związki pośrednie charakterystyczne dla szlaku tlenowego *orto m*-krezolu. Są to: kwas 3-hydroksybenzoesowy, kwas *cis*, *cis*-mukonowy i mukonolaktone, powstające dzięki indukcji przez drobnoustroje np. *Citrobacter farmeri* SC01 1,2-dioksygenazy, należącej do grupy enzymów intradiolowych (EC 1.13.11.1). Dioksygenaza terminalna (Rieske'ego) o potencjale oksydoredukcyjnym – 150 mV posiada Fe występujące na trzecim stopniu utlenienia i nie jest wrażliwa na zmiany pH [19]. Kwas *cis* *cis*-mukonowy, po przekształceniu do mukonolaktone ulega kolejnym zmianom do kwasu 3-ketoadyinowego, a ostatecznie do kwasu bursztynowego i acetylo-CoA włączanego do cyklu Krebsa [73, 89]. Na uwagę zasługuje również fakt, że metylowane związki aromatyczne rzadko ulegają rozszczepieniu intradiolowemu w procesie *orto*, ponieważ powstaje wówczas intermediat o wysokiej toksyczności – metylo-laktone. Proces ten jest jednak możliwy, gdy w układzie obok mieszaniny metylowych pochodnych pojawiają się związki chlorowane [36].

Rys. 2. Ścieżka biodegradacji *m*-krezolu na szlaku *orto* (katecholowym)



Rys. 3. Szlak beztlenowej biodegradacji *p*-krezolu. CMHP – metylohydroksylaza – *p*-krezolu, ADH – dehydrogenaza aldehydu, HBCL – 4-hydroksybenzoosan metylu-CoA; HBCR – reduktaza 4-hydroksybenzoilo-CoA

Wyniki badań Zaborin'y i wsp. [107] wykazują hamujący wpływ metylokatecholi na aktywność 1,2 dioksygenazy hydroksychinonowej. Jest on, co prawda, nieco słabszy od inhibicji związków chlorowych co powiązано z elektrodonorowym charakterem grupy metylowej, jednak godny podkreślenia. Nie należy również bagatelizować faktu, iż podczas rozszczepiania niektórych metylowych pochodnych katecholu mogą powstać toksyczne metabolity takie jak acylohalogenki [78, 87]. Niemniej jednak, pomimo toksycznego wpływu intermediatów, szczep *Pseudomonas* sp. HH35 wykazuje zdolność do rozkładu różnorodnych metylowych pochodnych hydrochinonu [87]. Może być to związane z aktywnością fosfolipidów, które jako cząsteczki efektorowe, przyłączają się do hydrofobowego fragmentu 1,2 dioksygenaz, co umożliwia z kolei dołączenie się do enzymu laktonizującego *cis*, *cis*-mukonianu. Według Guzik i wsp. [30] daje to szansę na zachowanie niskiego stężenia związków potencjalnie toksycznych w komórce.

Riegert i wsp. [78] twierdzą, że pochodne węglowodorów aromatycznych z grupą metylową, w warunkach tlenowych, mogą ulegać również rozszczepieniu typu *meta*, zarówno dystalnie jak i proksymalnie. Umiejętność proksymalnego rozszczepienia 3-metylokatecholu posiada chociażby *Sphingomonas xenophaga* BN6. Proces rozszczepienia metylokatecholu przeprowadzają 2,3 dioksygenazy (EC 1.13.11.2), enzymy ekstradiolowe. W wyniku ich działania wytwarzany jest semialdehyd 2-hydroksymukonowy, ulegający ostatecznym przekształceniom do aldehydu octowego i kwasu pirogronowego włączanych do cyklu Krebsa [73, 89]. Analiza skryzalizowanego enzymu 2,3 dioksygenazy wyizolowanego z *Pseudomonas putida*, ujawniła, iż w każdej z czterech podjednostek tworzących ten enzym funkcjonalny znajduje się niehemowe Fe (II) [51].

## 6. Beztlenowy katabolizm krezoli

Wszystkie trzy izomery krezolu ulegają beztlenowemu rozkładowi przez drobnoustroje denitryfikacyjne, redukujące siarczany oraz konsorcja metano-

genne, aczkolwiek szlaki metaboliczne każdego izomeru mogą różnić się od siebie [33]. Aktualny stan wiedzy odnośnie mechanizmów początkowych degradacji krezoli obejmuje dodawanie fumaranu, hydroksylację lub karboksylację [72]. W warunkach pozbawionych tlenu proces biodegradacji krezoli zaczyna się od utlenienia grupy metylowej. Kolejny etap to karboksylowanie do odpowiednich hydroksybenzoosanów, które następnie są przekształcane do benzoilo-CoA (Rys. 3) [31].

Johannes i wsp. [44] podkreślają, iż pierwszym, inicjującym enzymem jest metylohydroksylaza *p*-krezolu – PCMH (WE 1.17.99.1) heterotetrameryczne białko składające się z dwóch podjednostek, wyizolowane z bakterii bezwzględnie beztlenowej *Geobacter metallireducens*. Szczegółowe badania genetyczne szlaków metabolicznych wykazały, że spośród wielu *Pseudomonas* sp. tylko trzy szczepy posiadają ten enzym. Są to: *Pseudomonas putida* NCIMB 9866, *Pseudomonas putida* NCIMB 9869 [49] oraz *Pseudomonas mendocina* KR1. Jest to ściśle związane z obecnością genów kodujących PCMH zorganizowanych jako operony: *pchACXF* (*Pseudomonas putida* NCIMB 9866), *pcuCAXB* (*Pseudomonas mendocina* KR1) i *pchCF/pcuAB* kodujące PCMH [105].

Drobnoustroje te katalizują hydroksylację *p*-krezolu do alkoholu hydroksybenzylowego, po czym utleniają go do hydroksybenzaldehydu. W kolejnym etapie konwersji krezolu bierze udział 4-hydroksybenzoosan metylu-CoA (HBCL) jako aktywny monomer zaangażowany w syntezę tioestru 4-hydroksybenzoosan metylu-CoA [9] oraz reduktaza 4-hydroksybenzoilo-CoA (HBCR) odpowiedzialna za usunięcie grupy hydroksylowej z powstałego kwasu przez redukcję dwóch elektronów, których donorem jest ferredoksyna [12].

Skuteczność fumaranu odnotowano w przypadku *Desulfobacula toluolica* Tol2. Szczep ten przeprowadzał degradację *p*-krezolu w obecności zjonizowanej formy kwasu fumarowego przez specyficzne enzymy HBsA ujawniające nowe filogenetyczne rozgałęzienia, prowadząc do powstania aryl-bursztynianu [104].

Zaobserwowano także, że *o*-krezol metabolizowany przez *Paracoccus* sp. ulega karboksylacji do kwasu

3-metylo-4-hydroksybenzoesowego, który jest aktywowany do tioestru CoA i 3-metylo-4-hydroksybenzoilo-CoA przechodzącego do 3-metylobenzoilu CoA. Nie jest jednak do końca wyjaśnione, czy grupa metylowa jest utleniana bądź usuwana przed redukcją pierścienia. Proces ten przeprowadzają podobnie bakterie denitryfikacyjne i metanogenne. Nie stwierdzono jednak utlenienia grupy metylowej ani karboksylacji *m*-krezolu przez szczepy *Pseudomonas* sp. [80]. Z kolei degradacja *m*-krezolu przez bakterie metanogenne jest inicjowana przez karboksylację do kwasu 2-metylo-4-hydroksybenzoesowego. Zaobserwowano również, że w ich obecności następuje demetylacja 2-metylo-4-hydroksybenzoesanu metylu do 4-hydroksybenzoesanu [5]. W przypadku bakterii denitryfikacyjnych odkryto utlenianie grupy metylowej do 3-hydroksybenzoesanu, a ostatecznie na drodze dehydroksylacji do benzoilu lub benzoenu CoA [10].

Mimo że istnieje duża różnorodność aromatycznych substratów i mechanizmów inicjacji ścieżek beztlenowej degradacji krezoli, wspólnym związkiem pośrednim na szlakach ich rozkładu jest benzoilo-CoA (Tab. V). Na jednym z nich Bossert i wsp. [13] zaobserwowali zjawisko synergizmu pomiędzy dwoma szczepami drobnoustrojów denitryfikacyjnych PC-07 i PB-04. Obydwa szczepy transformowały *p*-krezol do kwasu *p*-hydroksybenzoesowego. Zaobserwowano jednak, że szczep PB-04 posiadał tę zdolność tylko w obecności szczepu PC-07.

Najnowsze badania dowodzą, że zarówno benzoilo-CoA jak i gen *GamA* odgrywają ważną rolę w globalnym obiegu węgla. Gen *GamA* jest kodowany przez hydrolazy rozszczepiające pierścień benzoilo-CoA. Jego szczególna rola wynika z faktu, że gen ten, w przeciwieństwie do reduktazy benzoilo-CoA jest aktywny w procesie denitryfikacji, redukcji żelaza i siarczanów. Dlatego też gen *GamA* może być proponowany jako biomarker w beztlenowym rozkładzie związków aromatycznych, w tym krezoli [72].

## 7. Mikrobiologiczna degradacja krezoli w środowisku glebowym

Wysoki koszt konwencjonalnych metod fizycznych i chemicznych usuwania fenolu i jego pochodnych nakłania do uwzględniania zdolności różnych mikroorganizmów do metabolizowania związków fenolowych, jako alternatywy w skutecznej bioremediacji środowiska skażonego tymi substancjami toksycznymi [3]. Wiedza na temat biodegradacji, biotransformacji krezoli i uwarunkowań genetycznych tych procesów stanowi podstawę do skutecznego poszukiwania rozwiązań analizowanego problemu. W wielu badaniach wykorzystuje się genetycznie modyfikowane mikro-

organizmy (GMMs) i tworzone z nich konsorcja, metody stymulacji oraz bioaugmentacji. Mikroorganizmy mogą być wprowadzane do gleby również jako pojedyncze szczepy preadaptowane do rozkładu konkretnych związków fenolowych. Stosuje się także geny, które w procesie koniugacji przenoszone są do komórek drobnoustrojów autochtonicznych [25].

Szybszy przebieg procesu degradacji można uzyskać jednak dzięki mieszanym kulturom, co zaobserwowano w badaniach Goswami i wsp. [28]. Szczepy *Rhodococcus erythropolis* M1 i *Pseudomonas fluorescens* P1 rozkładały znacznie szybciej mieszaninę fenolu i 4-krezolu w konsorcjum aniżeli w monokulturze. Niemniej jednak wykazały odwrotne, konkurencyjne oddziaływanie w stosunku do mieszaniny fenolu i 2-chlorofenolu. *Pseudomonas fluorescens* P1 był drobnoustrojem dominującym w stosunku do *Rhodococcus erythropolis* M1. Spowodowało to usunięcie fenolu i 2-chlorofenolu w ciągu 48 h, podczas gdy w monokulturach biodegradacja mieszaniny tych związków zajęła 18 h.

Silva i wsp. [92] zaobserwowali również intrygującą zależność. Okazało się, że proces nityfikacji przebiegał znacznie szybciej w obecności mieszaniny związków fenolowych, w tym: fenolu, 2-chlorofenolu, *p*-krezolu i 4-hydroksybenzaldehydu, aniżeli w obecności pojedynczych związków. Konsorcja bakterii nityfikacyjnych całkowicie usunęły mieszaninę związków fenolowych, podczas gdy sam 2-chlorofenol okazał się istotnym inhibitorem procesu nityfikacji.

Ważna jest również świadomość zróżnicowanej aktywności degradacyjnej ukierunkowanych na nią szczepów bakterii, a w szczególności uruchamiania różnych szlaków metabolicznych. Heinaru i wsp. [34] po wprowadzeniu do gleby zanieczyszczonej m.in. krezolem szczepów *Pseudomonas mendocina* PC1, *Pseudomonas fluorescens* PC18, PC20 i C24 zaobserwowali, iż mimo, że wszystkie szczepy rozkładały *p*-krezol, to jednak szczepy PC1 i PC20 przeprowadzały go drogą *meta*, a szczepy PC18 i PC24 szlakiem *orto*.

Zainteresowaniem cieszy się również łączenie w inokulacie szczepów bakterii i grzybów mikroskopowych [41]. Kirk [50] odkrył, że podczas degradacji związków aromatycznych bakterie funkcjonują na śluzowatych strzępkach grzyba *Corollospora maritima*, co może przyczynić się do inicjacji sukcesji mikroorganizmów. Potencjał degradacyjny grzybów w odniesieniu do związków fenolowych, obligujący do prowadzenia badań w tym kierunku, odkryli Valli i Gold [98]. Wynioskowali oni, że grzyb *Phanerochaete chrysosporium* stymulował metabolizm 2,4-dichlorofenolu, bez precedensu usuwając atomy chloru przed rozszczepieniem pierścienia. Z kolei Kennes i Lema [46] dowiedli, że grzyb ten, w obecności glukozy, jest w stanie katalizować rozkład *p*-krezolu (50 mg dm<sup>-3</sup>) jak i fenolu (50 mg dm<sup>-3</sup>) na zbliżonym poziomie. Wyniki analiz

Alexievy i wsp. [2] wykazały, że *Trichosporon cutaneum* R57 w obecności *m*-krezolu ( $0,2 \text{ g dm}^{-3}$ ), jako jedyne źródła węgla, katalizował metabolizm tego związku dużo szybciej niż w kombinacji z fenolem. Co więcej, krezol w pozycji *meta* w czasie 27 h badań uległ degradacji w mniejszym stopniu niż 3-nitrofenol, 2,6-nitrofenol czy rezorcyna.

Próby oceny wrażliwości dziewięciu rodzajów grzybów na trzy izomery krezolu w glebie zanieczyszczonej krezotem podjął Atagana [5]. Już po 14 dniach badań stwierdził, że ze wszystkich rodzajów grzybów: *Candida*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Monicillium*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Pleurotus*, *Phanerochaete*, czułe na obecność *p*-krezolu w glebie są *Candida* sp. i *Pleurotus* sp., a na *o*-krezol i *m*-krezol *Trichoderma* sp. i *Phanerochaete* sp. Zastosowanie mieszaniny sześciu izolatów ujawniło jednak, że *Phanerochaete* sp. jako jedyny jest w stanie funkcjonować w glebie zanieczyszczonej krezotem po upływie 38 dni inkubacji. Znacznie wolniej aniżeli fenol i *o*-krezol degradowane były izomery krezolu w położeniu *meta* i *para*, przy czym *p*-krezol okazał się bardziej oporny niż *m*-krezol. Niemniej jednak po aplikacji mieszaniny sześciu izolatów grzybów został równie skutecznie zdegradowany.

Na uwagę zasługują także konstatacje Chi i wsp. [18]. Zaobserwowali oni korzystne zjawisko synergizmu w środowisku glebowym. Pomimo wprowadzenia do gleby określonych szczepów drobnoustrojów degradacja związków fenolowych była szybsza w obecności mikroorganizmów rodzimych niż w sterylnej glebie. Nakłania to do wykonywania badań nad rozkładem krezoli w naturalnych warunkach środowiskowych tym bardziej, że ich przebieg determinują w istotny sposób właściwości biologiczne, fizyczne i chemiczne gleb [63]. Romantschuk i wsp. [79] podkreślają znaczenie temperatury, dostępności tlenu atmosferycznego, ilości substancji odżywczych, pH oraz wilgotności. Mrozik [63] sugeruje, że fenole i ich pochodne, jako główne składniki budulcowe jąder substancji humusowych, wykazują największe powinowactwo do frakcji humin. W mniejszym stopniu wiążą się z kwasami huminowymi i fulwowymi. Wydajnej biodegradacji związków aromatycznych w glebie możemy oczekiwać wówczas gdy stosunek węgla do azotu i fosforu wynosi odpowiednio 100:10:1 [56], minimalna ilość powietrza wypełniająca przestrzeń w glebie utrzymuje się na poziomie około 10%, wartość pH oscyluje pomiędzy 6–8, a temperatura środowiska glebowego wynosi 20–30°C [11, 55]. Nie bez znaczenia jest również stopień agregacji gleby, który determinuje zarówno aktywność mikroorganizmów jak i biodostępność związków aromatycznych [15]. Wyniki badań Shibata i wsp. [88] analizujących biodegradację *p*-krezolu w siedmiu japońskich glebach ryżowych po części korespondują z tą tezą. Odnotowano bowiem, że w warunkach tle-

nowych, niezależnie od zróżnicowanych właściwości gleb ich czas rozkładu wynosił 19 dni. Więcej zależności zaobserwowano w przebiegu beztlenowej biodegradacji *p*-krezolu w trzech glebach wyróżniających się niską zawartością żelaza i azotanów. Okres półtrwania tego związku wynosił w nich od 11 do 740 dni. Istotną rolę odgrywała wartość potencjału oksydo-redukcyjnego tych gleb. Zawartość węgla organicznego nie miała w tym procesie znaczenia.

Drobnoustroje zmodyfikowane genetycznie stanowią dość kontrowersyjną grupę mikroorganizmów w odniesieniu do naturalnych warunków środowiskowych. Wydawałoby się, że w związku z tym, że są one źródłem transpozonów oraz plazmidów dla mikroflory autochtonicznej gleb, łatwo przenoszonych na nią na drodze horyzontalnego transferu genów, istnieje szansa na szybki wzrost zdolności degradacyjnych mikroorganizmów glebowych. Jednak Van der Meer i wsp. [99] podkreślają, że GMMs jest to grupa skuteczna tylko w odniesieniu do ściśle wyselekcjonowanego specyficznego substratu. Dlatego też w złożonych warunkach naturalnych staje się mniej przydatna, a mikroorganizmy autochtoniczne są dla niej silną konkurencją, chociażby z tego powodu, że przeszły naturalną selekcję i posiadają potencjał do tworzenia nowych szlaków metabolicznych.

## 8. Podsumowanie

Jednym ze skutecznych sposobów eliminacji krezoli ze środowiska glebowego jest ich degradacja mikrobiologiczna do  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$ . Satysfakcjonujący jest również rozkład tych ksenobiotyków do związków całkowicie nietoksycznych bądź do produktów pośrednich o mniejszej toksyczności [63]. Mikroorganizmy posiadają wyjątkową umiejętność adaptacji w nowych, trudnych warunkach środowiskowych, a co istotniejsze są w stanie wykorzystać, jako substraty energetyczne i budulcowe związki, które nie są produktami ich metabolizmu. Rozkład krezoli przez mikroorganizmy może zachodzić zarówno w tlenowych jak i beztlenowych warunkach na różnych ścieżkach degradacji. Do technik, dzięki którym można określić metabolity pośrednie oraz mechanizmy zachodzących reakcji należą: CSIA – analiza izotopowa [102], HPLC, LC-MS, widmo FT-IR – potwierdzająca powstawanie mukonolaktenu podczas biodegradacji *m*-krezolu oraz GC-MS ujawniająca obecność kwasu 3-hydroksybenzoesowego i kwasu 3,4-dihydroksybenzoesowego [77].

Należy jednak pamiętać, że pomimo podejmowanych wielokrotnie prób wyjaśnienia mechanizmów i detalicznego poznania reakcji chemicznych zachodzących podczas biodegradacji krezoli oraz rozszyfrowania genetycznych uwarunkowań drobnoustrojów

obligujących je do rozkładu metylofenoli, toksyczność tych związków może wywierać na mikroorganizmy silny negatywny wpływ. Zatem obszar badań ukierunkowanych na zdiagnozowanie toksyczności krezoli na drobnoustroje środowiska glebowego i innych ekosystemów powinien permanentnie poszerzać swój zasięg.

## 9. Piśmiennictwo

- Alexieva Z., Ivanova D., Godjevargova T., Atanasov B.: Degradation of some phenol derivatives by *Trichosporon cutaneum* R57. *Process Biochem.* **37**, 1215–1219 (2002)
- Alexieva Z., Yemendzhiev H., Zlateva P.: Cresols utilization by *Trametes versicolor* and substrate interactions in the mixture with phenol. *Biodegradation*, **21**, 625–635 (2010)
- Arora P.K., Bae H.: Bacterial degradation of chlorophenols and their derivatives. *Microb. Cell. Fact.* **13**, 1–17 (2014)
- Arutchelvan V., Kanakasabai V., Nagarajan S., Muralikrishnan V.: Isolation and identification of novel high strength phenol degrading bacterial strains from phenol-formaldehyde resin manufacturing industrial wastewater. *J. Hazard. Mater. B.* **127**, 238–243 (2005)
- Atagana H.I.: Biodegradation of phenol, *o*-cresol, *m*-cresol and *p*-cresol by indigenous soil fungi in soil contaminated with creosote. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 851–858 (2004)
- ATSDR 2013 substance priority list. Atlanta, GA, U.S.A: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. <http://www.atsdr.cdc.gov/spl/> (23.03.2016)
- Bak F., Widdel F.: Anaerobic degradation of phenol and phenol derivatives by *Desulfobacterium phenolicum* sp. nov. *Arch. Microbiol.* **146**, 177–180 (1986)
- Bertoni G., Bolognesi F., Galli E., Barbieri P.: Cloning of the genes for and characterization of the early stages of toluene catabolism in *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3704–3711 (1996)
- Biegert T., Altenschmidt U., Eckerskorn C., Fuchs G.: Enzymes of anaerobic metabolism of phenolic compounds. 4-hydroxybenzoate-CoA ligase from denitrifying *Pseudomonas* species. *Eur. J. Biochem.* **213**, 555–561 (1993)
- Boll M.: Key enzymes in the anaerobic aromatic metabolism catalysing Birch-like reductions. *Biochim. Biophys. Acta*, **1707**, 34–50 (2005)
- Bonting C.F.C., Schneider S., Schmidtberg G., Fuchs G.: Anaerobic degradation of *m*-cresol via methyl oxidation to 3-hydroxybenzoate by a denitrifying bacterium. *Arch. Microbiol.* **164**, 63–69 (1995)
- Boopathy R.: Factors limiting bioremediation technologies Review paper. *Bioresource Technol.* **74**, 63–67 (2000)
- Bossert I.D., Rivera M.D., Young L.Y.: *p*-Cresol biodegradation under denitrifying conditions: Isolation of a bacterial coculture. *FEMS Microbiol. Ecol.* **38**, 313–319 (1986)
- Bravo L.: Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317–333 (1998)
- Bronick C.J., Lal R.: Soil structure and management: a review. *Geoderma*, **124**, 3–22 (2005)
- Cafaro V., Notomista E., Capasso P., Donato D.: Phenol Hydroxylase and Toluene/*o*-Xylene Monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1: Interplay between Two Enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 2211–2219 (2004)
- Caspi R.T., Altman K., Dreher C.A., Fulcher P., Subhraveti I.M., Keseler A., Kothari M., Krummenacker M., Latendresse L.A., Mueller Q., Ong S., Paley A., Pujar A.G., Shearer M., Travers D., Weerasinghe P., Karp Z.P.D.: The Meta Cyc Database of metabolic pathways and enzymes and the Bio Cyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Res.* **40**, 742–753 (2012)
- Chi X.Q., Zhang J.J., Zhao S., Zhou N.Y.: Bioaugmentation with a consortium of bacterial nitrophenol-degraders for remediation of soil contaminated with three nitrophenol isomers. *Environ. Pollut.* **172**, 33–41 (2013)
- Colbert Ch.L., Couture M.M.J., Eltis L.D.T., Bolin J.A.: Cluster Exposed: Structure of the Rieske Ferredoxin from Biphenyl Dioxygenase and the Redox Properties of Rieske Fe-S Proteins. *Structure*, **8**, 1267–1278 (2000)
- Dercová K., Certík M., Malová A., Sejáková Z.: Effect of chlorophenols on the membrane lipids of bacterial cells. *Int. Biodeter. Biodegr.* **54**, 251–254 (2004)
- Devassy B.M., Shanbhag G.V., Lefebvre F., Halligudi S.B.: Alkylation of *p*-cresol with tert-butanol catalyzed by heteropoly acid supported on zirconia catalyst. *J. Molec. Catal. A: Chem.* **210**, 125–130 (2004)
- Dziennik Ustaw, nr 1, poz. 1800: Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 18 listopada 2014 r. w sprawie warunków, jakie należy spełnić przy wprowadzaniu ścieków do wód lub do ziemi, oraz w sprawie substancji szczególnie szkodliwych dla środowiska wodnego (2014)
- Dziennik Ustaw, nr 165, poz. 1395: Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 września 2002 r. w sprawie standardów jakości gleby oraz standardów jakości ziemi (2002)
- Dziennik Ustaw, nr 212, poz. 1769: Rozporządzenie Ministra Gospodarki i Pracy z dnia 10 października 2005 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie najwyższych dopuszczalnych stężeń i natężeń czynników szkodliwych dla zdrowia w środowisku pracy (2005)
- El Fantroussi S., Agathos S.N.: Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 268–275 (2005)
- European Commission Employment, Social Affairs and Inclusion.: Recommendation from the Scientific Committee for Occupational Exposure Limits for 4,6-dinitro-*o*-cresol SCOEL/SUM/60, 1–14 (2004)
- Flores C., Cabot P.L., Centellas F., Garrido J.A., Rodriguez R.M., Arias C., Brillas E.: Solar photo electro-Fenton degradation of cresols using a flow reactor with a boron-doped diamond anode. *Appl. Catal. B: Environm.* **75**, 17–28 (2007)
- Goswami M., Shivaraman N., Singh R.P.: Microbial metabolism of 2-chlorophenol, phenol and *rho*-cresol by *Rhodococcus erythropolis* M1 in co-culture with *Pseudomonas fluorescens* P1. *Microbiol. Res.* **160**, 101–109 (2005)
- Gregory G.L.: Method of *ortho*-alkylating phenol. General Electric Co., US Patent 4933509 (1989)
- Guzik U., Greń I., Wojcieszynska D., Łabużek S.: Dioksygenazy – główne enzymy degradacji związków aromatycznych. *Biotechnologia*, **3**, 71–88 (2008)
- Harwood C. S., Burchhardt G., Herrmann H., Fuchs G.: Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**, 439–458 (1999)
- Hayashi M., Nakamura A.Y., Higashi K., Kato H., Kishida F., Kaneko H.: A quantitative structure – activity relationship study of the skin irritation potential of phenols. *Toxicol. in vitro*, **13**, 915–922 (1999)
- Heider J., Fuchs G.: Microbial Anaerobic Aromatic Metabolism. *Anaerobe*, **3**, 1–22. (1997)
- Heinaru E., Merimaa M., Viggor S., Lehiste M., Leito I., Truu J., Heinaru A.: Biodegradation efficiency of functionally important populations selected for bioaugmentation in phenol – and oil-polluted area. *FEMS Microbiol. Ecol.* **51**, 363–373 (2005)

35. Heipieper H.J., Weber F.J., Sikkema J., Keweloh H., Bont J.A.M.: Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends Biotechnol.* **12**, 409–415 (1994)
36. Hollender J., Hopp J., Dott W.: Cooxidation of chloro- and methylphenols by *Alcaligenes xylooxidans* JH1. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 445–450 (2000)
37. Hopper D.J., Taylor D.G.: Pathways for the degradation of *m*-cresol and *p*-cresol by *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **122**, 1–6 (1975)
38. Huertas M.J., Duque E., Marques S., Ramos J.L.: Survival in soil of different toluene-degrading *Pseudomonas* strains after solvent shock. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 38–42 (1998)
39. Hui L., Yub Qi J., Wang G., Yea F., Conga Y.: Biodegradation of phenol at high concentration by a novel yeast *Trichosporon montevidense* PHE1. *Process Biochem.* **46**, 1678–1681 (2011)
40. Huijbrechts R.P.H., Kroon A.I.P.M., Kruij B.: Topology and transport of membrane lipids in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1469**, 43–61 (2000)
41. Jacques R.J.S., Santos E.C., Bento F.M., Peralba M.C.R., Selbach P.A., Sa E.L.S., Camargo F.A.O.: Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp. isolated from a petrochemical sludge landfarming site. *Int. Biodeter. Biodegr.* **56**, 143–150 (2005)
42. Jain R.K., Bayly R.C., Skurray R.A.: Specific deletion of a large segment of *pra* 500: a 3,5-xyleneol degradative plasmid. *Lett. Appl. Microbiol.* **12**, 216–220 (1991)
43. Jiang Y., Wen J., Li H., Yang S., Hu Z.: The biodegradation of phenol at high initial concentration by the yeast *Candida tropicalis*. *Biochem. Eng. J.* **24**, 243–247 (2005)
44. Johannes J., Bluschke A., Jehmlich N., Bergen M., Boll M.: Purification and characterization of active-site components of the putative *p*-cresol Methylhydroxylase Membrane Complex from *Geobacter metallireducens*. *J. Bacteriol.* **190**, 6493–6500 (2008)
45. Kaisoon O., Siriamornpun S., Weerapreeyakul N., Meeso N.: Phenolic compounds and anti-oxidant activities of edible flowers from Thailand. *J. Funct. Foods*. **3**, 88–99 (2011)
46. Kennes C., Lema J.M.: Simultaneous biodegradation of *p*-cresol and phenol by the basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Ind. Microbiol.* **13**, 311–314 (1994)
47. Keweloh H., Diefenbach R., Rehm H. J.: Increase of phenol tolerance of *Escherichia coli* by alterations of the fatty acid composition of the membrane lipids. *Arch. Microbiol.* **157**, 49–53 (1991)
48. Khleifat M.K.: Biodegradation of phenol by *Ewingella americana*: Effect of carbon starvation and some growth conditions. *Process Biochem.* **41**, 2010–2016 (2006)
49. Kim J., Fuller J.H., Cecchini G., McIntire W.S.: Cloning, sequencing, and expression of the structural genes for the cytochrome and flavoprotein subunits of *p*-cresol methylhydroxylase from two strains of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **176**, 6349–6361 (1994)
50. Kirk P.W.: Isolation and culture of lignicolous marine fungi. *Mycologia*, **61**, 174–177 (1969)
51. Kita A., Kita S., Inaka K., Ishida T., Horiike K., Nozaki M.: Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of expressed *Pseudomonas putida* catechol 2,3-dioxygenase. *J. Biochem.* **122**, 201–204 (1997)
52. Krastanov A., Alexieva Z., Yemendzhiev H.: Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives. *Eng. Life Sci.* **13**, 76–87 (2013)
53. Landau M.V., Kaliya M.L., Herskowitz M.: Ammoxidation of *p*-cresol to *p*-hydroxybenzoxynitrile high-performance boraphosphoria supported catalysts. *Appl. Catal. A: Gen.* **208**, 21–34 (2001)
54. Leahy J.G., Batchelor P.J., Morcomb S.Z.: Evolution of the soluble di iron monooxygenases. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 449–479 (2003)
55. Leahy J.G., Colwell R.R.: Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiol. Rev.* **54**, 305–315 (1990)
56. Liebeg E.W., Cutright T.J.: The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil. *Int. Biodeter. Biodegr.* **44**, 55–64 (1999)
57. Londry K.L., Fedorak P.M.: Use of fluorinated compounds to detect aromatic metabolites from *m*-cresol in a methanogenic consortium: evidence for a demethylation reaction. *Appl. Env. Microbiol.* **59**, 2229–2238 (1993)
58. Lovley D.R., Giovannoni S.J., White D.C., Champine J.E., Phillips E.J.P., Gorby Y.A., Goodwin S.: *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Arch. Microbiol.* **159**, 336–344 (1993)
59. Mäkelä M.R., Marinović M., Nousiainen P., Liwanag A.J.M., Benoit I., Sipilä J., Hatakka A., Vries R.P., Hildén K.S.: Aromatic Metabolism of Filamentous Fungi in Relation to the Presence of Aromatic Compounds in Plant Biomass. *Adv. Appl. Microbiol.* **91**, 1–75 (2015)
60. Marrot B., Barrios-Martinez A., Moulin P., Roche N.: Biodegradation of high phenol concentration by activated sludge in an immersed membrane bioreactor. *Biochem. Eng. J.* **30**, 174–183 (2006)
61. Michałowicz J., Duda W.: Phenols-Sources and Toxicity. *Polish J. Environ. Stud.* **16**, 347–362 (2007)
62. Moridani M.Y., Siraki A., Chevaldina T., Scobie H., Obrie N.P.J.: Quantitative structure toxicity relationship for catechols in isolated rat hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* **147**, 297–307 (2004)
63. Mrozik A.: Zmiany w składzie bakteryjnych kwasów tłuszczowych w czasie rozkładu fenolu w glebie. Wyd. UŚ Katowice, 1–106 (2009)
64. Müller J.A., Galushko A.S., Kappler A., Schink B.: Initiation of Anaerobic Degradation of *p*-Cresol by Formation of 4-Hydroxybenzylsuccinate in *Desulfobacterium cetonicum* J. *Bacteriol.* **183**, 752–757 (2001)
65. Murray J.C., Burch J.A., Streilein R.D., Iannacchione M.A., Hall R.P., Pinnell S.R.: A topical antioxidant solution containing vitamins C and E stabilized by ferulic acid provides protection for human skin against damage caused by ultraviolet irradiation. *J. Am. Acad. Dermatol.* **59**, 418–425 (2008)
66. Murray L. J., Lippard S. J.: Substrate trafficking and dioxygen activation in bacteria multicomponent monooxygenases. *Accounts Chem. Res.* **40**, 466–474 (2007)
67. Nešvera J., Rucká L., Pátek M.: Chapter Four-Catabolism of Phenol and Its Derivatives in Bacteria: Genes, Their Regulation, and Use in the Biodegradation of Toxic Pollutants. *Adv. Appl. Microbiol.* **4**, 107–160 (2015)
68. OECD SIDS.: *m*-, *p*-cresol (Screening Information Data Set-SIDS)\_<http://www.inchem.org/documents/sids/sids/m-p-cresols.pdf>. (2006) (23. 03. 2016)
69. OECD SIDS.: *o*-cresol (Screening Information Data Set-SIDS) <http://www.inchem.org/documents/sids/sids/95487.pdf>. (2005) (23.03.2016)
70. Otto K., Hofstetter K., Röthlisberger W. B., Schmid A.: Biochemical Characterization of StyAB from *Pseudomonas* sp. strain VLB120 as a Two-Component Flavin-Diffusible Monooxygenase. *J. Bacteriol.* **186**, 5292–5302 (2004)
71. Pérez-Pantoja D., Iglesia D.R., Pieper D.H., Gonzalez B.: Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 736–794 (2008)
72. Porter A.W., Young L.Y.: Chapter Five-Benzoyl-CoA, a Universal Biomarker for Anaerobic Degradation of Aromatic Compounds. *Adv. Appl. Microbiol.* **88**, 167–203 (2014)



73. Powlowski J., Shingler V.: Genetics and biochemistry of phenol degradation by *Pseudomonas* sp. CF600. *Biodegradation*, **5**, 219–236 (1994)
74. Pradhan N., Ingle A.O.: Mineralization of phenol by a *Serratia plymuthica* strain GC isolated from sludge sample. *Int. Biodeter. Biodegr.* **60**, 103–108 (2007)
75. Rabus R., Nordhaus R., Widdel L.W.F.: Complete oxidation of toluene under strictly anaerobic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Appl. Env. Microbiol.* **59**, 1444–1451 (1993)
76. Rasmussen G., Olsen R.A.: Sorption and biological removal of creosote-contaminants from groundwater in soil/sand vegetated with orchard grass (*Dactylis glomerata*). *Adv. Environ. Res.* **8**, 313–327 (2004)
77. Ren Y., Lihua P., Zhao G., Wei Ch.: Degradation of *m*-cresol via the ortho cleavage pathway by *Citrobacter farmeri* SC01. *Biochem. Eng. J.* **88**, 108–114 (2014)
78. Riegert U., Burger S., Stolz A.: Altering catalytic properties of 3-chlorocatechol-oxidizing extradiol dioxygenase from *Sphingomonas xenophaga* BN6 by random mutagenesis. *J. Bacteriol.* **183**, 2322–2330 (2001)
79. Romantschuk M., Sarand I.T., Petänen R., Peltola M., Jonsson-Vihanne T., Koivula K., Yrjälä K., Haahtela K.: Means to improve the effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches. *Environ. Pollut.* **107**, 179–185 (2000)
80. Rudolphi A., Tschuch A., Fuchs G.: Anaerobic degradation of cresols by denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* **155**, 238–248 (1991)
81. Saa L., Jaureguibeitia A., Largo E., Llama M.J., Serra, J.L.: Cloning, purification and characterization of two components of phenol hydroxylase from *Rhodococcus erythropolis* UPV-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**, 201–211 (2010)
82. Sad M.E., Padro C.L., Apestegui C.R.: Selective synthesis of *p*-cresol by methylation of phenol. *Appl. Catal. A-Gen.* **342**, 40–48 (2008a)
83. Sad M.E., Padro C.L., Apestegui C.R.: Synthesis of cresols by alkylation of phenol with methanol on solid acids. *Catal. Today.* **133–135**, 720–728 (2008b)
84. Saravanan P., Pakshirajan K., Saha P.: Biodegradation of phenol and *m*-cresol in batch and fed batch operated internal loop airlift bioreactor by indigenous mixed microbial culture predominantly *Pseudomonas* sp. *Bioresour. Technol.* **99**, 8553–8558 (2008)
85. Sarish S., Devassy B.M., Halligudi S.B.: tert-Butylation of *p*-cresol over WO<sub>x</sub>/ZrO<sub>2</sub> solid acid catalysts. *J. Molec. Catal. A: Chem.* **235**, 44–51 (2005)
86. Schmeling S., Narmandakh A., Schmitt O., Gadon N., Schühle K., Fuchs G.: Phenylphosphate Synthase: a New Phosphotransferase Catalyzing the First Step in Anaerobic Phenol Metabolism in *Thauera aromatica*. *J. Bacteriol.* **186**, 8044–8057 (2004)
87. Schmidt S., Kirby G.W.: Dioxygenative cleavage of C-methylated hydroquinones and 2,6-dichlorohydroquinone by *Pseudomonas* sp. HH35. *Biochim. Biophys. Acta.* **1568**, 83–89 (2001)
88. Shibata A., Yasushi I., Arata K.: Aerobic and anaerobic biodegradation of phenol derivatives in various paddy soils. *Sci. Total Environ.* **367**, 979–987 (2006)
89. Shingler V., Bartilson M., Moore T.: Cloning and Nucleotide Sequence of the Gene Encoding the Positive Regulator (DmpR) of the Phenol Catabolic Pathway Encoded by pVI150 and Identification of DmpR as a Member of the NtrC Family of Transcriptional Activators. *J. Bacteriol.* **175**, 596–1604 (1993)
90. Shinoda Y., Akagi J., Uchihashi Y., Hiraishi A., Yukawa H., Yurimoto H.: Anaerobic degradation of aromatic compounds by *Magnetospirillum* strains: isolation and degradation genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 1483–1491 (2005)
91. Sikkema J., Weber F.J., Heipieper H.J., Bont J.A.M.: Cellular Toxicity of Lipophilic Compounds: Mechanisms, Implications, and Adaptations. *Biocatalysis*, **10**, 113–122 (1994)
92. Silva C.D., Gomez J., Beristain-Cardoso R.: Simultaneous removal of 2-chlorophenol, phenol, *p*-cresol and *p*-hydroxybenzaldehyde under nitrifying conditions: kinetic study. *Bioresour. Technol.* **102**, 6464–6468 (2011)
93. Sparling G.P., Ord B.G., Vaughan D.: Changes in microbial biomass and activity in soils amended with phenolic acids. *Soil Biol. Biochem.* **13**, 455–460 (1981)
94. Starek A.: Krezol – mieszanina izomerów. Dokumentacja dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego. *Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy*, **1**, 95–111 (2007)
95. Toxicological profile for cresols: *o*-cresol, *m*-cresol.: U.S. Department of Health and Human Services. TP-91/11 (1992)
96. Tschuch A., Fuchs G.: Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying pseudomonadales. *Arch. Microbiol.* **148**, 213–217 (1987)
97. Ullrich R., Hofrichter M.: Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 271–293 (2007)
98. Valli K., Gold M. H.: Degradation of 2, 4-dichlorophenol by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* **173**, 345–352 (1991)
99. Van der Meer J.R., Ravatn R., Sentschilo V.: The *clc* element of *Pseudomonas* sp. strain B13 and other mobile degradative elements employing phage-like integrases. *Arch. Microbiol.* **175**, 79–85 (2001)
100. Van der Meer J.R., Vos W.M., Harayama S., Zehnder A.J.B.: Molecular Mechanisms of Genetic Adaptation to Xenobiotic Compounds. *Microbiol. Rev.* **56**, 677–694 (1992)
101. Veeresh G.S., Kumar P., Mehrotra I.: Treatment of phenol and cresols in up flow anaerobic sludge blanket (UASB) process: a review. *Water Res.* **39**, 154–170 (2005)
102. Wei X., Gilevska T., Wetzig F., Dorer C., Richnow H.H., Vogt C.: Characterization of phenol and cresol biodegradation by compound specific stable isotope analysis. *Environ. Pollut.* **210**, 166–173 (2016)
103. Wöhlbrand L., Jacob J.H., Kube M., Musmann M., Jarling R., Beck A.: Complete genome, catabolic sub-proteomes and key-metabolites of *Desulfobacula toluolica* Tol2, a marine, aromatic compound-degrading, sulfate-reducing bacterium. *Environ. Microbiol.* **15**, 1334–1355 (2013)
104. Wöhlbrand L., Wilkes H., Halder T., Rabus R.: Anaerobic degradation of *p*-ethylphenol by *Aromatoleum aromaticum* strain EbN1: Pathway, regulation, and involved proteins. *J. Bacteriol.* **190**, 5699–5709 (2008)
105. Wright A., Olsen R. H.: Self-mobilization and organization of the genes encoding the toluene metabolic pathway of *Pseudomonas mendocina* KR1. *Appl. Environ. Microb.* **60**, 235–242 (1994)
106. Yap L. F., Lee Y.K., Poh C.L.: Mechanism for phenol tolerance in phenol-degrading *Comamonas testosteroni* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 833–840 (1999)
107. Zaborina O., Seitz H.J., Sidorov I., Eberspächer J., Alexeeva E., Golovleva L., Lingens F.: Inhibition analysis of hydroxyquinol-cleaving dioxygenases from the chlorophenols degrading *Azotobacter* sp. GP1 and *Streptomyces rochei* 303. *J. Basic Microbiol.* **39**, 61–73 (1999)
108. Zhang T., Tremblay P.L., Chaurasia A.K., Smith J.A., Bain T.S., Lovley D.R.: Anaerobic benzene oxidation via phenol in *Geobacter metallireducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 7800–7806 (2013)

Nina Trojan<sup>1\*</sup>, Paweł Satora<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Wydział Technologii Żywności, Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Technicznej,  
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Wpłynęło w maju 2016 r.  
Zaakceptowano w lipcu 2016 r.

1. Wprowadzenie. 2. Antyoksydanty pochodzące z żywności. 3. Probiotyki. 4. Metody analizy właściwości antyoksydacyjnych. 5. Potencjał antyoksydacyjny probiotyków. 5.1. Produkty spożywcze zawierające probiotyki. 6. Doświadczenia *in vivo* – modele zwierzęce. 7. Badania kliniczne. 8. Mechanizm działania probiotyków jako antyoksydantów. 9. Podsumowanie

### Probiotics and their potential antioxidative activity

**Abstract:** Human population in the XXI century is struggling with the increasing incidence of such diseases as obesity, diabetes, cancers, food allergies and many others. Recent studies have shown that oxidative stress caused by reactive oxygen species and free radicals, may underlie the occurrence of many diseases. Probiotics are known for their beneficial effects on health and are established as dietary adjuncts. Researchers are trying to find potential probiotic strains which can exhibit antioxidant properties along other health benefits. *In vitro* and *in vivo* studies have indicated that probiotics exhibit antioxidant potential. Also, many studies have shown that consumption of probiotics as dietary supplements, may reduce oxidative damage and modify activity of crucial antioxidative enzymes in human cells. Incorporation of probiotics in foods can provide a good strategy to supply dietary antioxidants, but more studies are needed to standardize the methods and evaluate antioxidant properties of probiotics before they can be recommended for their antioxidant potential. This paper presents the latest news related to probiotics and their antioxidative potential.

1. Introduction. 2. Antioxidants from food. 3. Probiotics. 4. Methods for antioxidative activity testing. 5. Probiotics antioxidative potential. 5.1. Food products containing probiotics. 6. *In vivo* studies – animal models. 7. Clinical trials. 8. Probiotics as antioxidants. 9. Conclusions

**Słowa kluczowe:** antyoksydanty, probiotyki, ROS, stres oksydacyjny

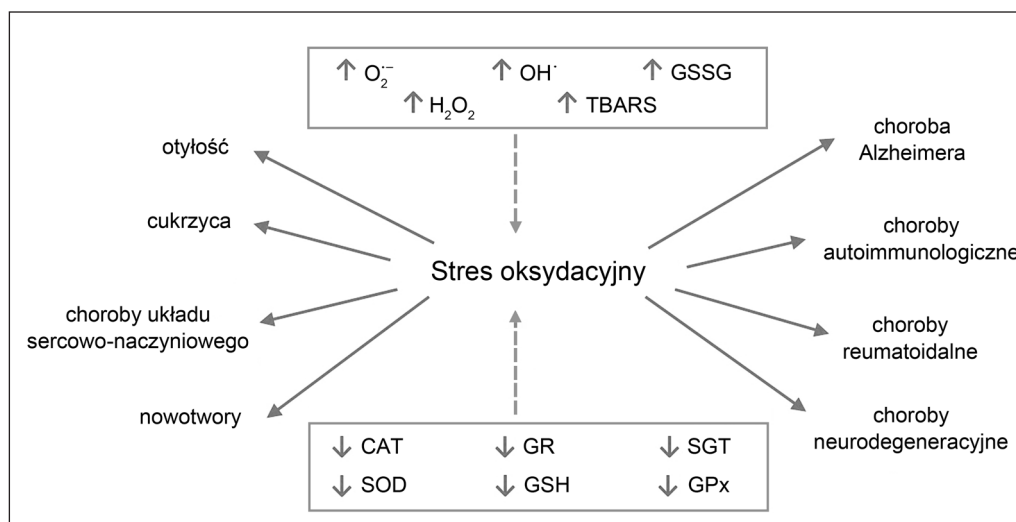
**Key words:** antioxidants, oxidative stress, probiotics, ROS

## 1. Wprowadzenie

Stres oksydacyjny definiowany jest jako stan komórki/organizmu, wywołany nagromadzeniem, a co za tym idzie nadmierną aktywnością reaktywnych form tlenu (ROS, *reactive oxygen species*) i/lub wolnych rodników. Do tego typu cząsteczek zalicza się między innymi anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\cdot-}$ ), nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ), rodnik hydroksylowy ( $OH^{\cdot}$ ), czy też metale przejściowe (np. miedź lub żelazo). Obecność tych związków w komórkach jest naturalnym zjawiskiem fizjologicznym, będącym następstwem występowania w nich reakcji utleniania, czyli procesów polegających na przenoszeniu elektronów z danej substancji na utleniacz – związek będący w analizowanej reakcji akceptorem elektronów. Wyżej wymienione wolne rodniki i ROS są produktami, których wysoka reaktywność nadaje im zdolność wywoływania szybkich reakcji łańcuchowych. W kaskadach takich reakcji w sposób niekontrolowany przez komórkę mogą zacząć tworzyć się kolejne reaktywne formy tlenu, prowadząc do zachwiania jej równowagi redoks. Obserwuje się wówczas wyższą produkcję wolnych rodników i ROS niż komórka jest w stanie unieczynnić za pomocą obecnych

w niej mechanizmów antyoksydacyjnych. Do tego typu mechanizmów należą reakcje enzymatyczne katalizowane między innymi przez dysmutazę ponadtlenkową (SOD, *superoxide dismutase*), peroksydazę glutationową (GPx, *glutathione peroxidase*), reduktazę glutationową (GR, *glutathione reductase*) peroksydazę, transferazę glutationową (SGT, *glutathione S-transferase*) oraz katalazę (CAT, *catalase*). W komórce występują także nieenzymatyczne antyoksydanty takie jak witamina E ( $\alpha$ -tokoferol), witamina C, koenzym Q, czy też glutation (GSH) [12, 50, 55, 56, 63] (Rys. 1). Ostatni z wymienionych nieenzymatycznych antyoksydantów pełni kluczową rolę w obronie antyoksydacyjnej. GSH jest substratem reakcji katalizowanych przez antyoksydanty enzymatyczne (między innymi peroksydazę glutationową) oraz stanowi „magazyn” grup tiolowych (-SH) w komórce. Dzięki obecności w jego cząsteczce grupy tiolowej może on oddziaływać z białkami, stabilizując ich strukturę. Glutation ulega przekształceniom z postaci zredukowanej (GSH) do utlenionej (GSSG), będącej dimerem glutationu. W reakcji przekształcenia GSH do GSSG powstają elektrony, które mogą być przyłączane przez wolne rodniki prowadząc do ich inaktywacji. GSH jest odtwarzane w reakcji katalizowanej przez reduktazę glutationową (GR).

\* Autor korespondencyjny: Wydział Technologii Żywności, Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Technicznej, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków; e-mail: ninatrojan@outlook.com



Rys. 1. Czynniki inicjujące powstanie stresu oksydacyjnego oraz jego rola w patogenezie wybranych chorób  
 $O_2^{\cdot-}$  – anionorodnik ponadtlenkowy,  $H_2O_2$  – nadtlenek wodoru,  $OH^{\cdot}$  – rodnik hydroksylowy, GSSG – utleniony glutation, TBARS – produkty peroksydacji lipidów, CAT – katalaza, SOD – dysmutaza ponadtlenkowa, GR – reduktaza glutationowa, GSH – zredukowany glutation, SGT – transferaza glutationowa, GPx – peroksydaza glutationowa.

lizowanej przez reduktazę glutationową w obecności NADPH, który zostaje utleniony do  $NADP^+$  [21]. Działanie wszystkich antyoksydantów w organizmie sprowadza się finalnie do przeciwdziałania efektom procesów utleniania. Czy to w sposób bezpośredni za pomocą katalizowania reakcji enzymatycznych, czy też pośrednio jako związki dezaktywujące wolne rodniki i zatrzymujące kaskady reakcji łańcuchowych. W skład systemów antyoksydacyjnych bez wątpienia wchodzi także grupy związków uczestniczących w stałym odtwarzaniu potencjału antyoksydacyjnego, ponieważ wszystkie cząsteczki uczestnicząc w reakcjach ulegają zużyciu i muszą zostać odtworzone [30].

Szereg wyników badań dostarcza dowodów na znaczącą rolę reaktywnych form tlenu, a przez to stresu oksydacyjnego w patogenezie wielu chorób u ludzi. Do schorzeń tych zalicza się między innymi choroby cywilizacyjne, takie jak otyłość, cukrzyca typu 2, choroby sercowo-naczyniowe, udary oraz chorobę Alzheimerera, zaćmę czy też choroby reumatoidalne [12, 50, 56, 63] (Rys. 1). Istnieje zatem potrzeba poszukiwania nietoksycznych przeciwutleniaczy, które zwiększają zdolności antyoksydacyjne organizmu, a przez co spowolnią postęp wielu przewlekłych chorób. Dzięki wynikom licznych badań naukowych, publikacji popularnonaukowych, a nawet reklam obserwuje się coraz większą świadomość społeczeństwa na temat wartości odżywczych spożywanych produktów. Taka sytuacja skłania do poszukiwania nowych źródeł antyoksydantów w już istniejących na rynku składnikach żywności o udokumentowanej, innej wartości prozdrowotnej. Różne doniesienia wskazują, że to probiotyki mogą stać się takim składnikiem. Ze względu na swoją długą tradycję bezpiecznego stosowania oraz ich potencjalne działanie

przeciwrodnikowe stają się obiecującym składnikiem żywności o działaniu antyoksydacyjnym i są pod tym kątem intensywnie badane [47].

## 2. Antyoksydanty pochodzące z żywności

Wśród wielu składników żywności najbardziej obfite w naturalne przeciwutleniacze są produkty pochodzenia roślinnego. Zawarte w nich antyoksydanty pełnią swoją funkcję działając w różnorodny sposób. Część z nich odpowiada za wychwytywanie i „zmiatanie” wolnych rodników oraz neutralizowanie ich w bezpośrednich reakcjach chemicznych (wolne rodniki i reaktywne formy tlenu są redukowane do bardziej stabilnych i nie-reaktywnych form). Inne mają zdolność do hamowania aktywności enzymów odpowiedzialnych za tworzenie wolnych rodników lub chelatowania tzn. wiązania w komórkach jonów metali przejściowych (szczególnie żelaza i miedzi), czyli metali odpowiedzialnych za zapoczątkowanie łańcucha reakcji wolnorodnikowych. Prowadzą także do ochrony innych antyoksydantów, np. zapobiegając utlenianiu witaminy C lub poprawiając działanie endogennych przeciwutleniaczy np. glutationu. Do tego typu związków zalicza się między innymi: polifenole tworzące dwie główne grupy związków – kwasy fenolowe (kwas kawowy, elagowy, ferulowy) oraz flawonoidy z licznymi podgrupami, karotenoidy, witaminy i tokoferole [54, 70].

Bogatymi w tego typu związki roślinami są: czosnek, brokuły, zielona herbata, soja, pomidory, marchew, brukselka, kapusta, cebula, czerwone buraki, żurawina, kakao, jagody, czerwone winogrona, śliwki i owoce cytrusowe. Rozbudowany rynek żywności funkcjonalnej

zajął się poszukiwaniem substancji o charakterze antyoksydacyjnym w już istniejących produktach. Wykazano, że duży potencjał w tym obszarze wykazują produkty mleczne. Ostatnie doniesienia wskazują, że szeroko rozpowszechnione probiotyki mogą także okazać się dobrym źródłem przeciwutleniaczy [47].

### 3. Probiotyki

Probiotyki to żywe drobnoustroje, które – podawane w odpowiednich ilościach – wywierają korzystne skutki zdrowotne. Są to mikroorganizmy, głównie bakterie kwasu mlekowego (LAB, *Lactic Acid Bacteria*), mogące zasiedlać różne środowiska, w tym organizm człowieka. Probiotyk może mieć w swym składzie pojedyncze szczepy bakterii kwasu mlekowego, szczepy drożdży, kultury pleśni lub też bakterie kwasu mlekowego łącznie z wyselekcjonowanymi szczepami drożdżowymi. Bakterie probiotyczne dodawane są do różnych środków spożywczych. Występują przede wszystkim w sfermentowanych produktach mlecznych, ale także w tradycyjnych kiszonkach. Nadają produktom specyficzny smak i zapach, a także chronią je przed rozwojem szkodliwych mikroorganizmów. Można je również znaleźć w preparatach farmaceutycznych, suplementach diety, stosowanych chociażby przy antybiotykoterapii [59]. Wśród wielu pozytywnych efektów jakie probiotyki wywierają na ludzki organizm wymienić można między innymi: łagodzenie objawów nietolerancji laktozy, zapobieganie biegunkom i infekcjom układu moczowo-płciowego, obniżanie poziomu cholesterolu, wzmocnienie układu odpornościowego [4, 14], zmniejszanie ryzyka wystąpienia nowotworów – głównie jelita grubego – oraz łagodzenie objawów alergii [15, 44].

Do drobnoustrojów o działaniu probiotycznym należą przede wszystkim bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Oprócz nich do tej grupy zalicza się także inne bakterie kwasu mlekowego: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weissella* [37], *Bacillus* spp. [28], niektóre szczepy *Escherichia coli* oraz *Propionibacterium* spp. Najbardziej rozpowszechnionym szczepem drożdżowym o właściwościach probiotycznych jest *Saccharomyces boulardii* [26, 53].

Ostatnie dziesięciolecia zmieniły podejście społeczeństwa do zdrowego odżywiania i stosowania w diecie tzw. żywności funkcjonalnej, inaczej FOSHU (*Foods for Specified Health Use*). Jest to rodzaj żywności, z której usunięto szkodliwe składniki (np. alergeny), bądź wzbogacono ją w substancje aktywne fizjologicznie, tak aby otrzymać produkt posiadający odpowiednią wartość odżywczą, poprawiającą stan zdrowia człowieka [68]. Poszerzenie wiedzy na temat pozytywnych właściwości drobnoustrojów probiotycznych sprawiło, że ich obec-

ność w komercyjnych produktach spożywczych jest powszechna i została bardzo dobrze przyjęta przez konsumentów. Dlatego przemysł spożywczy całego świata dokłada wszelkich starań, by skonstruować produkty żywności funkcjonalnej, będące nośnikami mikroorganizmów o działaniu probiotycznym, umożliwiając im przetrwanie w warunkach przewodu pokarmowego i pełnienie w nim swoich dobroczynnych funkcji. Do takich działań mobilizują także doniesienia o ich potencjalnych właściwościach antyoksydacyjnych, poruszanych w tym artykule.

### 4. Metody analizy właściwości antyoksydacyjnych

W celu oceny potencjału antyoksydacyjnego związków naturalnych opracowano wiele różnych metod. Najważniejszy jest jednak wybór metody względnie szybkiej i dającej obiektywne rezultaty, a przede wszystkim adekwatnej do specyfiki analizowanego produktu. Każdy z obecnie opisanych testów aktywności antyoksydacyjnej cechuje się specyficznym mechanizmem działania, mając przy tym swoje wady i zalety, jednakże w przypadku braku uniwersalnej metody dla danego produktu, która może dać jednoznaczne wyniki, najlepszym sposobem jest użycie wielu metod jednocześnie. Niektóre procedury obejmują stosowanie syntetycznych przeciwutleniaczy lub wolnych rodników, część opiera się na reakcjach peroksydacji lipidów, większość z nich wymaga wcześniejszej obróbki analizowanego materiału i ukazuje wyniki w specyficzny dla siebie sposób. Antyoksydacyjne właściwości produktów probiotycznych także badano stosując różne metody *in vitro* i *in vivo*. Ich opis przedstawiony został poniżej oraz zestawiony w Tabeli I.

#### Metoda z rodnikiem DPPH

Jedną z najczęściej stosowanych metod do pomiaru aktywności antyutleniającej jest metoda wykorzystująca rodnik DPPH $\cdot$  (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl). Metanolowy roztwór rodnika wykazuje pasmo absorpcji w zakresie widzialnym, z maksimum przy 515–540 nm. W wyniku przebiegu reakcji obserwowany jest spadek intensywności zabarwienia, proporcjonalny do zawartości antyutleniaczy. Rodnik powinien znajdować się w nadmiarze w stosunku do związku antyoksydacyjnego, tak by cała ilość antyutleniacza miała szansę zreagować [20]. W wyniku reakcji powstaje zredukowana forma rodnika DPPH $\cdot$  (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyna) o barwie żółtej [23]. Metoda DPPH jest często stosowana ze względu na to, że jest stosunkowo prosta i nie wymaga długotrwałego przygotowania próbki. Dodatkowo rodnik DPPH $\cdot$  jest dostępny komercyjnie, a więc nie trzeba go bezpośrednio wytwarzać z prekursora, jak w przypadku poniżej opisanej metody ABTS.

Tabela I  
Wybrane metody analizy właściwości antyoksydacyjnych różnych próbek biologicznych

Metoda	Zasada działania metody	Obserwacje	Piśmiennictwo
DPPH	w obecności związku o charakterze atyoksydacyjnym następuje redukcja stabilnego rodnika 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH) o fioletowym zabarwieniu do żółtej 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyny	żółte zabarwienie substancji oceniane wzrokowo lub analizowane spektrofotometrycznie	[11, 17]
ABTS	antyutleniacze prowadzą do redukcji kationorodnika ABTS <sup>+</sup> – 2,2-azynobis-(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian) powodując odbarwienie niebieskozielonego roztworu	odbarwienie roztworu oceniane wzrokowo lub analizowane spektrofotometrycznie	[27, 57]
FRAP	monitorowanie zdolności donorowych antyutleniacza, za pomocą pomiaru redukcji kompleksu żelaza(III) z 2,4,6-tris(2-pirydylo)-1,3,5-triazyną ([Fe <sup>3+</sup> – (TPTZ) <sub>2</sub> ] <sup>3+</sup> ) do intensywnie niebieskiego kompleksu [Fe <sup>2+</sup> – (TPTZ) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>	analiza spektrofotometryczna	[5, 8, 9]
ORAC	antyutleniacze hamują prowadzoną przez wolne rodniki reakcję utleniania sondy fluorescencyjnej, która w trakcie tej reakcji wykazuje spadek fluorescencji	analiza fluorymetryczna	[24, 46, 68]
analiza zdolności neutralizacji rodnika hydroksylowego	w obecności żelaza następuje zmiana absorbancji związana z dezaktywacją rodnika hydroksylowego przeprowadzaną przez antyoksydanty – kwasy hydroksybenzoesowe, należące do grupy polifenoli	analiza spektrofotometryczna	[29]

Za zgodą Mishra V i wsp., *J. Agric. Food Chem.* **63**, 3615-3526 (2015) Copyright (2015) American Chemical Society [47]

Metoda może być także stosowana z wykorzystaniem analizy przepływowo-wstrzykowej (FIA, *flow injection analysis*), co znacznie ułatwia i przyspiesza pomiar, a ponadto umożliwia w większym stopniu kontrolowanie warunków oznaczeń [43]. Wadą są zaś możliwe interferencje od związków absorbujących przy tej samej długości fali, np. karotenoidów.

#### Metoda z kationorodnikiem ABTS<sup>+</sup>

Inną metodą, opartą na przeniesieniu elektronu, ale również wykorzystującą detekcję spektrofotometryczną, jest metoda polegająca na monitorowaniu stężenia barwnego kationorodnika ABTS<sup>+</sup> – 2,2-azynobis-(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu). Ma on barwę niebieskozieloną i wykazuje cztery maksima absorpcji przy 417, 645, 728 oraz 815 nm w środowisku wodnym, a trzy – 414, 730, 873 nm w środowisku etanolowym. Kationorodnik przed pomiarem należy wygenerować. W tym celu można zastosować reakcje enzymatyczne (np. z mioglobina lub peroksydazą chrzanową) lub chemiczne utlenienie (za pomocą MnO<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>). Chemiczne metody generowania ABTS<sup>+</sup> są jednak bardziej wymagające pod względem warunków reakcji (m.in. bardzo długi czas reakcji). Antyutleniacze redukują ABTS<sup>+</sup> w zależności od aktywności, stężenia przeciwutleniacza i czasu trwania reakcji [18].

#### Metoda FRAP

(*Ferric Ion Reducing Antioxidant Parameter*)

Metoda oznaczania zdolności do redukcji jonów żelaza (III) opiera się na reakcji redukcji kompleksu Fe<sup>3+</sup> z (2,4,6-tris(2-pirydylo)-1,3,5-triazyną (TPTZ), zaś jej

produktem jest intensywnie niebieski kompleks z Fe<sup>2+</sup> ( $\lambda_{\max} = 593 \text{ nm}$ ). Mierzone są więc zdolności donorowe antyutleniacza [10]. Trwałość kompleksu zależy od pH, a optymalne warunki występują przy pH 3,6, które osiąga się przez dodatek buforu octanowego. Metoda FRAP jest szybka, ma jednak szereg wad, ponieważ wykorzystywany kompleks jest redukowany przez wszystkie związki, również te które nie należą do antyutleniaczy, których potencjał redoks jest niższy od 0,70 V. Powstałe jony Fe<sup>2+</sup> mogą w obecności H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> brać udział w reakcjach produkujących rodniki, co również wpływa myląco na uzyskane wyniki. Ponadto wartość pH reakcji nie jest zbliżona do pH fizjologicznego. Niektóre związki w ogóle nie wykazują redukujących zdolności w stosunku do Fe<sup>3+</sup>-TPTZ. Należą do nich tiole, w tym bardzo ważny, wspomniany we wcześniejszym fragmencie artykułu, glutation oraz białka [51]. Fakt ten powoduje zaniżanie wyników, szczególnie dla próbek biologicznych. Z tego powodu poszukiwane są nowe układy oparte na redukcji jonów Fe<sup>3+</sup> [6]. Za pomocą tej metody Carlsen i wsp. [13] analizowali aktywność antyoksydacyjną różnych produktów spożywczych. Kilka przykładów produktów przytoczonych w niniejszej pracy przeglądowej wraz z uzyskanymi przez badaczy wynikami przytoczono w Tabeli II.

#### Metoda ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

W metodzie tej rodniki peroksydowe (generowane ze związków azowych) lub rodniki hydroksyloowe (generowane z reakcji jonów Cu<sup>+</sup> z H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) reagują z sondą fluorescencyjną. Sondą jest związek wykazujący silną fluorescencję, np. fluoresceina, dichlorofluoresceina

Tabela II  
Zawartość związków antyoksydacyjnych oznaczonych metodą FRAP w wybranych produktach mlecznych i sokach owocowych, na podstawie Carlsen i wsp. [13]

Lp.	Produkt	Zawartość związków antyoksydacyjnych [mmol/100 g produktu]
1	maślanka, 1,5 %	0,04
2	mleko krowie, 2%	0,04
3	mleko kozie	0,04
4	kwaśna śmietana	0,15
5	jogurt naturalny	0,06
6	jogurt z jagodami	0,25
7	ser Gorgonzola	0,54
8	sok jabłkowy	0,27
9	sok pomarańczowy	0,64
10	sok żurawinowy	0,92

lub pirogalol [3]. W wyniku reakcji utlenienia fluorescencja sondy zanika. Po dodaniu substancji o właściwościach antyutleniających do środowiska reakcji, zostaje zahamowany rozkład znacznika fluorescencyjnego i następuje neutralizacja wolnych rodników przez cząsteczki antyutleniacza. Obserwujemy więc wydłużenie czasu indukcji i spadek stałej szybkości reakcji rozkładu sondy. Zdolności antyutleniające wyrażane są poprzez porównanie przebiegu reakcji w obecności próbki z reakcją zachodzącą w obecności wzorcowego antyoksydantu. Jako substancji wzorcowej służącej wyrażeniu zdolności antyutleniającej w jednostkach stężenia najczęściej stosuje się rozpuszczalny w wodzie analog witaminy E – troloks lub kwas galusowy. Metodą tą mierzyć można zdolności antyutleniające zarówno hydrofilowych, jak i lipofilowych antyoksydantów. Ze względu na stosowany detektor fluorescencyjny, metoda charakteryzuje się wysoką czułością i precyzją [41].

#### **Analiza zdolności neutralizacji rodnika hydroksylowego**

Rodnik hydroksylowy ( $\text{OH}\cdot$ ) to obojętna forma jonów wodorotlenkowych ( $\text{OH}^-$ ). Jest on jednym z najbardziej reaktywnych rodników, uczestniczący w procesie peroksydacji lipidów i odpowiadający za powstawanie uszkodzeń w obrębie DNA [29]. Jony żelaza biorą czynny udział w tworzeniu rodnika hydroksylowego w reakcji Fentona. W tej metodzie, w obecności żelaza, obserwuje się zmiany absorbancji związane z dezaktywacją rodnika hydroksylowego przeprowadzaną przez antyoksydanty – kwasy hydroksybenzoesowe, należące do grupy polifenoli [47, 48].

#### **Inne metody**

Wśród innych, dodatkowych metod umożliwiających badanie właściwości antyoksydacyjnych szczepów

probiotycznych wymienić można analizy genetyczne, polegające na badaniu poziomu ekspresji genów kodujących enzymy uczestniczące w zmiataniu wolnych rodników, takie jak SOD czy CAT. Bada się także aktywność tych enzymów, zdolność drobnoustrojów do przeżycia w różnych stężeniach ROS, czy też zdolność do chelatowania metali przejściowych [16, 22, 39, 66].

#### **5. Potencjał antyoksydacyjnych probiotyków**

Pełna charakterystyka drobnoustrojów probiotycznych przeprowadzana jest na początku za pomocą metod *in vitro*, a następnie potwierdzana w doświadczeniach *in vivo*, na odpowiednich modelach zwierzęcych. Taki schemat dotyczy też analizy właściwości antyoksydacyjnych probiotyków. W pierwszych etapach drobnoustroje analizowano za pomocą różnorodnych, opisanych wcześniej metod, a następnie podawano je zwierzętom w odpowiednim dla danego zwierzęcia nośniku, czyli rodzaju żywności. W badaniach *in vitro* analizowano aktywność przeciwutleniającą różnych gatunków drobnoustrojów probiotycznych (choć były to głównie bakterie należące do *Lactobacillus* sp. oraz *Bifidobacterium* sp.) oraz szeroką gamę produktów spożywczych zawierających organizmy probiotyczne.

Przeprowadzono liczne analizy potencjału antyoksydacyjnego drobnoustrojów należących do rodzaju *Bifidobacterium*. Wśród nich przebadano między innymi *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 – jelitowy szczep o udowodnionych właściwościach probiotycznych. Analizowano zarówno potencjał całych, nienaruszonych komórek bakteryjnych (hodowanych w pożywce MRS), jak i tzw. ekstrakty komórkowe – ICFE (*intracellular free extracts*). W obu przypadkach zaobserwowano odpowiednio 32 i 48% inhibicję procesu peroksydacji kwasu linolowego oraz 52 i 42% aktywność zmiatania rodnika DPPH. Dla tych szczepów analizowano także cytotoksyczność N-tlenku 4-nitrochinoliny (4NQO) na komórki jelitowe linii 407. Zaobserwowano 89% zahamowanie toksyczności w hodowli komórek linii 407 w połączeniu z żywymi bakteriami, ale nie zanotowano zmian w przypadku ICFE. Co więcej, hodowla zawierająca  $10^9$  komórek *B. longum* ATCC 15708 powodowała inhibicję procesu peroksydacji lipidów o 16 i 34% odpowiednio dla całych komórek oraz ICFE [38]. Shen i wsp. [61] porównali aktywność antyoksydacyjną supernatantów powstałych po zwirowaniu hodowli, komórek nienaruszonych szczepu *Bifidobacterium animalis* 01 oraz ich ICFE. Zaobserwowali zahamowanie procesu peroksydacji kwasu linolowego o odpowiednio: 30, 41 i 71%. Badacze analizowali także aktywność zmiatania rodnika DPPH, uzyskując najwyższą aktywność dla supernatantu, a najniższą dla komórek w pożywce MRS. Supernatant tego szczepu wykazywał

także 78% aktywność zmiatania rodnika hydroksylowego oraz 86% dla anionorodnika ponadtlennkowego, a wyniki te były wyższe niż w przypadku komórek w pożywce MRS lub ICFE.

Jak wiadomo, żelazo może indukować tworzenie nadtlenu wodoru i rodnika hydroksylowego. W badaniu przeprowadzonym przez Sun i wsp. [62] analizowano przeżywalność różnych bakterii mlekowych z rodzaju *Lactobacillus* w jelitach myszy, w których zwiększono stężenie żelaza. Wykazano, że niektóre szczepy z rodzaju *Lactobacillus* są bardziej odporne na przetrwanie w środowisku o zwiększonej zawartości żelaza, a co za tym idzie na działanie wolnych rodników tlenowych. Pozwala im to jednocześnie na wywieranie niezmiennego, pozytywnego wpływu na ekosystem jelita oraz potencjał redoks w nim panujący. Zaobserwowano, że szczep *L. rhamnosus* GG (LGG) był w stanie przeżyć dłużej w środowisku o wysokim stężeniu nadtlenu wodoru i rodnika hydroksylowego, niż szczepy *L. paracasei* Fn032, czy też *L. plantarum* Fn001. Co więcej, w obecności szczepu LGG obserwowano obniżenie stężenia wolnych rodników oraz aldehydu malonowego (MDA) – produktu procesu peroksydacji lipidów. Szczep *L. plantarum* Fn001 nie wykazywał działania antyoksydacyjnego ani w badaniu *in vivo*, ani *in vitro*, w których symulowano warunki panujące w przewodzie pokarmowym. Obserwowano także, że szczepy o właściwościach antyoksydacyjnych zwiększają swoje zdolności zmiatania wolnych rodników w obecności sztucznego soku żołądkowego i trzustkowego. Inni badacze analizowali 39 szczepów *Lactobacillus* pod kątem ich zdolności do przetrwania w warunkach zwiększonego stężenia ROS. Zaobserwowali, że różne szczepy tego samego gatunku, wyizolowane z jednego środowiska, wykazują odmienną tolerancję na nadtlenek wodoru czy rodnik hydroksylowy. Mogą charakteryzować się różną ekspresją genów kodujących dysmutazę ponadtlennkową i katalazę oraz prowadzić inhibicję peroksydacji kwasu linolowego w różnym stopniu. Na podstawie wyników tego badania, wysunięto wnioski, o zróżnicowanej skuteczności antyoksydacyjnej probiotycznych bakterii z rodzaju *Lactobacillus* [1]. Ciekawym, szybkim i nowatorskim podejściem do analizy właściwości antyoksydacyjnych probiotyków jest wykorzystanie nicienia *Caenorhabditis elegans* jako gospodarza – organizmu modelowego. W tym badaniu Grompone i wsp. [26] przeanalizowali aż kilkadziesiąt różnych bakterii kwasu mlekowego. Wśród nich znalazły się 62 szczepy *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum* oraz *L. rhamnosus*), 9 szczepów *Streptococcus thermophilus* oraz 6 *Bifidobacterium* (*B. animalis*, *B. breve*, *B. longum*). Nicień był karmiony szczepami probiotycznymi, po czym poddawano go ekspozycji  $H_2O_2$ , porównując uzyskane wyniki do efektu protekcyjnego wywieranego przez szczep *Escherichia*

*coli* OP50. Wykazano najwyższą aktywność antyoksydacyjną u szczepu *L. rhamnosus* CNCM I-3690.

W związku z tym, że miedź i żelazo to metale prooksydacyjne, badano zdolności drobnoustrojów probiotycznych do chelatowania tych pierwiastków. Wykazano wysoką zdolność wiązania  $Cu^{2+}$  przez *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* oraz 6 różnych szczepów *Lactobacillus bulgaricus*. W przypadku dwóch szczepów *B. longum* – B6 oraz 15708 zaobserwowano zdolność wiązania zarówno  $Cu^{2+}$ , jak i  $Fe^{2+}$ . Wszystkie badane szczepy nie powodowały inhibicji działania dysmutazy ponadtlennkowej w medium hodowlanym, nawet po dodaniu do niego jonów  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , czy też  $Mn^{2+}$ . Przebadane w tym eksperymencie szczepy probiotyczne prowadziły również do inhibicji utleniania askorbinianu o około 7–12%. Porównywano także zdolności zmiatania rodnika hydroksylowego przez szczepy probiotyczne uzyskując najwyższą zdolność w tym zakresie dla *L. acidophilus* E, a najniższą dla *S. thermophilus* 3641 [39].

Przebadano także zawartość GSH w szczepach probiotycznych i wykazano jego najwyższe stężenie u szczepu *L. casei* HY 2782, po 24 godzinach hodowli, a po 72 wartości malała. Różnice w ilości GSH obserwowano także hodując te same szczepy w różnych pożywkach i tak, zaobserwowano, że probiotyki w typowej dla bakterii LAB pożywce MRS produkują najwięcej tego antyutleniacza, w porównaniu z hodowlą w podłożu Bif-TPY (Bifidobacterium Tryptone Phytone Yeast Extract) lub bulionie BCP (Bromcresol Purple Dextrose Broth). Badacze wykazali także pozytywną korelację pomiędzy stężeniem GSH, a aktywnością antyoksydacyjną badanych komórek [69].

Kim i wsp. [34] analizowali efekt ochronny probiotycznego szczepu *Lactobacillus gasseri* NRI 312 wobec oksydacyjnego uszkodzenia lipidów wchodzących w skład błon komórkowych oraz uszkodzenia DNA, na liniach ludzkich komórek limfocytów T (Jurkat). Wykazali, że po dodaniu bakterii probiotycznych do hodowli komórek obserwuje się zmniejszenie negatywnych skutków wywoływanych przez stres oksydacyjny na błony komórkowe oraz około 50% zahamowanie uszkodzeń w obrębie DNA.

### 5.1. Produkty spożywcze zawierające probiotyki

Celem potwierdzenia właściwości antyoksydacyjnych probiotyków, uzyskanych w badaniach *in vitro*, wykonuje się wiele analiz produktów spożywczych zawierających drobnoustroje probiotyczne.

Przeprowadzono fermentację 3 rodzajów mleka: krowiego, koziego i wielbłądziego uzupełniając próbki o szczep probiotyczny *Pediococcus pentosus* i analizowano właściwości antyoksydacyjne oraz profil kwasów tłuszczowych. Wyniki wykazały, że najwyższy poziom

zmianienia rodnika DPPH' obserwuje się w sfermentowanym mleku kozim (98%), a następnie w produkcji z mleka wielbłądziego (86%) i mleka krowiego (79%) [7]. Przeanalizowano także aktywność antyoksydacyjną dwóch dostępnych na rynku synbiotyków. Jeden z nich skonstruowany był na bazie serwatki i miodu, a drugi zawierał inulinę, sok pomarańczowy i probiotyczny szczep *L. helveticus* MTCC 5463. Oba produkty charakteryzowały się zdolnością zmniejszenia rodnika hydroksylowego, przy czym aktywność ta malała podczas przechowywania produktów w niskich temperaturach (około 4°C) [60]. W innym synbiotyku, w skład którego wchodziły fruktooligosacharydy oraz bakterie *L. plantarum* lub *L. fermentum* zaobserwowano odpowiednio 85 i 82% zdolność zmniejszenia rodnika DPPH', a aktywność ta wzrastała wraz z czasem inkubacji bakterii probiotycznych z fruktooligosacharydami, uzyskując tym samym efekt działania właściwy dla synbiotyku [42]. Inni badacze analizowali zdolności namnażania szczepów probiotycznych należących do *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* w połączeniu z prebiotykami takimi jak: miód, pyłek kwiatowy, inulina, laktuloza oraz rafinoza. Wykazano największy przyrost biomasy bakterii oraz najwyższą aktywność zmniejszenia rodnika DPPH' (45%) po 7 dniach inkubacji w próbce, w której połączono probiotyki z pyłkiem pszczelim i inuliną [64].

## 6. Doświadczenia *in vivo* – modele zwierzęce

Po badaniach *in vitro*, modele zwierzęce są kolejnym etapem wykorzystywanym do analizy konkretnych cech drobnoustrojów probiotycznych, już w odniesieniu do działania na cały organizm. Dopiero pozytywne wyniki uzyskane w badaniach na zwierzętach można przenosić na działanie danego czynnika u ludzi.

Wang i wsp. [16] badali oddziaływanie probiotycznego szczepu *L. fermentum* na świnię. Wykazali, że suplementacja tym drobnoustrojem wspomaga zdrowy wzrost świń poprzez jego wpływ na podniesienie aktywności SOD oraz GPx oraz obniżanie stężenia MDA w surowicy krwi badanych zwierząt. Co więcej zaobserwowano zwiększenie aktywności CAT i spadek stężenia MDA w wątrobie tych zwierząt [66]. W innym badaniu, tym razem przeprowadzonym na szczurach, badano wpływ dwóch szczepów probiotycznych – *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3 oraz A13. Zaobserwowano wzrost poziomu GSH w jelitach szczurów suplementowanych wyżej wymienionymi szczepami. Jednocześnie zaobserwowano zwiększony poziom TBARS – cząsteczek, które podobnie jak ROS powstają w procesie peroksydacji lipidów, ale mają dłuższy okres półtrwania, przez co są łatwiejsze do wykrycia. Tego typu niejednoznaczne wyniki uzyskane w badaniach na zwierzętach wymagają potwierdzenia dalszymi analizami [16]. Jak pokazały

inne badania na szczurach oprócz potencjału antyoksydacyjnego *L. casei* ssp. *casei*, probiotyk ten wykazuje także zdolność obniżania poziomu cholesterolu we krwi. W grupie zwierząt suplementowanych mlekiem fermentowanym, zaobserwowano obniżenie poziomu cholesterolu o 2–11% i o 15–25% w grupie, w której mleko było dodatkowo wzbogacone o liofilizowany szczep *L. casei*. Obserwowano także spadek TBARS u tych zwierząt. Wyniki porównywane były z grupą kontrolną otrzymującą jedynie zwykłe, odtuszczone mleko [32]. W innym badaniu analizowano izolowany z jelita szczura probiotyczny szczep *E. coli* CFR, u którego zaindukowano silny stres oksydacyjny za pomocą DMH (1,2-dimetylohydrazyny), która jest silnym kancerogenem alkilującym DNA. Związek ten jest często używany w badaniach naukowych, między innymi do indukowania nowotworów okrężnicy u zwierząt laboratoryjnych. Stwierdzono, że u zwierząt traktowanych DMH istotnie spadła aktywność enzymów antyoksydacyjnych (SOD, CAT oraz GPx), a także nasilił się proces peroksydacji lipidów w wątrobie i jelitach tych zwierząt. Co najistotniejsze, po doustnej suplementacji szczepem probiotycznym zanotowano zniesienie działania DMH, aktywność enzymów antyoksydacyjnych wzrosła, a proces peroksydacji lipidów w obu analizowanych tkankach utrzymywał się na poziomie bliskim kontroli. Dodatkowo badanie histologiczne wykazało istotny udział ochronny *E. coli* CFR na śluzówkę jelita [53]. W innych badaniach zaobserwowano także, że suplementacja szczepem LGG pomaga zmniejszyć negatywne działanie alkoholu na wątrobę [19].

## 7. Badania kliniczne

Celem potwierdzenia prozdrowotnych właściwości bakterii probiotycznych uzyskanych w badaniach *in vitro* i na modelach zwierzęcych przeprowadzono badania kliniczne z udziałem ludzi (randomizowane z podwójnie ślepą próbą, kontrolą – placebo oraz badaniem naprzemiennym). Analizowano właściwości szczepu *L. fermentum* ME-3. W badaniach udział wzięły zarówno osoby zdrowe, jak i pacjenci z alergiami, czy też po przebyciu udaru. W jednym z badań pacjenci otrzymywali kapsułki probiotyku lub synbiotyku ze szczepem ME-3, sfermentowane kozie mleko lub preparaty spożywcze typu ser lub kefir. Konsumpcja szczepu ME-3 miała pozytywny wpływ na skład mikroflory jelitowej. Zaobserwowano zwiększoną liczebność bakterii należących do *Lactobacillus* w próbkach kału badanych ochotników, co zapewniało im zwiększoną odporność na działanie drobnoustrojów chorobotwórczych. Probiotyk wykazywał pozytywne działanie w odniesieniu do poziomu cytokin we krwi, głównych markerów gospodarki węglowodanowej i lipidowej (glukozy,



trójglicerydów, cholesterolu HDL i LDL), metabolitów takich jak homocysteina, bilirubina czy kreatynina oraz poziomu wapnia i żelaza we krwi [45]. W innym badaniu pacjentom z atopowym zapaleniem skóry (AZS) podawano przez 3 miesiące fermentowane mleko kozie z *L. fermentum* ME-3. Po spożyciu probiotyku zaobserwowano obniżoną zawartość prooksydacyjnego żelaza w formie utlenionej w porównaniu z wartościami przed suplementacją. Stwierdzono także osłabienie procesu peroksydacji lipidów. Suplementacja doprowadziła do wzrostu poziomu GSH w skórze oraz w surowicy krwi tych pacjentów [33]. W innym badaniu pilotażowym analizie poddano 21 chorych po udarze mózgu. Pacjentów losowo podzielono na dwie grupy. W pierwszej, pacjenci oprócz standardowej opieki rehabilitacyjnej otrzymywali przez 3 tygodnie kapsułki z liofilizowanym szczepem ME-3 (3 razy dziennie kapsułka z  $10^9$  cfu/g bakterii). W drugiej grupie pacjenci otrzymywali 3 razy dziennie 250 mg sacharozy i mikrocelulozy, jako grupa kontrolna. Przed i po terapii obserwowano standardowe dla tego typu rekonwalescencji parametry ruchowe pacjentów oraz liczne parametry biochemiczne. Jedynie w grupie otrzymującej suplementację probiotykiem wykryto podwyższenie poziomu GSH oraz istotny spadek wartości markerów stanu zapalnego [33]. Zwiększoną aktywność antyoksydacyjną w organizmie uzyskano także w badaniu klinicznym, w którym 53 zdrowym osobom, przez 3 tygodnie podawano synbiotyki zawierający *L. fermentum* ME-3, *L. paracasei* 8700:2, *Bifidobacterium longum* 46 oraz inulinę [58].

## 8. Mechanizm działania probiotyków jako antyoksydantów

Suplementy diety o działaniu antyoksydacyjnym oraz żywność zawierająca w swoim składzie przeciwutleniające bez wątpienia pozwala zmniejszyć negatywne skutki stresu oksydacyjnego powstającego w ludzkim organizmie. Drobnoustroje probiotyczne, głównie LAB, stają się obiecującymi komponentami, które wykazują działanie antyoksydacyjne w tego typu produktach [34, 40]. Wiele badań dowiodło, że probiotyki zwiększają aktywność enzymów o charakterze antyoksydacyjnym takich jak SOD, GPx, SGT, CAT, GR, podnoszą poziom wspomnianego wcześniej glutationu, czy też chronią komórkę przed uszkodzeniami jakie mogą wywołać czynniki o charakterze rakotwórczym [35]. Antyoksydacyjne działanie probiotyków tłumaczone jest także tym, że drobnoustroje te uczestniczą w odbudowie prawidłowej mikroflory jelitowej, której homeostaza mogła zostać zachwiana na skutek różnych czynników chorobotwórczych [36, 49]. Bakterie kwasu mlekowego posiadają systemy umożliwiające wiązanie ROS powstających w trakcie trawienia spożywanych

pokarmów [31]. Co więcej, mogą one przeprowadzać hydrolizę białek pochodzących z produktów spożywczych, prowadząc do wytworzenia bioaktywnych peptydów o właściwościach antyoksydacyjnych, chroniących przed peroksydacją lipidów błonowych, a tym samym działających ochronnie na struktury komórkowe [2]. Wykazano ponadto, że *Lactobacillus* spp. wykazuje swoje działanie probiotyczne właśnie dzięki zdolności do przetrwania w obecności ROS, co nie jest obserwowane w przypadku innych bakterii jelitowych, np. kilku gatunków *Streptococcus*, wysoce wrażliwych na obecność  $H_2O_2$  [22]. Antyoksydacyjne działanie *L. rhamnosus* GG może opierać się z kolei na hamowaniu wydzielania ROS oraz zwiększaniu żywotności neutrofilii, odpowiedzialnych za reakcję przeciwbakteryjną [65].

## Podsumowanie

Wzrastająca świadomość związana z czynnikami patogenezą wielu chorób, z którymi boryka się ludzkość XXI wieku skłania do poszukiwania mechanizmów umożliwiających przeciwdziałanie tym schorzeniom. Badania ostatnich lat dowiodły, że stres oksydacyjny, wywołany reaktywnymi formami tlenu oraz wolnymi rodnikami, może leżeć u podstaw występowania wielu chorób cywilizacyjnych. Na podstawie tej obserwacji rozpoczęto poszukiwania czynników przeciwdziałających stresowi oksydacyjnemu, czyli różnego rodzaju przeciwutleniaczy/antyoksydantów. Ich obecność wykazano zarówno w wielu produktach pochodzenia roślinnego i zwierzęcego, a niedawno zauważono także ogromny potencjał antyoksydacyjny drobnoustrojów probiotycznych. Wzrost zainteresowania żywnością funkcjonalną, a w szczególności probiotykami idzie w parze ze zwiększonymi nakładami pieniężnymi na badania naukowe skupiające uwagę na tego typu drobnoustrojach i ich funkcjach w przewodzie pokarmowym. Wiele badań koncentruje się na bakteriach obecnych w produktach spożywczych oraz tych, które są częścią naturalnego mikrobiomu przewodu pokarmowego. Analizie poddaje się czynniki odpowiedzialne za kolonizację tych bakterii, ich interakcje z organizmem gospodarza, a od niedawna także ich potencjał antyoksydacyjny. Wykazano, iż dzięki wielorakim mechanizmom, drobnoustroje te wykazują istotne i niepodważalne działanie przeciworodnikowe. Mają zdolność do przetrwania wyższych niż inne mikroorganizmy stężeń reaktywnych form tlenu, przeciwdziałają ich nagromadzeniu poprzez hamowanie kaskad reakcji łańcuchowych, prowadzą do produkcji bioaktywnych związków przeciwdziałających skutkom stresu oksydacyjnego w komórkach lub regulują aktywność enzymów anty- i prooksydacyjnych. Z punktu widzenia nie tylko

tych bakterii, ale wszystkich bytujących w przewodzie pokarmowym wciąż istotne jest projektowanie nowych lub ulepszanie już istniejących narzędzi molekularnych umożliwiających ich dogłębną analizę.

## Piśmiennictwo

- Achuthan A.A., Duary R.K., Madathil A., Panwar H., Kumar H., Batish V.K., Grover S.: Antioxidative potential of lactobacilli isolated from the gut of Indian people. *Mol. Biol. Rep.* **39**, 7887–7897 (2012)
- Ahotupa M., Saxelin M., Korpela R.: Antioxidative properties of *Lactobacillus* GG. *Nutr. Today*, **1**, 51–52 (1996)
- Alarcón E., Campos A.M., Edwards A.M., Lissi E., López-Alarcón C.: Antioxidant capacity of herbal infusions and tea extracts: A comparison of ORAC-fluorescein and ORAC-pyrogallol red methodologies. *Food Chem.* **107**, 1114–1119 (2008)
- Andersson H., Asp N.G., Bruce A., Roos S., Wadstrom T., Wold A.E.: Health effects of probiotics and prebiotics: a literature review on human studies. *Scand. J. Nutr.* **45**, 58–75 (2001)
- Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S., Robards K.: Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, **127**, 183–198 (2002)
- Apak R., Güçlü K., Özyürek M., Çelik S.E.: Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchim. Acta*, **160**, 413–419 (2008)
- Balakrishnan G., Agrawal R.: Antioxidant activity and fatty acid profile of fermented milk prepared by *Pediococcus pentosaceus*. *J. Food Sci. Technol.* DOI: 10.1007/s13197-012-0891-9 (2012)
- Benzie I.F., Strain J.J.: Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.* **299**, 15–27 (1999)
- Benzie I.F., Strain J.J.: The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70–76 (1996)
- Benzie I.F., Szeto Y.T.: Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 633–636 (1999)
- Blois M.S.: Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, **26**, 1199–1200 (1958)
- Brownlee M.: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, **414**, 813–820 (2001)
- Carlsen M.H., Blomhoff R.: The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutr. J.* **9**, 3 (2010)
- Chapman C.M., Gibson G.R., Rowland I.: Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains? *Eur. J. Nutr.* **50**, 1–17, (2011)
- Chong E.S.: A potential role of probiotics in colorectal cancer prevention: review of possible mechanisms of action. *World J. Microbiol. Biotechnol.* DOI: 10.1007/s11274-013-1499-6 (2014)
- Coskun S., Aslim B., Yuksedag Z.N.: Effect of two strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on nitric oxide generation and antioxidant status of rat small intestine. *Med. Chem. Res.* **19**, 1082–1091 (2010)
- Elmastas M., Turkekel I., Ozturk L., Gulcin I., Isildak O., Aboul-Enein H.Y.: The antioxidant activity of two wild edible mushrooms (*Morchella vulgaris* and *Morchella esculanta*). *Comb. Chem. High Throughput Screening*, **9**, 443–448 (2006)
- Floegel A., Kim D., Chung S., Koo S.I., Chun O.K.: Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J. Food Compos. Anal.* **24**, 1043–1048 (2011)
- Forsyth C.B., Farhadi A., Jakate S.M., Tang Y., Shaikh M., Keshavarzian A.: *Lactobacillus* GG treatment ameliorates alcohol-induced intestinal oxidative stress, gut leakiness, and liver injury in a rat model of alcoholic steatohepatitis. *Alcohol*, **43**, 163–172 (2009)
- Foti M.C., Daquino C., Geraci C.: Electron-transfer reaction of cinnamic acid and their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solutions. *J. Org. Chem.* **69**, 2309–2314 (2004)
- Gałecka E., Mrowicka M., Malinowska K., Gałecki P.: Chosen non-enzymatic substances that participate in a protection against overproduction of free radicals. *Pol. Merkur. Lekarski*, **25**, 269–272 (2008)
- Garcia-Mendoza A., Liebana J., Castillo A., de la Higuera A., Gutierrez J.: Post-hydrogen peroxide effect in peroxidogenic oral streptococci. *Microb. Ecol. Health Dis.* **6**, 17–22 (1993)
- Ghasemia K., Ghasemia Y., Ebrahimzadeh M.A.: Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pak. J. Pharm. Sci.* **22**, 277–281 (2009)
- Glazer A.N.: Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. *Methods Enzymol.* **186**, 161–168 (1990)
- Grajek W., Sip A.: Antagonistic activity of probiotics against pathogenic microorganisms. *Zakazenia*, **1**, 49–54 (2006)
- Grompone G., Ramón, D. i wsp.: Antiinflammatory *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690 strain protects against oxidative stress and increases lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*, DOI: 10.1371/journal.pone.0052493 (2012)
- Gulcin I.: Antioxidant activity of L-adrenaline: an activity structure insight. *Chem.-Biol. Interact.* **179**, 71–80 (2009)
- Hairul Islam V.I., Praksh Babu N., Pnadikumar P., Ignacimuthu S.: Isolation and characterization of putative probiotic bacteria strain, *Bacillus amyloliquefaciens*, from North East Himalayan Soil Based on in vitro and in vivo functional properties. *Probiotics & Antimicrob. Prot.* **3**, 175–185 (2011)
- Halliwell B., Chirico S.: Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* **57**, 715–725 (1993)
- Halliwell B., Gutteridge J.M.: The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* **280**, 1–8 (1990)
- Kaizu H., Sasaki M., Nakajama H., Suzuki Y.: Effect of antioxidative lactic acid bacteria on rats fed a diet deficient in vitamin. *J. Dairy Sci.* **76**, 2493–2499 (1993)
- Kapila S., Vibha Sinha P.R.: Antioxidative and hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus casei* ssp. *Casei* (biodefensive properties of lactobacilli). *Indian J. Med. Sci.* **60**, 361–370 (2006)
- Kaur S., Vihalemm T. i wsp.: Successful management of mild atopic dermatitis in adults with probiotics and emollients. *Cent Eur J Med.* **3**, 215–220 (2008)
- Kim H.S., Jeong S.G., Ham J.S., Chae H.S., Lee J.M., Ahn C.N.: Antioxidative and probiotic properties of *Lactobacillus gasseri* NLRI-312 isolated from Korean infant feces. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **19**, 1335–1341 (2006)
- Kumar M., Yadav H. i wsp.: Cancer-preventing attributes of probiotics: an update. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **61**, 473–496 (2010)
- Forsyth C.B., Farhadi A., Jakate S.M., Tang Y., Shaikh M., Keshavarzian, A.: *Lactobacillus* GG treatment ameliorates alcohol-induced intestinal oxidative stress, gut leakiness, and liver injury in a rat model of alcoholic steatohepatitis. *Alcohol*, **43**, 163–172 (2009)
- Libudzisz Z., Klewicka E.: Lactic Acid Bacteria in Probiotics Products. *Zakazenia*, **4**, 57–62 (2006)
- Lin M.Y., Chang F.J.: Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Dig. Dis. Sci.* **45**, 1617–1622 (2000)
- Lin M.Y., Yen C.L.: Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1460–1466 (1999)

40. Liu J., Huang S.S., Zhao Z.: Research on antioxidative capacity of lactic acid bacteria. *China Dairy Ind.* **38**, 38–41 (2010)
41. MacDonald-Wicks L.C., Wood L.G., Garg M.L.: Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. *J. Sci. of Food Agriculture*, **86**, 2046–2056 (2006)
42. Madhu A.N., Amrutha N., Prapulla S.G.: Characterization and antioxidant property of probiotic and synbiotic yogurts. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, **4**, 90–97 (2012)
43. Magalhães L.M., Segundo M.A., Reis S., Lima J.L.F.C.: Automatic method for determination of total antioxidant capacity using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay. *Anal. Chim. Acta*, **558**, 310–318 (2006)
44. Majamaa H., Isolauri E.: Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **99**, 179–185 (1997)
45. Mikelsaar M., Zilmer M.: *Lactobacillus fermentum* ME-3 – an antimicrobial and antioxidative probiotic. *Microb. Ecol. Health Dis.* **21**, 1–27 (2009)
46. Miller N.J., Rice-Evans C.A., Davies M.J., Gopinathan V., Milner A.: A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* **84**, 407–412 (1993)
47. Mishra V., Shah C., Mokashe N., Chavan R., Yadav H., Prajapati J.: Probiotics as potential antioxidants: a systematic review. *J. Agric. Food Chem.* **15**, 3615–3626 (2015)
48. Naczki M., Shahidi F.: Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A*, **1054**, 95–111 (2004)
49. Nardone G., Compare D., Liguori E., Di Mauro V., Rocco A., Barone M., Napoli A., Lapi D., Iovene M.R., Colantuoni A.: Protective effects of *Lactobacillus paracasei* F19 in a rat model of oxidative and metabolic hepatic injury. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **299**, 669–676 (2010)
50. Ono Y., Mizuno K., Takahashi M., Miura Y., Watanabe T.: Suppression of advanced glycation and lipoxidation end products by angiotensin II type-1 receptor blocker candesartan in type 2 diabetic patients with essential hypertension. *Fukushima J. Med. Sci.* **59**, 69–75 (2013)
51. Ou B., Huang D., Woodill-Hampsch M., Flanagan J.A., Deemer E.K.: Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3122–3128 (2002)
52. Pagliaro G., Battimo M.: The use of probiotics in gastrointestinal diseases. *J. Nutr. Metab.* **3**, 105–113 (2010)
53. Pandey S., Singh A., Kumar P., Chaudhari A., Nareshkumar G.: Probiotic *Escherichia coli* CFR 16 producing pyrroloquinoline-quinone (PQQ) ameliorates 1,2-dimethylhydrazine-induced oxidative damage in colon and liver of rats. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **173**, 775–786 (2014)
54. Potargowicz E., Szerszenowicz E.: Polifenole roślinne w kosmetyce. *Pol. J. Cosmetol.* **9**, 70–76 (2006)
55. Puzanowska-Tarasiewicz H., Kuźmicka L., Tarasiewicz M.: Antyoksydanty a reaktywne formy tlenu. *Bromat. Chem. Toksykol.* **1**, 9–14 (2010)
56. Rains J.L., Jain S.K.: Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic. Biol. Med.* **50**, 567–575 (2011)
57. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C.: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* **26**, 1231–1237 (1999)
58. Saulnier D.M.A., Hutt P., Mikelsaar M., Bosscher D., Gibson G., Kolida S.: Effects of a symbiotic on biomarkers of oxidative stress and fecal microbiota in healthy adults: results of a cross-over double-blind placebo controlled trial. *Proc. Nutr Soc.* **66**, 101A (2007)
59. Schrezenmeir J., de Vrese M.: Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* **111**, 1–66 (2008)
60. Shah C., Mokashe N., Mishra V.: Preparation, characterization and *in vitro* antioxidative potential of synbiotic fermented dairy products. *J. Food Sci. Technol.* DOI: 10.1007/s13197-014-14917 (2014)
61. Shen Q., Shang N., Li P.: *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of *Bifidobacterium animalis* 01 isolated from centenarians. *Curr. Microbiol.* **62**, 1097–1103 (2011)
62. Sun J., Hu X.L., Le G.W., Shi Y.H.: Inhibition of Fe-induced colon oxidative stress by lactobacilli in mice. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 209–216 (2013)
63. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J.: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 44–84 (2007)
64. Vamanu E., Vamanu A., Popa O., Babeanu N.: The antioxidant effect of a functional product based on probiotic biomass, pollen and honey. *Anim. Sci. Biotechnol.* **43**, 331–336 (2010)
65. Vong L., Loretz R.J., Assa A., Glogauer M., Sherman P.M.: Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* inhibits the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Immunol.* **192**, 1870–1877 (2014)
66. Wang A.N., Yi X.W., Yu H.F., Dong B., Qiao S.Y.: Free radical scavenging activity of *Lactobacillus fermentum* *in vitro* and its antioxidative effect on growing-finishing pigs. *J. Appl. Microbiol.* **107**, 1140–1148 (2009)
67. Whitehead T.P., Thorpe G.H.G., Maxwell S.R.J.: Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids. *Anal. Chim. Acta*, **266**, 265–277 (1992)
68. Włochal M., Grzymisławski M., Bogdański P.: Możliwości wykorzystania żywności funkcjonalnej w leczeniu otyłości. *Forum Zab. Metabol.* **5**, 51–62 (2014)
69. Yoon Y.H., Byun J.R.: Occurrence of glutathione sulfhydryl (GHS) and antioxidant activities in probiotic *Lactobacillus* spp. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **17**, 1582–1585 (2004)
70. Zern T.L., Fernandez M.L.: Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *J. Nutr.* **135**: 2291–2294 (2005)

Marta Siebyła<sup>1\*</sup>, Dorota Hilszczańska<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Ochrony Lasu, Instytut Badawczy Leśnictwa

<sup>2</sup>Zakład Ekologii Lasu, Instytut Badawczy Leśnictwa

Wpłynęło w czerwcu 2016 r.

Zaakceptowano we wrześniu 2016 r.

1. Charakterystyka trufli. 2. Różnorodność gatunkowa bakterii. 3. Podsumowanie

#### Species diversity of bacteria associated with fungi of the genus *Tuber* (truffles)

**Abstract:** Truffles (*Tuber* spp.) are ascomycete hypogeous fungi, which form ectomycorrhizae with roots of trees, shrubs and herbaceous plants. Their fruiting bodies are valued for their distinctive aroma. The aroma might be partially due to complex bacterial community which colonizes their fruiting bodies. Some bacterial species are also believed to promote the truffle's fruitification due to the fixation of nitrogen inside the developing truffles. Although truffles, especially of the species *Tuber aestivum*, are getting more popular and are widely cultivated, little is still known about their biology, composition and the role of their associative microbes. The aim of this study was to present the current knowledge about the bacterial communities associated with black truffles and their potential influence on the truffle life cycle and maturation.

1. Characteristics of truffles. 2. Diversity of bacterial species. 3. Conclusion

**Słowa kluczowe:** owocnikowanie, społeczność bakteryjna, trufle

**Key words:** fructification bodies, bacterial community, truffles

## 1. Charakterystyka trufli

Trufle należą do grzybów charakteryzujących się podziemnym, hypogeicznym trybem życia. Tworzą symbiozę o charakterze mutualistycznym z wieloma gatunkami drzew leśnych, m.in. dębem, bukiem, lipą, grabem i leszczyną [36]. Ta symbioza, nazywana ektomykoryzą, jest typowa dla drzew leśnych strefy borealnej i umiarkowanej. Pełni niezwykle ważną rolę, warunkując prawidłowy status zdrowotny i pokarmowy roślin [7, 17, 22]. Trufle (*Tuber* spp.) jako naturalny komponent ekosystemów leśnych występują w Europie, Ameryce Północnej i Azji [6]. Trufle należące do workowców nazywane są truflami prawdziwymi. Według bardziej dokładnej definicji (opisu taksonomicznego) prawdziwe trufle obejmują tylko rodzaj *Tuber*, w którym znajduje się trufia perigordzka (*T. melanosporum*), nazywana też „czarnym diamentem”, trufia zimowa (*T. brumale*) i trufia letnia (*T. aestivum*). Ta ostatnia posiada czarne perydium, składające się z 4–6-kątnych, płaskich i ściśle do siebie przylegających brodawek (Rys. 1). Do rodzaju *Tuber* należą także gatunki o białym, gładkim perydium, np. biała trufia piemoncka (*T. magnatum*) oraz trufia biaława (*T. borchii*) [21]. Wysoka wartość kulinarna i handlowa trufli jest efektem charakterystycznego zapachu owocników [18]. Wśród trufli tylko kilka gatunków przedstawia wysoką wartość kulinarną wynikającą z właściwości smakowo-zapachowych. Trufia letnia zwana też truflą burgundzką (*Tuber aestivum*)

jest jednym z cenionych gatunków, a ponadto charakteryzuje się największym zasięgiem występowania na obszarze Europy [15, 21]. Wartość handlowa trufli jest zachętą do zakładania upraw truflowych, które zyskują coraz większą popularność w krajach, do tej pory nie związanych z uprawą tych grzybów, takich jak: Wielka Brytania, Szwecja i Polska [14–16, 29, 34]. Plon trufli jest ściśle związany z warunkami klimatycznymi i glebowymi, szczególnie jej strukturą, odczynem i zasobnością w kationy wapnia [8, 20]. Niemniej, wiele innych czynników kształtujących plonowanie trufli pozostaje nierozpoznane. Są to głównie czynniki biotyczne, takie jak fizjologia roślin i interakcje z innymi grzybami zasiedlającymi glebę oraz bakteriami [1].

Trufle, we wszystkich stadiach ich cyklu życiowego, są kolonizowane przez różnorakie mikroorganizmy: bakterie, drożdże, grzyby strzępkowe i wirusy. Drobnoustroje występują w stadium symbiotycznym, gdy grzyb pozostaje w związku z rośliną (ektomykoryza), w stadium seksualnym (owocniki) (Rys. 1) oraz w stadium saprotroficznym (wolno żyjąca grzybnia). Jak dotąd najlepiej rozpoznano zbiorowiska mikroorganizmów zasiedlające owocniki czterech najbardziej cenionych kulinarnie, a tym samym ekonomicznie, gatunków trufli: trufli białej (*T. magnatum*), trufli białawej (*T. borchii*), trufli perigordzkiej (*T. melanosporum*) i trufli letniej (*T. aestivum*).

Celem pracy jest przedstawienie wiedzy (na podstawie danych literaturowych) na temat zbiorowisk

\* Autor korespondencyjny: Zakład Ochrony Lasu, Instytut Badawczy Leśnictwa, Sękocin Stary, ul. Braci Leśnej 3, 05-090 Raszyn; tel. 22 715 06 67; e-mail: m.siebyla@ibles.waw.pl



Rys. 1. Owocniki trufli letniej *Tuber aestivum*\*  
(fot. Zbigniew Sierota)

bakterii związanych z truflami i ich potencjalnej roli w tworzeniu specyficznego aromatu tych grzybów. Lotne związki zapachowe wydzielane przez trufle stały się przedmiotem wielu badań, przy czym uwagę poświęcano głównie tym gatunkom trufli, które charakteryzują się dużą wartością rynkową, tj. wspomnianym już: *T. melanosporum*, *T. magnatum*, *T. borchii*, *T. aestivum* [11, 13, 26, 27, 31–33]. Stężenie substancji zapachowych może się zmieniać wraz ze stadium rozwojowym owocnika trufli [19, 37]. Obecnie szacuje się, że występuje ponad 300 lotnych związków chemicznych wytwarzanych przez różne gatunki trufli [28, 29]. Zidentyfikowane związki należą do prostych węglowodorów, zawierających grupy alkoholowe, aldehydowe, estrowe, ketonowe, aromatyczne i siarkowe. Wciąż jednak nie ustalono pełnego profilu aromatycznego charakterystycznego dla trufli. Poznanie roli jaką w procesie tworzenia zapachu odgrywają mikroorganizmy zasiedlające trufle przyczyniłoby się zapewne do wypełnienia tej luki w naszej wiedzy [35]. Wydaje się, że substancje zapachowe powstają dzięki kooperacji grzybów i bakterii, i są ich wspólnym dziełem [35]. Wyjaśnienie szlaku biosyntezy poszczególnych substancji zapachowych pozwoli na identyfikację tego gatunku bakterii, który dany zapach wytwarza. W tym aspekcie, obiecujące wydaje się wykorzystanie innowacyjnych technik, np. czujnika nazywanego „nosem elektronicznym (EN)”, reagującego na zmiany stężenia aromatu. Próby zastosowania elektronicznego nosa do wykrywania trufli podjęto we Francji w latach 80. ubiegłego wieku [32]. W 2000 r. Raynaud i współpracownicy [23] opisali ich wyniki pracy nad przenośnym urządzeniem, dzięki któremu zidentyfikowano zapach trufli czarnej, znajdującej się wśród owocników innych gatunków trufli. Falasconi i współpracownicy [12] połączyli technikę zastosowaną w elektronicznym nosie (Pico2-electronic nose) z metodą SPME-GC-MS,

co pozwoliło na określenie zmian zapachu białej trufli (*T. magnatum* Pico) wraz upływem czasu od terminu zbioru. Elektroniczny nos jest zdolny wychwycić zapach trufli na podstawie substancji lotnych emitowanych z bardzo małej próbki tj. ok. 10 mg owocnika. Wyniki wymienionych prac są obiecujące i wydaje się, że połączenie techniki zastosowanej w EN z innymi analitycznymi metodami ułatwiłoby pozyskiwanie truflii kontrolę jej jakości.

## 2. Zbiorowisko bakterii

Bakterie zasiedlają zarówno wewnętrzną jak i zewnętrzną część owocników trufli (Tab. I), a ich zagęszczenie może wynosić od miliona do biliona komórek na gram suchej masy owocnika [3, 4, 21]. Skład zbiorowiska bakterii związany jest z dojrzewaniem owocnika, starzeniem się, etapem cyklu życiowego (np. mykoryza a owocnik) oraz rodzajem tkanki (gleba, zarodnikonośna warstwa owocnika a perydium, warstwą zewnętrzną owocnika).

Z dotychczasowych badań przeprowadzonych przez Antony-Babu i wsp. [1] wynika, że wszystkie analizowane do tej pory owocniki trufli są zasiedlane przez zbiorowiska bakterii, w których skład wchodzi przedstawiciele *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* i *Actinobacteria* [10, 20]. W owocnikach wszystkich badanych gatunków trufli stwierdzono dominację  $\alpha$ -*Proteobacteria* i niskie zagęszczenie *Firmicutes* oraz *Actinobacteria*. Stwierdzono natomiast większą różnorodność  $\beta$ - i  $\gamma$ -*Proteobacteria* oraz *Bacteroidetes* u trufli białawej (*T. borchii*) w porównaniu z truflą perigordzką (*T. melanosporum*) i białą (*T. magnatum*). Odnotowano, że izolat *Bacterioides* może koegzystować wewnątrz grzybni *T. borchii*, rosnącej w warunkach laboratoryjnych [2], co wskazuje na ścisłą zależność bakterii i trufli. W przypadku innych, badanych gatunków trufli, jak dotąd, nie wykazano obecności endosymbionta.

Skład różnorodności gatunkowej bakterii obecnych na okrywie (perydium) i we wnętrzu owocnika trufli może się zmieniać w czasie i jest zależny od fizjologii rośliny będącej gospodarzem trufli. Jednym z ważniejszych czynników jest stopień przekazywania węglowodanów do grzybni regulowany m.in. warunkami pogodowymi (Rys. 2). Podczas dojrzewania owocnika trufli zmienia się barwa gleby (wewnętrznej warstwy owocnika), następuje jej ciemnienie (melanizacja), które jest wynikiem tworzenia i dojrzewania zarodników we wnętrzu worków (Rys. 2). Proces dojrzewania owocników trufli rosnących w Europie trwa na ogół kilka miesięcy. Zmiany różnorodności gatunkowej bakterii wraz z dojrzewaniem owocników ma inny przebieg w glebie owocnika i w jego perydium. Mikroflora bakteryjna oznaczana w perydium ma bardzo zbliżony

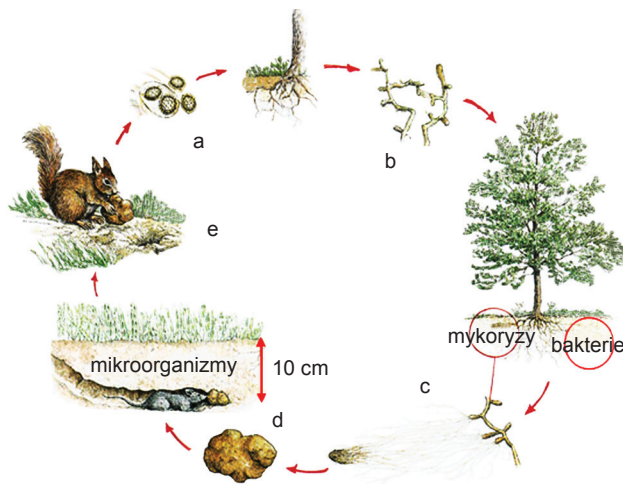
\* Fotografia w artykule pt.: „Owocniki trufli letniej *Tuber aestivum*” została umieszczona za zgodą autora prof. dr. hab. Zbigniewa Sieroty.

Tabela I  
Różnorodność gatunkowa bakterii związanych z truflami

Nr	Pobrano materiał	Badana tkanka	Baza danych – GenBank	Rodzaj
1	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	AY599740, AY599742	<i>Actinobacterium</i>
2	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	AY599743 – AY599745	<i>Bacillus</i>
3	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	AY599734	<i>Beta-proteobacterium</i>
4	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	KC618437, KC618438	<i>Brochothrix</i>
5	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	AY599653 – AY599655 KC618434	<i>Chryseobacterium</i>
6	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	KC618439, KC618440	<i>Comamonas</i>
7	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	AY599656, AY599666	<i>Flavobacterium</i>
8	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	KC618433	<i>Microbacterium</i>
9	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	AY599662 – AY599664	<i>Pedobacter</i>
10	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	AY599711 – AY599713, AY599703, AY599715 AY599717 – AY599722, KC618442, KC618443	<i>Pseudomonas</i>
11	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	AY599702	<i>Rhizobium</i>
12	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	KC618441	<i>Serratia</i>
13	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	AY599691 – AY599694	<i>Sinorhizobium</i>
14	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	KC618435, KC618436	<i>Sphingobacterium</i>
15	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	KC618444, KC618445, AY599705	<i>Stenotrophomonas</i>
16	<i>Tuber borchii</i>	fungal ascocarp	AY599706	<i>Xanthomonas</i>
17	<i>Tuber borchii</i>	–	AF274244, AF274246 – AF274248	<i>Bacillus</i>
18	<i>Tuber borchii</i>	–	AF274245	<i>Paenibacillus</i>
19	<i>Tuber borchii</i>	–	AF274240 – AF274243	<i>Pseudomonas</i>
20	<i>Tuber borchii</i>	–	AY505130 – AY505141	<i>Sinorhizobium</i>
21	<i>Tuber borchii</i>	–	AF532915 – AF532917	<i>Staphylococcus</i>
22	<i>Tuber aestivum</i>	ectomycorrhizae	JX123892	<i>Bosea</i>
23	<i>Tuber aestivum</i>	ectomycorrhizae	JX123954	<i>Ensifer</i>
24	<i>Tuber aestivum</i>	ectomycorrhizae	JX123868	<i>Kocuria</i>
25	<i>Tuber aestivum</i>	ectomycorrhizae	JX123902 JX123903 JX123940	<i>Lysobacter</i>
26	<i>Tuber aestivum</i>	ectomycorrhizae	JX123893	<i>Microbacterium</i>
27	<i>Tuber aestivum</i>	ectomycorrhizae	JX123915 JX123874 JX123875	<i>Micromonospora</i>
28	<i>Tuber aestivum</i>	ectomycorrhizae	JX123909	<i>Moraxella</i>
29	<i>Tuber aestivum</i>	ectomycorrhizae	JX123878	<i>Nocardia</i>
30	<i>Tuber aestivum</i>	ectomycorrhizae	JX123883	<i>Nocardiopsis</i>
31	<i>Tuber aestivum</i>	ectomycorrhizae	JX123913, JX123914, JX123916 JX123925 – JX123927, JX123929, JX123933 JX123935, JX123942, JX123943, JX 123945 JX123952, JX123953, JX123955, JX123956 JX123872, JX123876, JX123886, JX123889 JX123894, JX123896, JX123898	<i>Phyllobacterium</i>
32	<i>Tuber aestivum</i>	ectomycorrhizae	JX123873, JX123890 JX123895, JX123919 JX123932, JX123941	<i>Rhizobium</i>
33	<i>Tuber aestivum</i>	ectomycorrhizae	JX123939	<i>Rhodococcus</i>
34	<i>Tuber aestivum</i>	ectomycorrhizae	JX123881	<i>Rothia</i>
35	<i>Tuber aestivum</i>	ectomycorrhizae	JX123869 – JX123871, JX123877, JX123879 JX123880, JX123882, JX123884, JX123885 JX123887, JX123888, JX123891, JX123897 JX123910 – X123912, JX123917, JX123918 JX123920, JX123921, JX123922, JX123923 JX123924, JX123928, JX123930, JX123931 JX123934, JX123936, JX123937, JX123938 JX123944, JX123946, JX123948, JX123949 JX123950, JX123951, JX123899 – JX123901 JX123904, JX123905, JX123907, JX123908	<i>Streptomyces</i>
36	<i>Tuber aestivum</i>	–	JX123867	<i>Streptomyces</i>

Źródło: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

\* brak danych odnośnie do bakterii zasiedlających inne niż *T. borchii* i *T. aestivum* gatunki trufl



Rys. 2. Cykl rozwojowy trufla

Haploidalna grzybnia (typ MAT<sup>-</sup> lub MAT<sup>+</sup>) kiełkuje z zarodników (a). Mycelium kolonizuje korzenie dając początek ektomykoryzie. Strzępki oplatają korzenie roślin tworząc muflę i wnikają do wnętrza tkanek przez przestwory międzykomórkowe, tworząc sieć Hartiga. Grzybnia kolonizuje glebę (b). Rezultatem połączenia dwóch typów grzybni jest powstanie owocników, w pierwszej fazie rozwoju określanych jako *primordium* (c). We wnętrzu owocnika, dikariotyczne tkanki grzybni wytwarzają worki, w których dochodzi do procesów kariogamii oraz mejozy i powstaje dojrzały owocnik (d). Ostatecznie, w workach powstają haploidalne zarodniki, których głównym wektorem są ssaki i owady mykofagiczne (e) [29, 30].

skład do tej, która występuje w glebie otaczającej młode owocniki, jednak wyraźnie różny od zbiorowiska gleby otaczającej dojrzałe owocniki. Różnice obserwowane w składzie ilościowym bakterii w perydium związane są głównie z postępującym wzrostem liczebności *Bacteroidetes* i  $\alpha$ -*Proteobacteria* a zmniejszaniem się liczebności  $\beta$ -*Proteobacteria*. Z kolei zbiorowiska bakterii obecne w glebie (warstwa zarodnikonośna) od wczesnej fazy rozwoju owocników są zdominowane przez przedstawicieli  $\alpha$ -*Proteobacteria*. Ich dominacja utrzymuje się wraz z dojrzewaniem owocników, podobnie jak ma to miejsce w przypadku perydium. Uzyskane obserwacje skłoniły autorów [1] do zaproponowania wniosku, że bakterie glebowe kolonizują owocniki trufla w najwcześniejszej fazie ich rozwoju, zanim nastąpi zróżnicowanie tkanek owocnika na warstwę zewnętrzną i wewnętrzną. Następnie bakterie znajdujące się w warstwie zarodnikonośnej owocnika zostają w niej uwięzione i częściowo izolowane od gleby przez brodawkowate perydium. Z powodu takiego podziału zbiorowisk bakterii w owocniku ich skład zależy przede wszystkim od zmian w fizjologii dojrzewającego owocnika [1].

Zmiany w składzie zbiorowiska bakterii związanego z truflami może wywoływać także ich zbiór. Czynność ta powoduje zmiany parametrów fizykochemicznych gleby w której rosną, takich jak temperatury i zawartości CO<sub>2</sub> [24]. Dla przykładu, u owocników *T. borchii* liczba bakterii reprezentujących  $\alpha$ - i  $\beta$ -*Proteobacteria* jest wyższa w chwili ich zbioru niż u tych samych owocników przechowywanych w laboratorium i analizowanych sześć dni później [25].

Nie tylko stadium dojrzałości owocnika wpływa na skład zbiorowiska bakterii, ale również stadium cyklu rozwojowego grzyba. Porównanie bakterii obecnych na owocnikach *T. melanosporum* i na mykoryzach wykazało ogromne różnice w składzie tych dwóch zbiorowisk. Bakterie zatem odnajdują odmienne warunki do wzrostu w różnych elementach morfologii grzyba. Dla przykładu, z ektomykoryzami *T. melanosporum* związana jest klasa bakterii należąca do *Actinobacteria*, natomiast ich liczebność na owocnikach jest niewielka [1]. Bakterie należące do kilku rodzajów *Actinobacteria* szczególnie liczne są w ogrodach truflowych *T. melanosporum* w strefie wokół sadzonek inokulowanych tym grzybem i nazywanych „brule” (okręgi wypalonej ziemi), charakteryzujących się obfitością grzybni trufla [29].

Z dotychczasowych badań wynika, że niezależnie od gatunku trufla, podstawowym komponentem bakteryjnym są bakterie należące do rodzin *Bradyrhizobiaceae* i *Rhizobiaceae*, należące do  $\alpha$ -*Proteobacteria*. Nieznane są wciąż czynniki decydujące o takim stanie zbiorowisk bakterii. Hipoteza, że trufile są więcej niż tylko siedliskiem dla bakterii wydaje się kusząca. Nie można wykluczyć mutualistycznych interakcji między grzybami i zasiedlającymi je mikroorganizmami. Znane są bowiem zdolności bakterii należących do *Rhizobiales*, do przyswajania azotu, zarówno gdy występują jako wolno żyjące organizmy lub w symbiozie z rośliną [9]. Wiązanie azotu wewnątrz owocników trufla białej (*T. magnatum*) zostało wykazane przez Barbieri i współautorów [5]. Geny różnych gatunków bakterii odpowiedzialne za ten proces stwierdzono także w owocnikach trufla perigordzkiej (*T. melanosporum*) [1]. Być może część azotu, którą zgromadziły bakterie jest wykorzystywana przez gospodarza, w tym przypadku truflę.

### 3. Podsumowanie

Poznanie roli bakterii w rozwoju trufla pozwoli na czynną ochronę tych grzybów oraz na możliwości gospodarowania terenami leśnymi i rolniczymi. Stosowane obecnie w nauce dynamicznie rozwijające się metody molekularne pozwalają na szczegółowe poznanie składu zbiorowisk mikroorganizmów zasiedlających gleby, w tym gleby sprzyjające rozwojowi trufla. Dzięki analizom DNA zdołano zidentyfikować niektóre gatunki bakterii występujące u dwóch gatunków trufla, tj. *T. borchii* i *T. aestivum* (Tab. I). Identyfikacja bakterii promujących tworzenie się owocników *Tuber* spp. ma szczególne znaczenie dla ochrony *ex situ* tych cennych grzybów poprzez zakładanie i prowadzenie upraw truflowych. Wymiernym efektem tej wiedzy może być również stworzenie szczepionek bakteryjnych stymulujących plonowanie trufla i/lub chroniących ją przed atakiem patogenów glebowych.

## Piśmiennictwo

- Antony-Babu S., Deveau A., Van Nostrand J.D., Zhou J., Le Tacon F., Robin C., Frey-Klett P., Uroz S.: Black truffle-associated bacterial communities during the development and maturation of *Tuber melanosporum* ascocarps and putative functional roles. *Environ. Microbiol.* **16**, 2831–2847 (2014)
- Barbieri E., Potenza L., Rossi I., Sisti D., Giomaro G., Rossetti S., Beimfohr C., Stocchi V.: Phylogenetic characterization and in situ detection of a *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* phylogroup bacterium in *Tuber borchii* Vittad. ectomycorrhizal mycelium. *Appl. Environ. Microb.* **66**, 5035–5042 (2000)
- Barbieri E., Bertini L., Rossi I., Ceccaroli P., Saltarelli R., Guidi C., Zambonelli A., Stocchi V.: New evidence for bacterial diversity in the ascoma of the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii*. *FEMS Microbiol. Lett.* **247**, 23–35 (2005)
- Barbieri E., Guidi C., Bertaux J., Frey-Klett P., Garbaye J., Ceccaroli P., Saltarelli R., Zambonelli A., Stocchi V.: Occurrence and diversity of bacterial communities in *Tuber magnatum* during truffle maturation. *Environ. Microbiol.* **9**, 2234–2246 (2007)
- Barbieri E., Stocchi V., et al.: New evidence for nitrogen fixation within the Italian white truffle *Tuber magnatum*. *Fungal Biol.* **114**, 936–942 (2010)
- Blom D., Fabbri C., Connor E.C., Schiestl F.P., Klauser D.R., Boller T., Eberl L., Weiskopf, L.: Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. *Environ. Microbiol.* **13**, 3047–3058 (2011)
- Bonito G., Trappe J.M., Donovan S., Vilgalys R.: The Asian black truffle *Tuber indicum* can form ectomycorrhizas with North American host plants and complete its life cycle in non-native soils. *Fungal Ecol.* DOI:10.1016/j.funeco.201.08.003 (2008)
- Buscot F., Munch J.C., Charcosset J.Y., Gardes M., Nehls U., Hampp R.: Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 601–614 (2000)
- Callot G.: La truffe, la terre, la vie. INRA Editions, Paris (1999)
- Carvalho F.M., Souza R.C., Barcellos F.G., Hungria M., Vasconcelos A.T.R.: Genomic and evolutionary comparisons of diazotrophic and pathogenic bacteria of the order *Rhizobiales*. *BMC microbiol.* **10**, 1 (2010)
- Claus R., Hoppe H.O., Karg H.: The secret of truffle: a steroidal pheromone? *Experientia*, **37**, 1178–1179 (1981)
- Falascioni M., Pardo M., Sberveglieri G., Battistutta F., Piloni M., Zironi R.: Study of white truffle aging with SPME-GC-MS and the Pico2-electronic nose. *Sens. Actuators. B Chem.* **106**, 88–94 (2005)
- Flament I., Chevalier G., Debonneville C.: Analysis of the volatile flavor constituents of Périgord black truffle (*Tuber melanosporum* Vitt.). *Riv. Ital. EPPOS.* **9**, 280–299 (1990)
- Gryndler M., Soukupová L., Hřšelová H., Gryndlerová H., Boro- vička J., Streiblová E., Jansa J.: A quest for indigenous truffle helper prokaryotes: *Tuber aestivum*-associative prokaryotes. *Environ. Microbiol. Rep.* **5**, 346–352 (2013)
- Hilszczańska D.: Propozycja mikoryzacji sadzonek drzew leśnych z udziałem trufli letniej (*Tuber aestivum*) w Polsce. *Sylwan*, **153**, 281–286 (2009)
- Hilszczańska D., Rosa-Gruszecka A., Szmidla H.: Characteristic of *Tuber* spp. localities in natural stands with emphasis on plant species composition. *Acta Mycol.* **49**, 267–277 (2014)
- Hilszczańska D.: Popularyzacja upraw trufli letniej i zagospodarowania terenów nieleśnych. Studia i Materiały CEPL w Rogowie R. 17. Zeszyt **44** /3 s. 119–129 (2015)
- Martin F., Duplessis S., Ditengou F., Lagrange H., Voiblet C., Lapeyrie F.: Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes. *New Phytol.* **151**, 145–154 (2001)
- Mauriello G., Marino R., D'Auria M., Cerone G., Rana G.L.: Determination of volatile organic compounds from truffles via SPME-GC-MS. *J. Chromatogr. Sci.* **42**, 299–305 (2004)
- Mello A., Murat C., Bonfante P.: Truffles: much more than a prized and local fungal delicacy. *FEMS Microbiol. Lett.* **260**, 1–8 (2006)
- Olivier J., Savignac J., Sourzat P.: Truffe et Trufficulture. Péri-gueux, France: FANLAC (2012)
- Pacioni G., Comandini O.: *Tuber* (w) Ectomycorrhizal Fungi Key Genera in Profile, red. J.W.G. Cairney, S.M. Chambers, Springer, Berlin Heidelberg, 1999, s. 163–186
- Raynaud M., Doumenc-Faure P.J., Pébeyre T. Talou. Investigation of the use of a portable electronic nose device in the truffle industry, in: J.W. Gardner, K.C. Persaud (Eds.), Electronic nose and Olfaction 2000. 1 253–256, Sensors Series (2000), pp. 253–256
- Read D.J.: Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia*, **47**, 376–391 (1991)
- Rivera C.S., Blanco D., Oria R., Venturini M.E.: Diversity of culturable microorganisms and occurrence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. In *Tuber aestivum* and *Tuber melanosporum* ascocarps. *Food Microbiol.* **27**, 286–293 (2010)
- Rossi S.: Tartufi. Frutti della terra, figli degli dei. Series: I preziosi della gastronomia. SAGEP 2011
- Rubini A., Belfiori B., Riccioni C., Paolucci F.: Genomics of *Tuber melanosporum*: new knowledge concerning reproductive biology, symbiosis, and aroma production. W: Edible ectomycorrhizal mushrooms, current knowledge and future prospects. red. A. Zambonelli, G.M. Bonito, Soil Biol. 34, Springer-Verlag, Berlin: 57–72 (2012)
- Splivallo R., Bossi S., Maffei M., Bonfante P.: Discrimination of truffle fruiting body versus mycelial aromas by stir bar sorptive extraction. *Phytochem.* **68** p. 2584 (2007)
- Splivallo R., Deveau A., Valdez N., Kirchhoff N., Frey-Klett P., Karlovsky P.: Bacteria associated with truffle-fruiting bodies contribute to truffle aroma. *Environ. Microbiol.* DOI: 10.1111/1462-2920.12521 (2014)
- Suz L.M., Martin M.P., Oliach D., Fischer C.R., Colinas C.: Mycelial abundance and other factors related to truffle productivity in *Tuber melanosporum* – *Quercus ilex* orchards. *FEMS Microbiol. Lett.* **285**, 72–78 (2008)
- Talou T., Delmas M., Gaset A.: Principal constituents of black truffle (*Tuber melanosporum*) aroma. *J. Agric. Food Chem.* **35**, 774–777 (1987)
- Talou T., Delmas M., Gaset A.: Analysis of headspace volatiles from entire black truffle (*Tuber melanosporum*). *J. Sci. Food Agric.* **48**, 57–62 (1989)
- Talou T., Delmas M., Gaset A.: Direct Capture of Volatiles Emitted from entire black Périgord truffle. *J. Ess. Oil Res.* **1**, 281–286 (1989)
- Thomas P.: The role of pH in *Tuber aestivum* syn. *uncinatum* mycorrhiza development within commercial orchards. *Acta Mycol.* **47**, 161–167 (2012)
- Vahdatzadeh M., Deveau A., Splivallo R.: The role of the microbiome of truffles in aroma formation: a meta-analysis approach. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 6946–6952 (2015)
- Wedén C., Pettersson L., Danell E.: Truffle cultivation in Sweden: results from *Quercus robur* and *Corylus avellana* field trials on the island of Gotland. *Scand. J. Forest Res.* **24**, 37–53 (2009)
- Zeppa S., Gioacchini A.M., Guidi C., Guescini M., Pierleoni R., Zambonelli A., Stocchi V.: Determination of specific volatile organic compounds synthesized during *Tuber borchii* Fruit body development by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. Rapid communication in mass spectrometry **18**, 199–205 (2004)



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

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

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

Wpłynęło w czerwcu 2016 r.

Zaakceptowano we wrześniu 2016 r.

1. Wprowadzenie 2. Mikrobiom skóry 3. Mikrobiom jamy ustnej 4. Mikrobiom przewodu pokarmowego 5. Mikrobiom dróg oddechowych 6. Mikrobiom układu moczowo-płciowego 7. Podsumowanie

### The human microbiome

**Abstract:** The human microbiome is represented by bacteria, archaea, viruses, including bacteriophages, and fungi. These microorganisms colonize the human body and are necessary for the maintenance of homeostasis, including human immune status. Even though human microbiome is vital for the functioning of the human organism, it is still poorly understood, especially when it comes to archaea, but also viruses and fungi. The aim of this study is to present the current state of knowledge about the microorganisms inhabiting essential biotypes of the human body, i.e. the skin, the mouth and the digestive tract, as well as the respiratory and urogenital tract.

1. Introduction. 2. The skin microbiome. 3. The oral microbiome. 4. The digestive tract microbiome. 5. The respiratory tract microbiome. 6. The urinary tract microbiome. 7. Summary

**Słowa kluczowe:** archaea, bakterie, grzyby, mikrobiom, wirusy

**Key words:** archaea, bacteria, fungi, microbiome, viruses

## 1. Wprowadzenie

Ludzki organizm zasiedlany jest przez zróżnicowane drobnoustroje należące do trzech głównych domen: bakterii, archea i eukariota, które stanowią mikrobiom człowieka i są one konieczne do prawidłowego funkcjonowania makroorganizmu, w tym utrzymania jego statusu odpornościowego [4, 21]. Wśród nich są nie tylko drobnoustroje komensalne i symbiotyczne występujące na skórze, w jamie ustnej, przewodzie pokarmowym, oraz w układzie oddechowym i moczowo-płciowym, ale i te, które wywołują stany patologiczne, w tym choroby zakaźne [71]. Termin „mikrobiom” po raz pierwszy został użyty przez laureata nagrody Nobla Joshua Lederberga, który sugerował aby używać go do określenia zbiorowego genomu wszystkich drobnoustrojów komensalnych, symbiotycznych i chorobotwórczych bytujących w ludzkim organizmie [44]. Pierwsze dowody na to, że drobnoustroje są fizjologicznym elementem ludzkiego organizmu zarejestrowano w 1880 roku, kiedy austriacki pediatra Theodor Escherich obserwował pozytywny wpływ *Escherichia coli* na mikroflorę jelitową dzieci zdrowych oraz dotkniętych biegunkami [86]. W kolejnych latach wyizolowano od ludzi szereg drobnoustrojów, w tym m.in. w 1898 roku bakterie *Veilonella parvula*, a w 1900 roku – *Bifidobacterium* spp. oraz inne bakterie występujące na skórze, w przewodzie pokarmowym i układzie moczowo-płciowym [43]. Postęp technik izolacji i hodowli pozwolił

na pogłębienie wiedzy na temat drobnoustrojów, które zasiedlają ludzki organizm, jednak dopiero rozwój technik molekularnych w późnych latach XX wieku, zrewolucjonizował wiedzę na temat mikrobiomu skóry, przewodu pokarmowego oraz układu oddechowego, w tym w dolnych jego odcinków – płuc, a także dróg moczowo-płciowych. Obecnie przyjmuje się, że w jelicie grubym człowieka jest około 2 kg drobnoustrojów, które stanowią integralny i ważny element makroorganizmu, na które składają się m.in. wspomniane bakterie, a także archea oraz wirusy, w tym bakteriofagi, wirus olbrzymie i grzyby. Odnośnie występowania bakterii w mikrobiomie człowieka wiadomo było od dawna, natomiast obecność w nim archea rejestrowano od 60. lat XX wieku, kiedy stwierdzono obecność metanu w wydychanym powietrzu [28]. Obecnie wiadomo, że archea są reprezentowane przez metanogenne drobnoustroje zasiedlające nie tylko jamę ustną i dalsze odcinki przewodu pokarmowego, ale także skórę [28]. Natomiast, mimo rozwoju technik molekularnych oraz metagenomiki wiriów w różnych niszach ekologicznych organizmu człowieka jest słabo poznany, choć wirusy, w tym bakteriofagi wirusy olbrzymie wykazano we krwi i kale, a także na skórze, w jamie ustnej, w jelitach, układzie oddechowym i układzie moczowo-płciowym [1, 9, 19, 21, 27, 31, 38, 50, 53–55, 66, 69, 75, 77, 79–81, 85, 87, 92, 97, 98]. W przypadku mykrobiomu człowieka wykazano, że reprezentuje on bardzo liczną grupę organizmów eukariotycznych. Ich liczba

\* Autor korespondencyjny: Katedra Immunologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński, ul. Felczaka 3c, 71-412 Szczecin; tel. 91 444 1605; e-mail: kurp13@univ.szczecin.pl

gatunków w i na organizmie człowieka sięga około 1,5 miliona. Z braku możliwości ich hodowania dotychczas opisano jedynie 1–5% wszystkich gatunków grzybów, które występują w organizmie człowieka [23, 88]. Stwierdzono, że mykrobiom dotyczący skóry, jamy ustnej, przewodu pokarmowego oraz dróg oddechowych i układu moczowo-płciowego stanowi fundamentalne znaczenie w ludzkim mikrobiomie mimo, że stanowi on tylko około 0,1% tej populacji [24–25, 37, 41, 72, 78, 88, 94, 95, 102]. Ten wyjątkowy składnik mikrobiomu pełni istotną rolę w utrzymaniu mikrobiologicznej struktury, oddziałuje na fizjologię i metabolizm oraz na układ immunologiczny organizmu człowieka.

Elementem i zarazem znaczącym postępowaniem, który stworzył podwaliny poznania mikrobiomu człowieka, był wdrożony w 2007 roku program Human Microbiome Project (HMP), który w oparciu o sekwencjonowanie jednostki 16S rRNA przybliżył złożoność ludzkiego mikrobiomu [99]. HMP miał za zadanie określenie ludzkiego mikrobiomu na poziomie sekwencji nukleotydowej całego genomowego DNA drobnoustrojów (metagom), sekwencji nukleotydowej mitochondrialnego RNA (metatranskryptom) oraz syntetyzowanie białek bakteryjnych (metaproteom), jak też produktów metabolizmu drobnoustrojów (metabolom) pochodzących ze skóry, jamy ustnej, przewodu pokarmowego i układu moczowo-płciowego. Projekt ten dotyczył także badania i analizy różnic w ludzkiej mikroflorze, w tym różnic w zależności od populacji ludzi i ich genotypu, wieku, sposobu odżywiania, jak też środowiska życia i czynników socjalnych oraz ich stanu zdrowia [40,99]. Sukces HMP stał się przyczyną do dalszych prac w tym zakresie obejmując nowe nisze ekologiczne, które wcześniej nie były brane pod uwagę m.in. wdrożono projekt mający na celu określenie mikrobiomu układu oddechowego, w tym płuc, nie tylko u osób zdrowych, ale także zakażonych wirusem HIV (Lung HIV Microbiome Project). Stworzono odrębne bazy danych dla określonego mikrobiomu, np. jamy ustnej – Human Oral Microbiome Database (HOMD) [100]. Współpraca w ramach projektów, które dotyczą analizy ludzkiego mikrobiomu, pozwoliła na wykazanie możliwości i wartości wyników tych badań, jako podstawowego elementu warunkującego zdrowie człowieka [63].

## 2. Mikrobiom skóry

Ludzka skóra jest największym narządem ciała człowieka i odgrywa ważną rolę w układzie odpornościowym, stanowiąc pierwszą linię obrony przed zmianami środowiska zewnętrznego, jak i przed atakiem drobnoustrojów, w tym patogennych. Powierzchnia skóry, którą określa się na 1,8 m<sup>2</sup>, kolonizowana jest przez różne drobnoustroje, które reprezentują bak-

terie, archea, wirusy, w tym bakteriofagi oraz grzyby [35, 71]. Ten ekosystem jest zróżnicowany topograficznie, ze względu na różnice anatomiczne jego regionów. Część obszarów skóry jest częściowo „niedrożna”, np. pachwiny, sklepienie pach, gdzie jest wyższa temperatura i wyższa wilgotność, co sprzyja rozwojowi drobnoustrojów występujących w warunkach typowych dla pałeczek Gram-ujemnych czy *Staphylococcus aureus* [35, 36, 51]. Kolejnym czynnikiem wpływającym na mikroflorę skóry jest występowanie w niej gruczołów łojowych. Obszary o dużej gęstości tych gruczołów, np. skóra twarzy i pleców wzmagają wzrost lipofilnych bakterii np. *Propionibacterium* spp. i grzybów *Malassezia* spp. [35, 36, 51]. Z kolei skóra ramion i nóg często bywa przesuszona, ponieważ nastawiona jest na duże wahania temperatury. Stąd występuje na niej obniżona liczba drobnoustrojów.

Mikroflora skóry warunkowana jest także wiekiem gospodarza i płcią [71]. Wykazano, że skóra płodu w macicy jest jałowa, po czym jej pierwsza kolonizacja bakteriami następuje podczas naturalnego porodu lub w czasie cesarskiego cięcia [71]. Takie różnice fizjologiczne, w tym odmienne hormony występujące u mężczyzn i kobiet powodują zróżnicowanie w zakresie występowania drobnoustrojów na ich skórze [64].

Na mikroflorę bakteryjną skóry mają także wpływ czynniki środowiskowe, w tym wykonywany zawód, używana odzież oraz stosowane leczenie, w tym antybiotyki [35]. Także używane kosmetyki i produkty higieniczne zmieniają warunki na skórze i wpływają na mikrobiom, choć mechanizm ich oddziaływań na skład mikroflory skóry nie jest do końca poznany [35]. Różnorodność drobnoustrojów skóry była po części znana przed wprowadzeniem technik sekwencjonowania mikrobiomu, jako że metody hodowli wykazały duże ich zróżnicowanie [51]. Wykazano, że głównymi bakteryjnymi kolonizatorami skóry są *Staphylococcus epidermidis* i inne gronkowce koagulazo-ujemne oraz bakterie z gromady *Actinobacteria* m.in. rodzaje *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Brevibacterium*, *Micrococcus* – które uznano za stałą mikroflorę skóry [33, 34, 40, 42, 57, 86]. Z kolei do mikroflory przejściowej, głównie w warunkach patologicznych zaliczono *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* oraz *Pseudomonas aureginosa* [5, 29, 34, 73].

Postęp w poznawaniu mikroflory powłok skóry związany był z technikami molekularnymi, w tym sekwencjonowanie 16S rRNA. Zastosowanie tych metod umożliwiło wykazanie, że skóra ludzka jest bardziej zróżnicowana i bogatsza pod względem występowania drobnoustrojów, niż dotychczas uważano [71]. Badania te dowiodły, że drobnoustroje skóry należą do czterech głównych gromad: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* i *Proteobacteria*. Także wcześniej wykazano na skórze obecność takich rodzajów bakterii jak: *Pro-*

*propionibacterium*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Acinetobacter* oraz *Finogoldia* [34, 71]. Badania Costelli i wsp. [20] wykazały, że na skórze okolicy głowy, w tym skórze nosa, uszu i włosach dominują bakterie z podrodziny *Propionibacterinae*, których jest znacznie mniej na skórze ramion. Badania te dowiodły, że w okolicy tułowia i kończyn, szczególnie okolic pach i podeszwy stóp, pępka i dołu podkolanowego, głównie występują bakterie z rodzaju *Staphylococcus* i *Corynebacterium*. Natomiast badania Grice i wsp. [36] wskazały, że głównymi bakteriami występującymi na skórze klatki piersiowej, plecach i potylicy, gdzie są „łojowe warunki”, w największej ilości występują *Propionibacteria* spp. oraz różne gatunki *Staphylococcus* spp. Natomiast na powierzchniach miejsc wilgotnych m.in. w przestrzeni międzypalcowej, pachach, pępku dominują *Corynebacterium* spp., choć także są obecne bakterie z rodzaju *Staphylococcus*. Z kolei na powierzchniach miejsc suchych takich jak: przedramię, przeważają mieszane drobnoustroje, reprezentowane głównie przez  $\beta$ -*Proteobacteria* i *Flavobacteriales* [36].

Analiza mikrobiomu skóry wykonana nowoczesnymi technikami udowodniły, że archea występujące na powierzchni skóry, to metanogenne archea z rodzaju *Methanosarcina*, *Methanobrevibacter* oraz archeony z gromady *Eurybacteria*, jak też archea utleniające amoniak z typu *Thaumarcheota*, które wpływają na regulację pH skóry i stanowią naturalną warstwę ochronną powłok skóry [82].

Badania mikrobiomu skóry w kierunku obecności wirusów wykazały, że podobnie jak bakterie i archea, tworzą one stały i przejściowy skład mikroflory skóry [55]. Analiza sekwencji wirusowego DNA na powierzchni skóry wskazała trzy dominujące rodziny: *Papillomaviridae* ( $\beta$ -,  $\gamma$ -HPV), *Polyomaviridae* i *Circoviridae* [31, 55] z tym u większości osób najczęściej stwierdzanymi na powierzchniowych warstwach skóry są  $\beta$  i  $\gamma$  papillomawirusy [55], wśród których zidentyfikowano 13 nowych odmian  $\gamma$ -papillomawirusów [31]. Stwierdzono także na skórze polyomawirusy Merkel (MCPyV), które izolowano z agresywnego neurohormonalnego raka skóry, choć wykazano go także na powierzchni skóry osób zdrowych [31]. Na skórze udowodniono występowanie bakteriofagów z rodziny *Myoviridae* i *Siphoviridae*, a także bakteriofagów *Propionibacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Baciillus* spp., których liczbajest zmienna na powierzchniach różnych obszarów skóry [38].

Ważnym składnikiem ekosystemu ludzkiej skóry są grzyby, które oprócz bakterii, archea i wirusów stanowią ważną część, choć badania z tego zakresu są słabo rozwinięte [35]. Obecnie przyjmuje się, że większość grzybów na zdrowej skórze zidentyfikowanych metodami molekularnymi to gatunki *Malassezia* spp.: *M. restricta*, *M. globosa*, *M. sympodialis*, *M. pachydermatis* oraz

*M. furfur*, przy czym gatunki *M. restricta* i *M. furfur* występują liczniej [78]. Przyjmuje się także, że *Candida* spp., mimo że jest składnikiem mykobiomu skóry człowieka, to bardzo rzadko kolonizuje skórę chyba, że jest przyczyną zakażeń, zwłaszcza w warunkach obniżenia odporności czy cukrzycy [86].

### 3. Mikrobiom jamy ustnej

Jama ustna ze względu na kontakt z powietrzem, pożywieniem i środowiskiem wodnym, stanowi dynamiczne oraz bardzo zróżnicowane i unikalne środowisko dla drobnoustrojów. Bakterie w jamie ustnej biorą udział w metabolizmie produktów odżywczych.

Pierwsza kolonizacja tego obszaru zaczyna się bezpośrednio po urodzeniu, a głównym źródłem bakterii jest matka dziecka. Obszar ten, jako pierwsze bakterie zasiedlają: *Streptococcus salivarius*, *S. mitis*, *S. oralis*, a w okresie następnych kilku miesięcy pojawiają się Gram-ujemne beztlenowce tj.: *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella melaninogenica* i *Veillonella* spp. W młodym wieku dorosłym, mikrobiota jamy ustnej człowieka staje się bardzo stabilna i jest reprezentowana przez bakterie z rodzaju *Streptococcus*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Treponema*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Eubacteria*, *Lactobacterium*, *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Leptotrichia*, *Peptostreptococcus* i *Propionibacterium* [8, 93]. Przyjmuje się, że u ludzi w jamie ustnej jest ponad 750 gatunków bakterijnych, przy czym uznaje się, że to tylko około 50% występujących tam bakterii, które poznano [39, 49]. Dane te potwierdza program Human Oral Microbiome Database (HOMD) [100], który nie tylko przedstawia aktualne nazewnictwo drobnoustrojów jamy ustnej, ale także zawiera dane z bibliotek fenotypowych, filogenetycznych i klinicznych zarazków [27].

Na duże zróżnicowanie mikrobiomu jamy ustnej ma wpływ temperatura, pH, potencjał oksydacyjno-redukcyjny, zasolenie oraz ślina, która dostarcza składników odżywczych, usuwa produkty przemiany, a dodatkowo zawiera liczne enzymy np. w amylazę, peptydy przeciwbakteryjne, a nawet przeciwciała [71]. Jest on także warunkowany stanem higieny gospodarza np. szczotkowaniem zębów czy płukaniem jamy ustnej [71], a także wiąże się z mikrobiomem śliny. Analiza wyników badań molekularnych mikrobiomu śliny osób z różnych stref geograficznych, wykazała [70] obecność ponad 100 rodzajów bakterii, w tym około 40 dotychczas nieopisanych. Stwierdzono, że u większości badanych osób występują bakterie z rodzajów: *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Rothia*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Scardovia*, *Parascardovia* i *Alloscardovia* [11, 70]. Wykazano, że język, jako wał mięśniowy pokryty śluzówką, stanowi także miejsce kolonizowane

przez bakterie. Stosując sekwencjonowanie 16S rRNA stwierdzono, że mikrobiom języka ludzi zdrowych oraz chorych na raka żołądka jest bardzo bogaty i zróżnicowany [46]. U ludzi zdrowych stwierdzono bakterie z rodzajów *Prevotella*, *Neisseria*, *Streptococcus*, *Haemophilus* i *Fusobacterium*, zaś u chorych dominowały bakterie z rodzajów *Prevotella*, *Streptococcus*, *Veilonella*, *Actinomyces*, *Leptotrichia* [46].

Istotnym faktem dotyczącym mikrobiomu jamy ustnej jest biofilm tworzony nad- i poddziąsłowo, który różni się między sobą składem mikroflory bakteryjnej. Drobnoustroje obecne w biofilmie tworzą niezwykle zorganizowaną i aktywną strukturę, w której współpracują ze sobą, uczestnicząc w rozkładzie substancji organicznych i pozyskiwaniu energii [16]. Stwierdzono, że w naddziąsłowej płytce bakteryjnej występują głównie bakterie Gram-dodatnie takie jak: *S. mutants*, *S. salivarius*, *S. motis* oraz *Lactobacillus* spp. Natomiast na poddziąsłowej płytce obecne są Gram-ujemne bakterie np.: *Actinobacillus* spp., *Campylobacter* spp., *Fusobacterium nucleatum* i *Porphyromonas gingivalis* [16, 39].

Na płytce nazębnej stwierdzono także obecność archea i pochodzą one z typu *Euryarchaeota*, a w szczególności *Methanobrevibacter oralis* i *M. smithii* [46]. Stwierdzono w jamie ustnej bakteriofagi, których obecność związana jest z występowaniem potencjalnych gospodarzy – bakterii [27]. Obserwacje dotyczące ich występowania w jamie ustnej dowiodły, że są to głównie fagi *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a ich liczba jest dodatnio skorelowana z zanikiem przyzębia [27, 75, 78]. Udowodniono, że bakteriofagi jamy ustnej mogą występować zarówno, jako komensale oraz jako czynniki chorobotwórcze [9, 27, 92]. Wykazano, że w tym ekosystemie dominują *Escherichia coli* fag T3, *Propionibacterium acnes* fag PA6 oraz *Streptococcus mitis* fag SM1, chociaż odnotowano także obecność *E. coli* fag lamda, *Burholderia* fag E125, *Actinomyces* fag Av-1 oraz fagi *Streptococcus* [44, 98]. Autorzy innych badań wykazali [85] występowanie bakteriofagów atakujących gromady *Proteobacteria* lub *Firmicutes*, które obejmują rodzaje *Streptococcus*, *Gemella*, *Veilonella* i *Leptotrichia*. Obecność w ludzkiej ślinie faga *Enterococcus faecalis*, to dowód, że odgrywa on ważną rolę w ograniczaniu występowania bakterii w systemie korzeni zębowych, jako że penetrując kanały zęba, eliminują zakażenie wywołane przez *E. faecalis* [9]. Wśród mikrobiomu jamy ustnej metodami biologii molekularnej stwierdzono, że ten ekosystem to doskonałe miejsce nie tylko bakteriofagów, ale również wirusów ssaczy, które reprezentowane są przez TTV (torque teno virus), circowirusy, herpsewirusy, w tym HSV (Herpes simplex virus) oraz EBV (Epstein-Barr virus) [1, 27, 69, 85, 93, 98].

Badania mikrobiomu jamy ustnej, u ludzi zdrowych dowiodły występowanie takich grzybów jak *Candida* spp., *Saccharomyces* spp., *Penicillium* spp., *Scopularia*

spp., *Geotrichum* spp. oraz *Aspergillus* spp., *Cryptococcus* spp., *Fusarium* spp. i *Alternaria* spp. [23]. Potwierdzili to Dupuy i wsp., [25] którzy w jamie ustnej wykazali obecność nie tylko wspomnianych grzybów z rodzajów: *Candida*, *Saccharomyces* czy *Aspergillus* i *Cryptococcus*, ale także *Fusarium*, *Alternaria* i *Cladosporium*, choć również stwierdzono występowanie grzybów z rodzaju *Aurebasidium*, *Epicoccum*, *Phoma* oraz *Malassezia* – który to patogen jest charakterystyczny dla mykobiomu skóry.

#### 4. Mikrobiom przewodu pokarmowego

Przewód pokarmowy makroorganizmów ze względu na pełnione funkcje oraz specyficzność budowy, stanowi niezwykle miejsce dla drobnoustrojów. Układ ten zapewnia warunki życia i wzrostu drobnoustrojom komensalnym, jak również tym, które są dostarczane wraz z pożywieniem i które w znaczący sposób mogą wpłynąć na procesy zachodzące w tej niszy ekologicznej. Żołądek, jako jeden z odcinków przewodu pokarmowego stanowi przejściowy rezerwuuar pokarmu, w którym odbywają się takie procesy jak: zwilżanie, rozpuszczanie i mieszanie treści pokarmowej z sokiem żołądkowym. Sam sok żołądkowy stanowi mieszaninę proteolitycznych enzymów i kwasu solnego, przez co dostarcza środowisku niezbędnych do denaturacji białek oraz ułatwia wchłanianie składników odżywczych [67]. Ze względu na kwaśne środowisko, żołądek uważany był za miejsce zasadniczo sterylne i nieprzyjazne dla rozwoju drobnoustrojów. Jednak wraz z odkryciem *Helicobacter pylori* zwrócono uwagę na to, że jest on zasiedlany przez różnorodną mikrospołeczność [66]. Gęstość mikrobiologiczną żołądka określa się obecnie na  $10^1$ – $10^3$  CFU (colony-forming unit)/g [74] i przez co, wraz z przełykiem i dwunastnicą jest najmniej skolonizowanym przez bakterie regionem przewodu pokarmowego. Głównym składnikiem mikroflory żołądka należą do *Proteobacteria* jest wspomniany *H. pylori*, która to bakteria kolonizuje niszę żołądka u ponad połowy ludzi na świecie [90]. Hodowla bakterii z soku żołądkowego jak też analiza mikrobiologiczna bioptatów błony śluzowej wykazała występowanie bakterii z gromady *Firmicutes* (rodzaje *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Veilonella*), *Proteobacteria* (*Escherichia*), *Actinobacteria* (*Bifidobacterium*) oraz w niewielkiej ilości grzybów z rodzaju *Candida* [12, 90]. Badania metodami hodowlanymi dowiodły, że mikrobiom żołądka tworzą bakterie z gromady *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* i *Fusobacteria* [12]. Z kolei badania z wykorzystaniem technik biologii molekularnej wskazały na obecność wcześniej izolowanych rodzajów bakterii klasycznymi metodami m.in: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Veilonella* oraz *Escherichia*,

a także stwierdzono nowe rodzaje bakterii, które wcześniej nie zaliczono do mikrobioty żołądka: *Prevotella*, *Caulobacter*, *Actinobacillus*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Gemella*, *Leptotrichia*, *Porhyromonas*, *Capnocytophaga* oraz *Deinococcus* [12]. Natomiast w tej niszy, mimo specjalistycznych badań dotyczących mikrobiomu, nie wykazano występowania wirusów i grzybów.

Odnosnie mikrobiomu jelit człowieka należy stwierdzić, że jego znaczenie po raz pierwszy wykazał ponad sto lat temu rosyjski laureat Nagrody Nobla Ilja Iljicz Miecznikow, kiedy postawił hipotezę, że zdrowotne właściwości kefiru są związane ze zdolnością w nim obecnych żywych bakterii do kolonizowania jelita [71]. Przyjmuje się, że mikrobiota jelit ludzi zaczyna rozwijać się w czasie narodzin. Jest to proces dynamiczny, choć uzależniony od wielu czynników m.in. czynników genetycznych, mikrobioty matki, rodzaju porodu, warunków środowiskowych i stosowanej diety [58, 63]. Co ważne, w pierwszych dniach życia w przewodzie pokarmowym są warunki względnie beztlenowe, a co za tym idzie jest to miejsce do kolonizowania przez bakterie wykorzystujące tlen pochodzący ze środowiska. Są to *E. coli* i *E. faecalis*, które tworzą po wykorzystaniu tlenu warunki beztlenowe [58]. W rezultacie dochodzi do zasiedlenia w tym obszarze bakterii beztlenowych z rodzaju *Bacteroides*, *Bifidobacterium* i *Clostridium*. Przypuszcza się, że proces tworzenia mikrobioty jelitowej kształtuje się do około 2 roku życia, chociaż w późniejszych okresach notuje się duże wahania składu ilościowego bakterii spowodowanych m.in. wiekiem, stylem życia, choć np. jelito grube dorosłego człowieka, a w szczególności okrężnica zawiera około  $10^{12}$ – $10^{14}$  bakterii na 1 ml, co stanowi około 1,2 kg [56]. U dorosłego człowieka bakteryjny składnik jelitowej mikroflory stanowią głównie beztlenowce, które przewyższają ponad 100-krotnie swą liczbą bakterie fakultatywnie tlenowe. Do najliczniej występujących bakterii w obrębie mikrobioty jelitowej zaliczyć należy bakterie Gram-dodatnie, jak i Gram-ujemne bezwzględnie i względnie beztlenowe z rodzajów: *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Ruminococcus* i w mniejszej ilości *Lactobacillus* spp., *Escherichia coli*, *E. faecalis*, *Bacillus* spp., *Clostridium* spp. i *Streptococcus* spp. [889]. Poza wymienionymi rodzajami bakterii, inni autorzy [52] podają, że do drobnoustrojów stanowiących mikrobiotę jelit należą rodzaje: *Preptostreptococcus*, *Klebsiella*, *Proteus* oraz gatunki *Fenogoldia manga* i *Micromonas micros*. Chociaż w ludzkim jelicie wykryto obecność ponad 50 gromad bakterii, ekosystem ten zdominowały w szczególności dwie gromady *Bacteroidetes* oraz *Firmicutes* [15, 26]. Sekwencjonując mikrobiom jelit Eckburg i wsp. [26] odnotowali, że wśród gromady *Bacteroidetes* w przeważającej ilości występują bakterie z rodzaju *Clostridium*, które pełnią ochronną rolę nabłonka okrężnicy. Z kolei wśród gro-

mady *Bacteroidetes* najpowszechniejszym gatunkiem był *Bacteroides thetaiotaomicron*, którego stwierdzono u wszystkich badanych osób [26]. Dodatkowo, badacze wykazali obecność *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* oraz *Verrucomicrobia* [26]. Stwierdzono także w mikrobiocie jelitowej osób dorosłych gatunki bakterii wytwarzające maślan. Są to: *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia intestinalis* oraz *Bacteroides uniformis* [83]. Analiza sekwencji 22 próbek kału różnych osób wykazała, że mikrobom ludzkiego jelita można uporządkować w trzy enterotypy, gdzie nazwy enterotypów uzależnione zostały od dominujących w nich bakterii: *Bacteroides* (enterotyp 1), *Prevotella* (enterotyp 2), *Ruminococcus* (enterotyp 3). Stwierdzono, że najczęściej występującym u ludzi był enterotyp 3, który oprócz bakterii z rodzaju *Ruminococcus* zawierał licznie występujący rodzaj *Akkermansia*. Oba te rodzaje zarasków zawierają „ugrupowania” zdolne do degradacji mucyny [7]. Wykazano, że mikrobiota jelitowa pełni liczne funkcje, gdyż warunkuje nie tylko ciągłość nabłonka jelitowego, ale także zapewnia homeostazę układu immunologicznego, chroniąc jednocześnie makroorganizm przed niekorzystnym wpływem bakterii chorobotwórczych m.in. *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* czy *Listeria monocytogenes* [52, 58]. Ekosystem jelit jest także reprezentowany przez archeony, jako że *Methanobrevibacter smithii* oraz *M. oralis* (*Methanosphaera stadtmanae*) to gatunki, które izolowano z różnych środowisk, w tym jamy ustnej oraz pochwy [45]. Badania ostatnich lat prowadzone metodami molekularnymi wykazały, że różnorodność archeonów u ludzi jest duża oraz, że reprezentują je *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota*, *Thermococcales*, *Thermoplasmatales* oraz niemetanogenne archea *Halobacteriaceae*, które stwierdza się w ludzkim kale [45, 76]. Wykazano także w kale obecność archeonów z rodzaju *Nitrososphaera*, które zdolne są do utleniania amoniaku i mocznika oraz dostarczają drobnoustrojom azot dla [41].

Ludzki mikrobiom jelit tworzą także wirusy, które wpływają na homeostazę gospodarza, warunkują odporność jelit. Wśród nich wyróżnić można wirusy infekujące komórki gospodarza oraz bakteriofagi atakujące bakterie. Wykazano, że ludzka treść jelitowa zawiera co najmniej  $10^9$  cząstek wirusopodobnych na jeden gram kału. Sekwencjonowanie wirusów z próbek kału dowiodło, że bakteriofagi atakują do  $10^{14}$  komórek bakteryjnych i są najbardziej rozpowszechnionymi wirusami jelitowymi [3,68]. Chociaż wiele jelitowych bakteriofagów nie zostało jeszcze w pełni sklasyfikowanych, wiadomo, że najbardziej rozpowszechnione są dwuniciowe wirusy DNA z rzędu *Caudovirales* *Podoviridae*, *Siphoviridae*, *Myoviridae*) oraz jednociowe bakteriofagi DNA (*Microviridae*) [3, 68]. Przyjmuje się, że w porównaniu do bakteriofagów w jelitach

o wiele mniej jest także wirusów eukariotycznych, choć sekwencjonowanie próbek kału od dzieci zdrowych wykazały złożoną społeczność wirusów eukariotycznych z rodziny *Picobirnaviridae*, *Adenoviridae*, *Anelloviridae*, *Astroviridae*, a także wykazano obecność takich gatunków wirusów jak *Bocavirus*, *Enterovirus*, *Rotavirus* oraz *Sapovirus* [50]. Niedawno wykazano także w próbkach kału u ludzi zdrowych obecność megawirusa należącego do rodziny *Marseilleviridae*, co może świadczyć o tym, że te wirusy mogą tworzyć mikrobiotę przewodu pokarmowego [19, 53, 77].

Badając mykobiom jelita, a w szczególności kału wykazano, że najczęściej występującymi rodzajami grzybów są: *Candida*, *Cladosporium*, *Cryptococcus* i *Saccharomyces*, choć w wielu próbkach kału były obecne i takie grzyby jak: *Malassezia* spp., *Eurotiales* spp., *Botryosphariales* spp. oraz *Filobasidiales* spp. [23, 41]. Hoffman i wsp. [41] oceniając korelację pomiędzy taksonami grzybiczymi, a bakteryjnymi w mikrobiomie jelita wskazywali, że grzyby z rodzaju *Candida* i *Saccharomyces* są dodatnio skorelowane z archeonami z rodzaju *Methanobrevibacter* i bakteriami *Prevotella* spp. i te rodzaje drobnoustrojów były najczęściej wykazywane u ludzi z dietą wysokowęglowodanową. Z kolei osoby będące na diecie bogatej w aminokwasy i kwasy tłuszczowe mają posiadają zwiększoną liczbę *Candida* spp. Badacze Ci sugerują, że grzyby z rodzaju *Candida* oraz bakterie z rodzaju *Prevotella*, *Ruminococcus* i archeony *Methanobrevibacter*, tworzą syntroficzną społeczność jelit, które zapewniają metabolizm węglowodanów złożonych, gdzie *Prevotella* spp. i *Ruminococcus* spp. fermentują cukry wytwarzane przez *Candida* spp., a *Methanobrevibacter* spp. wykorzystują produkty fermentacji bakteryjnej, wytwarzając metan i dwutlenek węgla [41].

## 5. Mikrobiom dróg oddechowych

Mikrobiom dróg oddechowych ssaków, w tym ludzi, a w szczególności górnych dróg jest zróżnicowany, jako że system błon śluzowych pozostaje stale w kontakcie ze środowiskiem zewnętrznym w tym poprzez proces oddychania. Jama nosowa z każdym oddechem pełni funkcję „wejścia” do dróg oddechowych wielu drobnoustrojów. Pierwsze badania dotyczące mikrobiomu jamy nosowej wykazały, że znacznie różni się on od mikrobiomu krtani. U zdrowych osób dorosłych udowodniono, że mikroflora tego obszaru należy do gromady *Actinobacteria* (*Propionibacterium* spp., *Corynebacterium* spp.) oraz *Firmicutes* (*Staphylococcus* spp.) [40], co zgodne jest z wynikami badań prowadzonych przez Franka i wsp. [32], którzy wskazali także, że mikroflora tego obszaru jest zdominowana przez *Actinobacteria*, w tym *Propionibacterium* spp., *Corynebacterium* spp. oraz *Firmicutes* [32]. Natomiast Rasmussen i wsp. [84] badając

tę niszę wykazali obecność nie tylko bakterii z rodzaju *Corynebacterium* i kilku przedstawicieli gronkowców m.in. *Staphylococcus epidermidis*, *S. capitis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis* i *S. warneri*, ale także bakterii z rodzaju *Aureobacterium* i *Rhodococcus* [84].

Stwierdzono, że zrogowaciały nabłonek płaski nozdrzy zawiera gruczoły łojowe produkujące substancje wspomagające wzrost litofilnych bakterii takich jak *Propionibacterium* spp. Drobnoustroje tego rodzaju zdolne są do hydrolizy tłuszczów, uwalniają jednocześnie wolne kwasy tłuszczowe, co w konsekwencji obniża pH, sprzyjając wzrostowi koagulozo-ujemnych gronkowców, a dodatkowo wilgotne warunki i obecność tlenu w tym miejscu, wpływa na wzrost w tym obszarze *S. aureus* [22]. Z kolei analiza składu mikrobioty jamy nosowej osób zdrowych wykazała stosunkowo niższą liczbę *S. aureus*, a zwiększoną *Corynebacterium* spp. i *S. epidermidis*, co sugeruje, że są one antagonistami w stosunku do *S. aureus* [59]. Yi i wsp. [101] badając poprzez sekwencjonowanie mikrobiom górnych dróg oddechowych wskazali, że dominującymi bakteriami jest rodzaj *Streptococcus*. Bakterie te wykryto u wszystkich badanych osób i stanowiły one zdecydowaną większość bakteryjnej mikrosocjety, choć wykazano także, ale w zdecydowanie mniejszej ilości *Neisseria* spp. i *Gemella* spp. Z kolei u osób zdrowych notowano obecność bakterii z rodzaju *Streptococcus*, *Veillonella* i *Prevotella*, choć u większości stwierdzono także bakterie z rodzaju *Haemophilus*, *Gemella*, *Rothia* i *Leptotricha* [101]. W przypadku przewlekłego zapalenia zatok przynosowych (*chronic rhinosinusitis*, CRS) u ludzi stwierdzono obniżone zróżnicowanie bakteryjne w porównaniu do grupy kontrolnej, a także wykazano obniżoną liczbę bakterii kwasu mlekowego u pacjentów z CRS i wzrost liczby *Corynebacterium tuberculostraititicum* [2].

Dolne drogi oddechowe – tchawica i płuca, znacznie różnią się budową i funkcją od górnych dróg oddechowych. Wyścielone są nabłonkiem rzęskowym oraz licznymi komórkami wydzielniczymi uwalniającymi m.in. mucynę, związki powierzchniowo czynne, proteazy oraz białka immunomodulujące, co tworzy barierę odpornościową tego odcinka [62]. Odporność tego regionu dróg oddechowych jest także warunkowana przez makrofagi, limfocyty T, komórki dendrytyczne, w tym komórki Langerhansa. Stąd przyjmowano, że te elementy obrony układu oddechowego tego odcinka, wystarczają do utrzymania w nim jałowości [62]. Sugerowana jałowość tego odcinka układu oddechowego związana była z trudnością odtworzenia warunków tego siedliska, w tym hodowli bakterii z popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych [65]. Obecnie dzięki zastosowaniu technik sekwencjonowania genu 16S rRNA wykazano, że dolne drogi oddechowe zasiedlane są drobnoustrojami, które są odmienne od mikrobioty górnych dróg oddechowych. Program

Narodowego Instytutu Serca, Płuc i Krwi (NHLBI) przedstawił nie tylko mikrobiom układu oddechowego u osób zdrowych, ale i zakażonych wirusem HIV (Lung HIV Microbiome Project) [60,65]. Wykazano w nim, że najbardziej rozpowszechnionymi są bakterie z gromad: *Bacteroidetes* oraz *Firmicutes*, choć również w mniejszym stopniu *Proteobacteria* i *Actinobacteria*. W tym ekosystemie stwierdzono także obecność takich bakterii jak: *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp. (*Bacteroidetes*), *Streptococcus* spp., *Veillonella* spp. (*Firmicutes*), *Pseudomonas* spp., *Haemophilus* spp. oraz *Neisseria* spp. (*Proteobacteria*). Analiza mikrobiomu płuc poprzez badanie popłuczyn pęcherzykowo-oskrzelowych u 14 pacjentów (w tym zdrowych palaczy) wykazała obecność takich drobnoustrojów w płucach jak: *Pseudomonas* spp., *Streptococcus* spp., *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp., *Haemophilus* spp., *Veillonella* spp. i *Porphyromonas* spp. [2, 30]. W tym rejonie układu oddechowego stwierdzono duże zróżnicowanie mikroflory w zależności od poszczególnych obszarów płuc, jako że bakterie z rodzaju *Haemophilus* dominowały w lewym górnym płacie płuca, a niewielka liczba komórek bakteryjnych tego gatunku, była w innym mikroanatomicznym obszarze innego płata płuc [18].

W drogach oddechowych dużym zainteresowaniem stał się wirusowy składnik mikrobiomu, a w szczególności dotyczy to dolnych dróg oddechowych – płuc. Związane jest to z faktem, że wcześniej niedostępny dla klasycznych metod hodowli ekosystem. Obecnie dzięki nowoczesnym technikom sekwencjonowania jest łatwiejszy do badania. W płucach stwierdzono obecność nie tylko wirusów ssaczy, ale i bakteryjnych (bakteriofagi), jak też wykazano, że ich skład zmienia się zasadniczo w zależności od regionu płuc. Willner i wsp. [97] badając chorych na mukowiscydozę udowodnili obecność fagów takich rodzajów bakterii jak: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Haemophilus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Mycobacterium* oraz *E. coli*. Dodatkowo, w próbkach pochodzących z dróg oddechowych u ludzi zdrowych wykazano obecność wirusa olbrzymiego z rodzaju *Mimiviridae* [54,87].

Badania dotyczące mykobiomu układu oddechowego wykazały, że w płucach występuje ponad 75 rodzajów grzybów, wśród których u ludzi są to głównie rodzaje *Aspergillus*, *Candida*, *Cladosporium*, *Malassezia*, *Saccharomyces*. Ich skład i liczba gatunkowa uzależnione są od miejsca w drogach oddechowych [18, 65]. Charlsona i wsp. [17] wykazali, że u ludzi zdrowych najczęściej obecne były grzyby z rodziny *Davidiellaceae* i rodzajów *Cladosporium*, *Eurotium* i *Penicillium*. Podobnie van Woerdena [72] stwierdził, że najbardziej rozpowszechnionymi gatunkami były *Cladosporium cladosporium* i *Eremothecium sincaudum*, które jak dotąd zwykle izolowane były z wody oraz z roślin. Powszechne w środowisku życia czło-

wieka są formy nitkowate grzybów rodzajów *Aspergillus* i *Scedosporium*, które jako spory regularnie dostają się do układu oddechowego, przy czym nie wywołują zmian chorobowych u ludzi z prawidłową odpornością [30].

## 6. Mikrobiom układu moczowo-płciowego

Układ moczowo-płciowy składa się z narządów płciowych oraz narządów dróg moczowych i są one połączone w jeden układ ze względu na wspólne pochodzenie obu zawiązków z tkanki mezodermalnej. Natomiast mikrobiota tego obszaru jest reprezentowana przez zróżnicowane drobnoustroje stanowiąc także unikalny i dynamiczny ekosystem. Mikrośrodo-wisko pochwy zdrowych kobiet uzależnione jest przede wszystkim od wieku, zmian hormonalnych zachodzących w organizmie, a także od nawyków higienicznych i aktywności seksualnej [61, 71]. Drobnoustroje kolonizujące ten obszar w warunkach fizjologicznych chronią go przed patogenami chorobotwórczymi oraz aktywują odpowiedź immunologiczną poprzez wytwarzanie różnych związków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym [103]. Dowiedziono, że mikrobiom tego obszaru zdominowany jest przez pałeczki kwasu mlekowego, których więcej wykazano u afroamerykańskich kobiet niż u kaukaskich [103]. Przyjmuje się, że *Lactobacillus* spp. może stanowić środowisko ochronne przed patogenami wywołującymi bakteryjne zakażenie pochwy. Bakterie te w nabłonku pochwy metabolizują glikogen do kwasu mlekowego, co sprzyja wytworzeniu środowiska o niskim pH, który powstrzymuje rozwój patogenów odpowiedzialnych za zakażenie układu rozrodczego kobiet wywołane np. *Gardenerella vaginalis*, *E. coli*, *Mobiluncus* spp., *Candida albicans* [61, 71]. Badania dotyczące mikrobioty pochwy prowadzone przez Antonio i wsp. [6] w oparciu o klasyczne metody hodowli wykazały, że dominującymi gatunkami wśród pałeczek kwasu mlekowego są *L. crispatus* i *L. jensenii*. Wyniki te potwierdzili w oparciu o metody biologii molekularnej Zhou i wsp. [103], którzy wykazali także dużą różnorodność rodzajów bakterii, choć bakterie z rodzaju *Lactobacillus* spp. były dominujące, a w szczególności *L. iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri* oraz *L. jensenii*. W badaniach tych stwierdzono także inne bakterie, a w szczególności *Atopobium vaginae*, *Streptococcus* spp. oraz z gromady *Firmicutes* [103]. Z kolei Hyman i wsp. [48] badając mikroflorę tego obszaru dowiedli, że dominującym rodzajem był *Lactobacillus* spp., choć także wykazali występowanie bakterii z rodzajów *Bifidobacterium*, *Gardnerella*, *Atopobium*, *Corynebacterium*, *Janthinobacterium*. Autorzy Ci [48] stwierdzili, że w niektórych próbkach nieobecne były bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, a jako dominujące były rodzaje *Bifidobacterium*, *Gardenerella*, *Gemella*,

*Prevotella*, *Pseudomonas* i *Streptococcus*. Inni badacze [96] oceniając mikrobiom pochwy kobiet zdrowych oraz chorych na bakteryjne zapalenie pochwy potwierdzili, że dominującą mikrobiotą baktryjną tego obszaru są bakterie z rodzaju *Lactobacillus*. W przypadku dróg płciowych u kobiet zdrowych dominowały *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* oraz *L. jensenii*, a z kolei w grupie kobiet z zakażeniem pochwy dominowały bakterie z rodzaju *Atopobium*, *Prevotella* i gatunek *Mycobacterium hominis*. Analiza ekosystemu pochwy u estońskich zdrowych kobiet wykazała [24], że dominującym rodzajem jest *Lactobacillus* spp., jednak obecne w znacznej liczbie były także bakterie z rodzaju *Gardnerella*, *Prevotella* i *Atopobium* i bakterie tlenowe z rodzaju *Streptococcus* i *Staphylococcus*, przy czym ich obfitość była stosunkowo niska. W przypadku archea stwierdzono jedynie ich występowanie u kobiet z bakteryjną waginozą [10].

Wirusową mikrobiotę układu moczowo-płciowego badano głównie w przypadkach patologicznych. Stąd brak jest pełnych danych dotyczących wirumu tych dróg. Podczas bezobjawowego złuszczenia układu moczowo-płciowego notowano głównie eukariotyczne wirusy dsDNA, wśród których obecne były rodziny: *Adenoviridae*, *Herpesviridae*, *Papillomaviridae*, *Polyomaviridae*, a także wirus ssDNA z rodziny *Anelloviridae* [79].

Drogi rodne, głównie pochwa są swoistym mikrośrodowiskiem dla grzybów, w tym najbardziej powszechne są grzyby z rodzaju *Candida*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Alternaria* i *Cladopsorium*. Na różnorodność populacji grzybów w tym ekosystemie mogą mieć wpływ także choroby np. cukrzyca, nawracająca kandydoza pochwy. Wykazano, że na występowanie mikrobioty grzybiczej w tym obszarze ma znaczący wpływ mikrobiota bakteryjna, głównie rodzaj *Lactobacillus*. Bakterie te, wytwarzają kwas mlekowy o niskim pH, który hamuje rozwój grzybów, stąd możliwe, że dane z tego zakresu są ograniczone ze względu na nie uwzględnienie tych drobnoustrojów [13, 14, 24, 37, 102].

## 7. Podsumowanie

Mikrobiom człowieka w aspekcie najważniejszych jego nisz, zarówno w kontekście bakterii, archea, grzybów, a w szczególności wirusów, w tym bakteriofagów i wirusów olbrzymich, stanowi nadal stosunkowo mało poznany fragment wiedzy biologicznej, a który jest bardzo ważny, jako że to on warunkuje homeostazę organizmu. Stąd, badania prowadzące do poznania mikrobiomu człowieka tak pod względem różnorodności drobnoustrojów oraz ich oddziaływania, to fakty ważne, chociażby z powodu przybliżenia poznania etologii, a nawet patogenyzy wielu chorób.

## 8. Piśmiennictwo

1. Abeles S.R., Robles-Sikisaka R., Ly M., Lum A.G., Salzman J., Boehm T.K. et al.: Human oral viruses are personal, persistent and gender-consistent. *ISME J.* **8**, 1753–1767 (2014)
2. Abreu N.A., Nagalingam N.A., Song Y., Roediger F.C., Pletcher S.D., Goldberg A.N., Lynch S.V.: Sinus microbiome diversity depletion and *Corynebacterium tuberculostercium* enrichment mediates rhinosinusitis. *Sci. Transl. Med.* DOI: 10.1126/scitranslmed.3003783 (2012)
3. Ackermann H. W. Phage classification and characterization. *Methods. Mol. Biol.* **501**, 127–140 (2009)
4. Adamiak M., Śliwa-Dominiak J., Bąk K., Tokarz-Deptuła B., Deptuła W.: Bakterie komensalne i odporność układu pokarmowego, oddechowego oraz moczowo-płciowego. *Post. Hig. Med. Dośw.* **70**, X-Y, 2016 (w druku)
5. Akiyama H., Morizane S., Yamasaki O., Oono T., Iwatsuki K.: Assessment of *Streptococcus pyogenes* microcolony formation in infected skin by confocal laser scanning microscopy. *J. Dermatol. Sci.* **32**, 193–199 (2003)
6. Antonio M.A., Hawes S.E., Hillier S.I.: The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *J. Infect. Dis.* **180**, 1950–1956 (1999)
7. Arumugan M., Ehrlich S.D.: Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, **473**, 174–180 (2011)
8. Avila M., Ojcius D.M., Yilmaz O.: The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA Cell Biol.* **28**, 405–411 (2009)
9. Bachrach G., Leizerovici-Zigmond M., Zlotkin A., Naor R., Steinberg D.: Bacteriophage isolation from human saliva. *Lett. Appl. Microbiol.* **36**, 50–53 (2003)
10. Belay N., Mukhopadhyay B., Conway de Macario E., Galask R., Daniels L.: Methanogenic bacteria in human vaginal samples. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 1666–1668 (1990)
11. Beighton D., Gallagher J. et al.: Isolation and identification of Bifidobacteriaceae from human saliva. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 6457–6460 (2008)
12. Bik E.M., Eckburg P.B., Gill S.R., Nelson K.E., Purdom E.A., Francois F., Perez-Perez G., Blaser M.J., Relman D.A.: Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 732–737 (2006)
13. Boris S., Barbes C.: Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, a vaginal isolate. *J. Appl. Microbiol.* **83**, 413–420 (1997)
14. Boris S., Suarez J.E., Vazquez F., Barbes C.: Adherence of human vaginal *Lactobacilli* to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infect. Immun.* **66**, 1985–1989 (1998)
15. Bull M.J., Plummer N.T.: The gut microbiome in health and disease. *Integr. Med.* **13**, 17–22 (2014)
16. Chałas R., Wójcik-Chęcińska I., Woźniak M.J. et al.: Płytki bakteryjne jako biofilm – zagrożenia w jamie ustnej oraz sposoby zapobiegania. *Post. Hig. Med. Dośw.* **69**, 1140–1148 (2015)
17. Charlson E.S., Chen J., Custers-Allen R., Bittinger K., Li H., Sinha R., Hwang J., Bushman F.D., Collman R.G.: Disordered microbial communities in the upper respiratory tract of cigarette smokers. *PLoS One*, **5**, e15216 (2010)
18. Charlson E.S., Diamond J.M., Bittinger K., Fitzgerald A.S., Yadav A., Haas A.R., Bushman F.D., Collman R.G.: Lung-enriched organisms and aberrant bacterial and fungal respiratory microbiota after lung transplant. *Am. J. Crit. Care Med.* **186**, 536–545 (2012)
19. Colson P., Fancello L., Gimenez G., Armougoum F., Desnaues Ch., Fournous G., Yoosuf N., Million M., La Scola B., Raoult D.: Evidence of megavirome in human. *J. Clin. Virol.* **57**, 191–200 (2013)



20. Costello E.K., Laauber C.L., Hamady M., Fierer N., Gordon J.I., Knight R.: Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*, **326**, 1694–1697 (2009)
21. Duerkop B.A., Hooper L.V.: Resident viruses and their interactions with the immune system. *Nat. Immunol.* **14**, 654–659 (2013)
22. de Steenhuijsen Piters W., Sanders E., Bogaert D.: The role of the local microbial ecosystem in respiratory health and disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **370**, DOI 10.1098/rstb.2014.0294 (2015)
23. Dworecka-Kaszak B.: Mycobiome – a cross-talk between fungi and their host. XVI Conference DIGMOL 2015, „Molecular biology in diagnostics if infectious disease and biotechnology”, Warszawa 2015, p. 67–71
24. Drell T., Lillsaar T., Tummeleht L., Simm J. et al: Characterization of the vaginal micro- and mycobiome in asymptomatic reproductive-age estonian women. *PLoS One*, **8**, e54379 (2013)
25. Dupuy A.K., David M.S., Li L., Heider T.N., Peterson J.D., Montano E.A., Dongari-Bagtzoglo A., Diaz P.I., Strausbaugh L.D.: Redefining of the human oral mycobiome with improved practices in amplicon-based taxonomy: Discovery of *Malassezia* as a prominent commensal. *PLoS One*, DOI: 10.1371/journal.pone.0090899 (2014)
26. Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A.: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, **308**, 1635–1638 (2005)
27. Edlund A., Santiago-Rodriguez T.M., Boehm T.K., Pride D.T.: Bacteriophages and their potential roles in the human oral cavity. *J. Oral. Microbiol.* **7**, DOI: 10.3402/jom.v7.27423 (2015)
28. Efenberger M., Wódz K., Brzezińska-Błaszczuk E.: Archeony – istotny składnik mikrobiomu człowieka. *Przegl. Lek.* **71**, 346–351 (2014)
29. El Baze P., Thyss A., Caldani C., Juhlin L., Schneider M., Ortonne J.P.: *Pseudomonas aeruginosa* O-11 folliculitis. Development into ecthyma gangrenosum in immunosuppressed patients. *Arch. Dermatol.* **121**, 873–876 (1985)
30. Erb-Downward J.R., Huffnagle G.B.: Analysis of the Lung Microbiome in the “Healthy” Smoker and in COPD. *PLoS One*, **6**, e16384 (2011)
31. Foulongne V., Eloit M. i wsp.: Human skin microbiota: high diversity of DNA viruses identified on the human skin by high throughput sequencing. *PLoS One*, **7**, e38499 (2012)
32. Frank D.N., Feazel L.M., Bessesen M.T., Price C.S., Janoff E.N., Pace N.R.: The Human Nasal Microbiota and *Staphylococcus aureus* Carriage. *PLoS One*, **5**, e10598 (2010)
33. Fredericks D.N.: Microbial ecology of human skin in health and disease. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* **6**, 167–169 (2001)
34. Gao Z., Tseng C., Pei Z., Blaser M.J.: Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 2927–2933 (2007)
35. Grice E.A., Segre J.A.: The skin microbiome. *Nature Rev. Microbiol.* **9**, 244–253 (2011)
36. Grice E.A., Segre J.A. i wsp.: Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science*, **324**, 1190–1192 (2009)
37. Guo R., Zheng N., Lu H., Yin H., Yao J., Chen Y.: Increased diversity of fungal flora in the vagina of patients with recurrent vaginal candidiasis and allergic rhinitis. *Microb. Ecol.* **64**, 918–927 (2012)
38. Hannigan G.D., Meisel J.S., Tyldsley A.S., Zheng Q., Hodgkinson B.P., SanMiguel A.J., Minot S., Bushman F.D., Grice E.: The human skin double-stranded DNA virome: topographical and temporal, genetic enrichment and dynamic associations with the host microbiome. *mBio*, **6**, e01578–15 (2015)
39. He X., Shi W.: Oral microbiology: past, present and future. *J. Oral. Science*, **2**, 47–58 (2009)
40. Hoffmann A.R., Proctor L.M., Surette M.G., Suchodolski J.S.: The microbiome: the trillions of microorganisms that maintain health and cause disease in humans and companion animals. *Vet. Pathol.* **53**, 10–21 (2016)
41. Hoffmann C., Dollive S., Grunberg S., Chen J., Li H., Wu G.D., Lewis J.D., Bushman F.D.: Archea and fungi of the human gut microbiome: Correlations with diet and bacterial residents. *PLoS One*, **8**, e66019 (2013)
42. Holland K.T., Bojar R.A.: Cosmetics: what is their influence on the skin microflora?, *Am. J. Clin. Dermatol.* **3**, 445–449 (2002)
43. Holland K.T., Knapp J.S., Shoesmith J.G.: *Anaeroba bacteria*. Blackie & Son, New York 1987.
44. Hooper L.V., Gordon J.I.: Commensal Host-Bacterial Relationships in the Gut. *Science*, **292**, 1115–1118 (2001)
45. Horz H.P., Conrads G.: The discussion goes on: what is role of Euryarchaeota in humans? *Archaea*, DOI: 10.1155/2010/967271 (2010)
46. Hu J., Han S. Chen Y., Ji Z.: Variations of tongue coating microbiota in patients with gastric cancer. *Biomed. Res. Int.* DOI: 10.1155/2015/173729 (2015)
47. Huynh H.Y.Y., Verneau J., Levasseur A., Drancourt M., Aboudharam G.: Bacteria and archea paleomicrobiology of the dental calculus: a review. *Mol. Oral. Microbiol.* DOI: 10.1111/omi.2118 (2015)
48. Hyman R.W., Fukushima M., Diamond L., Kumm J., Giudice L., Davis R.W.: Microbes on the human vaginal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 7952–7957 (2005)
49. Jenkinson H.F., Lamont R.J.: Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends. Microbiol.* **12**, 589–595 (2005)
50. Kapusinszky B., Minor P., Delwart E.: Nearly constant shedding of diverse enteric viruses by two healthy infants. *J. Clinical. Microbiol.* **50**, 3427–3434 (2012)
51. Kong H.H., Segre J.A.: The skin microbiome: looking back to move forward. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 933–939 (2012)
52. Krakowiak O., Nowak R.: Mikroflora przewodu pokarmowego człowieka – znaczenie, rozwój, modyfikacje. *Post. Fit. 3*, 193–200 (2015)
53. Lagier J.C., Armougom F., Million M., Hugon P., Pagnier I., Robert C., Bittar F., Fournous G., Gimnez G., Maraninchi M., Trape J.F., Koonin E.V., La Scola B., Raoult D.: Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**, 1185–1193 (2012)
54. La Scola B., Marrie T.J., Auffray J.P., Raoult D.: Mimivirus in pneumonia patients. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 449–452 (2005)
55. Lecuit M., Eloit M.: The human virome: new tools and concept. *Trends Microbiol.* **21**, 510–515 (2013)
56. Ley R.E., Peterson D.A., Gordon J.I.: Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, **124**, 287–293 (2006)
57. Leyden J.J., McGinley K.J., Nordstrom K.M., Webster G.F.: Skin microbiota. *J. Invest. Dermatol.* **88**, 65–72 (1987)
58. Libudzisz Z., Żakowska Z., Kowal K.: *Mikrobiologia techniczna tom 1*. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2015
59. Lina G., Boutite F., Tristan A., Bes M., Etienne J., Vandensch F.: Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of *Staphylococcal agr* alleles. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 18–23 (2003)
60. Lung HIV Microbiome Project, <https://lhmp.bsc.gwu.edu> (17.05.2016 r.)
61. Ma B., Forney L.J., Ravel J.: The vaginal microbiome: rethinking health and diseases. *Annu. Rev. Microbiol.* **66**, 371–389 (2012)
62. Malinowska M., Tokarz-Deptuła B., Deptuła W.: Mikrobiom układu oddechowego w warunkach w warunkach fizjologicznych i patologicznych. *Post. Mikrobiol.* 2016 (w druku)

63. Mu C., Yang Y., Zhu W.: Gut microbiota: the brain peacekeeper. *Front. Microbiol.* **7**, 1–11 (2016)
64. Marples R.R.: Sex, constancy, and skin bacteria. *Arch. Dermatol. Res.* **272**, 317–320 (1982)
65. Marsland B.J., Gollwitzer E.S.: Host-microorganism interactions in lung disease. *Nature*, **14**, 827–835 (2014)
66. Marshall B.J., Warren J.R.: Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*, **321**, 1273–1275 (1983)
67. Martinsen T.C., Bergh K., Waldum H.L.: Gastric juice: a barrier against infectious disease. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **96**, 94–102 (2005)
68. Minot S., Sinha R., Chen J., Li H., Keilbaugh S.A., Wu G.D., Lewis J.D., Bushman F.D.: The human gut virome: inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome Res.* **21**, 1616–1625 (2011)
69. Naidu M., Robles-Sikisaka R., Abeles S.R., Boehm T.K., Pride D.T.: Characterization of bacteriophage communities and CRISPR profiles from dental plaque. *BMC Microbiol.* DOI: 10.1186/1471-2180-14-175 (2014)
70. Nasidze I., Li J., Quinque D., Tang K., Stoneking M.: Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Res.* **19**, 636–643 (2009)
71. Nelson K.E.: *Metagenomics of the human body*. Springer Science + Business Media. London, 2011.
72. Ngyen L.D., Viscogliosi E., Delhaes L.: The lung mycobiome: an emerging field of the human respiratory microbiome. *Front Microbiol.* DOI: 10.3389/fmicb.2015.00089 (2015)
73. Noble W.C.: Skin bacteriology and the role of *Staphylococcus aureus* in infection. *Br. J. Dermatol.* **139**, 9–12 (1998)
74. O'Hara A.M., Shanahan F.: The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* **7**, 688–693 (2006)
75. Olsen I., Namork E., Myhrvold V.: Electron microscopy of phages in serotypes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral. Microbiol. Immunol.* **8**, 383–385 (1993)
76. Oxley A.P., Lanfranchi M.P.: Halophili archaea in the human intestinal mucosal. *Environ. Microbiol.* **12**, 2398–2410 (2010)
77. Pagnier I., Ikanga reteno D.-G., Saadi H., Boughalmi M., Gaia M., Slimani M., Ngounga T., Beklitz M., Colson P., Raoult D., La Scola B.: A decade of improvements in Mimiviridae and Marseilleviridae isolation from amoeba. *Intervirology*, **56**, 354–363 (2013)
78. Paulino L.C., Tseng C.T., Strober B.E., Blaser M.J.: Molecular analysis of fungal microbiota in samples from healthy human skin and psoriatic lesion. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 2933–2941 (2006)
79. Popgeorgiev N., Temmam S., Raoult D., Desnues C.: Describing the silent human virome with an emphasis in giant viruses. *Intervirology*, **56**, 395–412 (2013)
80. Preus H.R., Olsen I., Namork E.: Association between bacteriophage-infected *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and rapid periodontal destruction. *J. Clin. Periodontol.* **14**, 245–247 (1987)
81. Pride D.T., Salzman J., Haynes M., Rohwer F., Davis-Long C., White R.A., Loomer P., Armitage G.C., Relman D.A.: Evidence of a robust resident bacteriophage population revealed through analysis of the human salivary virome. *ISME J.* **6**, 915–26 (2012)
82. Probst A.J., Auerbach A.K., Miossl-Eichinger C.: Archaea on Human skin. *PLoS One*, **8**, e65388 (2013)
83. Qin J., Wang J. i wsp.: A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, **490**, 55–60 (2012)
84. Rasmussen T.T., Kirkeby L.P., Poulsen K., Reinholdt J., Kilian M.: Resident aerobic microbiota of the adult human nasal cavity. *APMIS*, **108**, 663–675 (2000)
85. Robles-Sikisaka R., Ly M., Boehm T., Naidu M., Salzman J., Pride D.T.: Association between living environment and human oral viral ecology. *ISME J.* **7**, 1710–1724 (2013)
86. Roth R.R., James W.D.: Microbial ecology of the skin. *Annu. Rev. Microbiol.* **42**, 444–464 (1988)
87. Saadi H., Pagnier I., Colson P., Kanonou Cherif J., Beji M., Boughalmi M., Azza S., Armstrong N., Robert C., Fournous G., La Scola B., Raoult D.: First isolation of Mimivirus in a patient with pneumonia. *CID* **57**, e127 (2013)
88. Seed P.C.: The human mycobiome. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* (2014) DOI 10.1101/cshperspect.a019810.
89. Sekirov L., Russell S.L., Antunes L.C., Finlay B.B.: Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.* **90**, 859–904 (2010)
90. Sheh A., Foz J.G.: The role of the gastrointestinal microbiome in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Gut Microbes*, **6**, 505–531 (2013)
91. Shulman S.T., Friedmann H.C., Sims R.H.: Theodor Escherich: The First Pediatric Infectious Diseases Physician? *Clin. Infect. Dis.* **45**, 1025–1029 (2007)
92. Stevens R.H., Preus H.R., Dokko B., Russell D.T., Furgang D., Schreiner H.C., Goncharoff P., Figurski D.H., Fine D.H.: Prevalence and distribution of bacteriophage phi Aa DNA in strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **119**, 329–337 (1994)
93. Struzycka I.: The oral microbiome in dental caries. *Pol. J. Micro.* **63**, 127–135 (2014)
94. Underhill D.M., Illiev I.D.: The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nature Rev. Immunol.* **14**, 405–416 (2014)
95. van Woerden H.C., Gregory C., Brown R., Marchesi J.R., Hoogendoorn B., Matthews I.P.: Differences in fungi present in induced sputum samples from asthma and non-atopic controls: a community based case control study. *BMC Infect. Dis.* DOI: 10.1186/1471-2334-13-69 (2013)
96. Vitali B., Cruciani F., Parolin C., Donders G., Laghi L.: Vaginal microbiome and metabolome highlight specific signatures of bacterial vaginosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **34**, 2367–2376 (2015)
97. Willner D., Furlan M., Haynes M., Schmieder R., Angly F.E., Silva J., Tammadoni S., Nosrat B., Conrad D., Rohwer F.: Metagenomic analysis of respiratory tract DNA viral communities in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis individuals. *PLoS ONE*, DOI: 10.1371/journal.pone.0007370 (2009)
98. Willner D., Haynes M. i wsp.: Metagenomic detection of phage-encoded platelet-binding factors in the human oral cavity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 4547–5325 (2011)
99. www.hmpdacc.org (31.05.2016)
100. www.homd.org (31.05.2016)
101. Yi H., Yong D., Cho YJ., Chun J.: Profiling bacterial community in upper respiratory tract. *BMC Infect. Dis.* DOI:10.1186/s12879-014-0583-3 (2014)
102. Zheng N.N., Guo X.C., Lu W., Chen X.X., Feng GF.: Characterization of the vaginal fungal flora in pregnant diabetic women by 18S rRNA sequencing. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **32**, 1031–1040 (2013)
103. Zhou X., Brown C., Abdo Z., Davis C.C., Hansmann M.A., Joyce P., Foster J.A., Forney L.J.: Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women. *ISME J.* **1**, 121–133 (2007)

Joanna Jadwiga Klim<sup>1</sup>, Renata Godlewska<sup>1\*</sup>

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

Wpłynęło w czerwcu 2016 r.  
Zaakceptowano we wrześniu 2016 r.

1. Wprowadzenie. 2. Biogeneza pęcherzyków zewnątrzblonowych. 3. Funkcje pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. 3.1. Udział w odpowiedzi na czynniki stresogenne. 3.2. Udział w transporcie pozakomórkowym. 3.3. Udział w tworzeniu biofilmu. 4. Pęcherzyki zewnątrzblonowe w konstrukcji szczepionek. 4.1. *Neisseria meningitidis*. 4.2. *Vibrio cholerae*. 4.3. *Bordetella pertussis*. 4.4. *Chlamydia trachomatis*. 4.5. *Burkholderia pseudomallei*. 4.6. *Acinetobacter baumannii*. 4.7. *Francisella noatunensis*. 4.8. *Shigella* spp. 4.9. *Campylobacter jejuni*. 5. Podsumowanie

#### Application of the bacterial outer membrane vesicles in vaccine design

**Abstract:** Outer membrane vesicles (OMVs) are extracellular structures produced by most gram-negative bacteria, including pathogens of humans and animals. OMVs play an important role in the physiology of microorganisms and are an integral part of many biological processes. Following the discovery that they are able to transport many biomolecules, also these which have the ability to interact with the immune system, their potential use as non-replicating vaccines has become an important aspect of immunotherapeutic researches. These nano-sized elements exhibit remarkable potential for immunomodulation of immune response, thanks to the ability to deliver naturally or artificially incorporated antigens within their structure. First vaccine based on outer membrane vesicles was developed almost 30 years ago against *Neisseria meningitidis* serogroup B. This review presents some basic information on biogenesis and functions of OMVs. It also provides examples of pathogens, whose OMVs (in natural or modified form) have been used in the development of immunogenic vaccines against the organisms from which the vesicles had been obtained. OMVs are proving to be more versatile than first conceived and may become important part of biotechnology research, not limited to medical applications.

1. Introduction. 2. Outer membrane vesicles biogenesis. 3. Biological functions of outer membrane vesicles. 3.1. Role in response to stressors. 3.2. Role in the extracellular transport. 3.3. Role in biofilm formation. 4. OMVs in vaccine construction. 4.1. *Neisseria meningitidis*. 4.2. *Vibrio cholerae*. 4.3. *Bordetella pertussis*. 4.4. *Chlamydia trachomatis*. 4.5. *Burkholderia pseudomallei*. 4.6. *Acinetobacter baumannii*. 4.7. *Francisella noatunensis*. 4.8. *Shigella* spp. 4.9. *Campylobacter jejuni*. 5. Conclusions

**Słowa kluczowe:** antygeny rekombinowane, immunomodulacja, pęcherzyki zewnątrzblonowe (OMVs – *outer membrane vesicles*), szczepionki nowej generacji

**Key words:** immunomodulation, new generation vaccines, outer membrane vesicles, recombinant antigens

## 1. Wprowadzenie

Pęcherzyki zewnątrzblonowe (OMVs – *outer membrane vesicles*) – to sferyczne struktury uwalniane z powierzchni komórek bakterii Gram-ujemnych. Po raz pierwszy zaobserwowano je 50 lat temu podczas analizy zdjęć z mikroskopu elektronowego komórek szczepu mutanta *E. coli* hodowanych w warunkach niedoboru lizyny. Wiele bakterii otoczonych było charakterystycznymi pęcherzykami (blebs), często połączonymi z błoną zewnętrzną. W czasie prowadzenia hodowli zmiana ulegała morfologia osłon bakterii, przy jednoczesnym braku wzrostu ilości komórek ulegających lizie [40].

Za początek badań nad OMVs uważa się eksperyment przeprowadzony w 1959 roku. Naukowcy zaobserwowali odpowiedź immunologiczną u królików po podaniu im wolnego od bakterii supernatantu po hodowli *Vibrio cholerae*. Wtedy podejrzewano, że za

reakcję układu odpornościowego odpowiedzialne są składniki błony zewnętrznej (OM – *outer membrane*), które z niejasnych przyczyn pozostają w oczyszczonym płynie pochodzącym [15].

Wielkość OMVs waha się w przedziale od 20 do 300 nm i w głównej mierze zależy od szczepu producenta [7]. Do tej pory opisano wiele gatunków mikroorganizmów zdolnych do wytwarzania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, w tym liczne grono bakterii patogennych, takich jak: *Neisseria meningitidis*, *Legionella pneumophila*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Porphyromonas gingivalis* czy *Campylobacter jejuni*.

Pęcherzyki zewnątrzblonowe składają się z podwójnej błony lipidowej, która podobnie jak błona zewnętrzna bakterii zbudowana jest z lipopolisacharydu, fosfolipidów oraz białek błonowych. Skład białkowy różni się w zależności od gatunku producenta i od warunków hodowli bakterii [41]. Obok białek

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

pochodzących z peryplazmy coraz częściej wskazuje się na obecność w świetle pęcherzyków również białek cytoplazmatycznych i białek związanych z błoną wewnętrzną bakterii (IM – inner membrane). Początkowo podejrzewano, że jest to wynik źle przeprowadzonych izolacji OMVs lub ma to związek z zanieczyszczeniami pochodzącymi ze zlizowanych komórek. Jednakże po dopracowaniu protokołu oczyszczania OMVs w dalszym ciągu identyfikowano białka pochodzenia cytoplazmatycznego [42].

Pęcherzyki obok białek mogą zawierać również kwasy nukleinowe. Po raz pierwszy obecność DNA wykazano w przypadku OMVs *Haemophilus parainfluenzae* [36]. Podobnie jak w przypadku białek cytoplazmatycznych obecność DNA w tych strukturach zewnątrzkomórkowych uważano za artefakty preparatyki. Sugerowano, że kwas deoksyrybonukleinowy wiąże się do dodatnio naładowanej powierzchni pęcherzyka, ale potraktowanie OMVs deoksyrybonukleazami potwierdziło, że identyfikowane fragmenty DNA znajdowały się w świetle pęcherzyków [58].

Jak się okazuje, zdolność do produkcji pęcherzyków nie jest jedynie domeną bakterii Gram-ujemnych. Otóż Gurung i wsp. wykazali, że *Staphylococcus aureus* wytwarza tzw. pęcherzyki błonowe (MVs – membrane – derived vesicles) będące pochodną błony cytoplazmatycznej i składające się głównie z białek obecnych w cytoplazmie, związanych z błoną, jak również z białek sekrecyjnych [25]. Wcześniej zjawisko to opisano dla *Bacillus anthracis* [59] i dwóch przedstawicieli archeonów [18, 56].

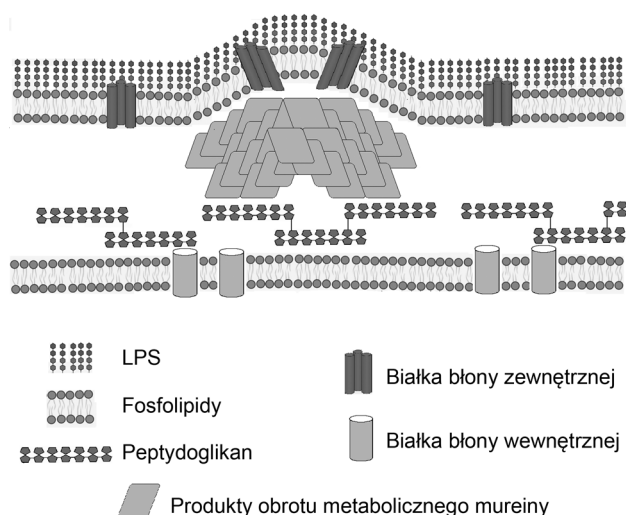
## 2. Biogeneza pęcherzyków zewnątrz błonowych

Ścieżka syntezy pęcherzyków nie jest znana. Istnieje kilka hipotez wyjaśniających mechanizmy tego procesu.

Pierwsza z nich zakłada, że OMVs tworzą się wtedy, gdy synteza mureiny zachodzi wolniej niż leżącej nad nią błony zewnętrznej. Rozrastająca się błona podlega wyrzucaniu, a jej nadmiar ostatecznie odrywa się od komórki w postaci pęcherzyka.

Drugi zaproponowany model odnosi się do obrotu metabolicznego peptydoglikanu (Rys. 1). U bakterii Gram-ujemnych struktury cukrowo-peptydowe powstałe w czasie reorganizacji ściany komórkowej nie są uwalniane poza komórkę, lecz są zatrzymywane w peryplazmie przez co mogą fizycznie oddziaływać na OM prowadząc do jej fałdowania i powstania OMVs [84]. Model ten nie tłumaczy jednak jak cząsteczki pochodzące z cytoplazmy pakowane są do OMVs.

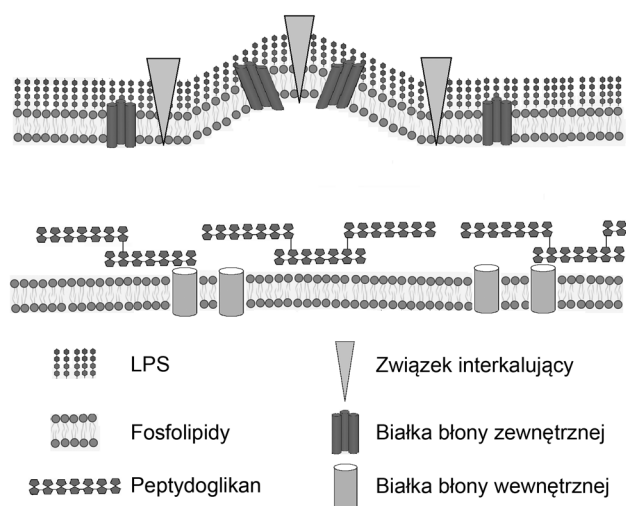
Część naukowców wskazuje, że przyczyną powstawania pęcherzyków zewnątrz błonowych jest obecność w błonie zewnętrznej ujemnie naładowanych cząsteczek lipopolisacharydu. Błona zewnętrzna patogennej



Rys. 1. Powstawanie pęcherzyków zewnątrz błonowych jako wynik obrotu metabolicznego mureiny

bakterii *Pseudomonas aeruginosa* składa się z dwóch rodzajów lipopolisacharydu, z czego jeden z nich posiada silnie ujemny ładunek. Okazuje się, że OMVs tworzą się głównie w miejscach, w których występuje LPS o silnie ujemnym ładunku, co potwierdza jego przeważająca zawartość w błonach pęcherzyków. Najprawdopodobniej dzieje się tak dlatego, że długie, ujemnie naładowane łańcuchy lipopolisacharydu odpychają się od siebie powodując uwypuklenie i fałdowanie błony zewnętrznej, które ostatecznie kończy się powstaniem pęcherzyka [35].

Kolejny mechanizm wyjaśniający zjawisko powstawania OMVs związany jest z oddziaływaniem na błonę zewnętrzną bakterii pozakomórkowych cząsteczek sygnałowych [46]. Naukowcy udowodnili, że niektóre związki powiązane ze zjawiskiem quorum-sensing u bakterii, silnie łączą się z OM (Rys. 2). Wbudowując



Rys. 2. Powstawanie pęcherzyków zewnątrz błonowych jako wynik oddziaływania związków interkalujących w strukturę OM

się w jej strukturę powodują odpychanie łańcuchów lipopolisacharydu i wiązanie jonów metali, co pogłębia proces dezorganizacji błony i ostatecznie powoduje jej fałdowanie i oderwanie pęcherzyka.

Tworzenie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych może bezpośrednio wynikać ze zmiany składu białkowego OM. Błona zewnętrzna połączona jest z peptydoglikanem i błoną wewnętrzną za pomocą specyficznych białek, których ilość wpływa na poziom integralności tych elementów. Zaobserwowano, że mutanty *Salmonella enterica* sv. Typhimurium LT2 pozbawione ekspresji niektórych białek zapewniających łączność osłon (np. LppAB, OmpA, TolB, TolA czy Pal) charakteryzują się podwyższoną produkcją OMVs [16].

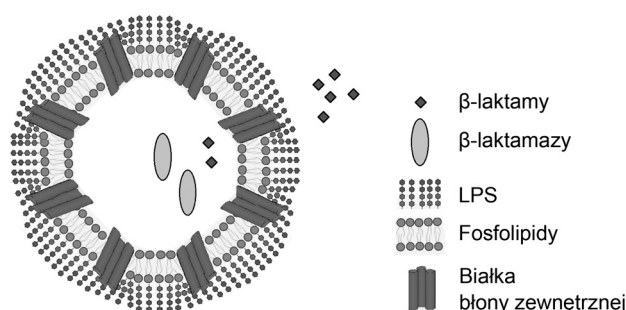
Kolejna z hipotez opiera się na założeniu, że istnieją białka, których nadprodukcja w komórce powoduje wzmożone wydzielanie pęcherzyków. Przykładem może być białko PagC wyrażane w komórkach *Salmonella enterica* w sytuacji, gdy bakteria znajduje się w fagosomie makrofaga. Badania potwierdziły istnienie pozytywnej korelacji między ilością PagC, a produkcją pęcherzyków. Co więcej, stwierdzono, że wraz ze wzrostem poziomu tego białka nie tylko proces powstawania OMV ulega przyspieszeniu, ale również rośnie ilość uwalnianych OMVs [37].

### 3. Funkcje pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

Dawniej stwierdzenie, że pęcherzyki zewnątrzblonowe, to struktury niezbędne do przetrwania bakterii budziłyby liczne sprzeczności. Dziś, w obliczu tego co wiadomo na ich temat nie dziwi fakt, że większość badaczy jest zdania, że OMVs odgrywają bardzo istotną rolę w fizjologii bakterii Gram-ujemnych i stanowią nieodłączny element wielu procesów biologicznych. Niektóre z tych ról opisano poniżej.

#### 3.1. Udział w odpowiedzi na czynniki stresogenne

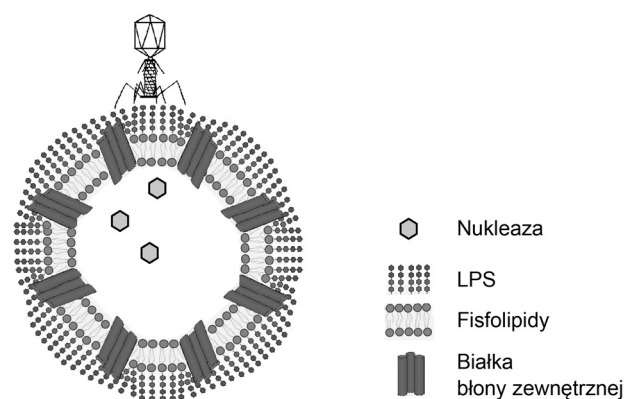
W warunkach stresu, np. w przypadku obecności toksyn, antybiotyków lub podczas narażenia na czynniki uszkadzające powierzchnię komórek, zwykle rośnie ilość wydzielanych pęcherzyków. Dzięki produkcji OMVs komórki są w stanie sprawnie pozbyć się szkodliwych substancji i źle zwiniętych białek. Mimo, że indukcja wydzielania OMVs wymaga znacznych nakładów energii, korzyści związane z tym procesem są niewspółmierne do poniesionych kosztów [47]. Mutanty *E. coli*, wykazujące ekstremalnie wysoki stopień wydzielania OMVs charakteryzowały się wyższą przeżywalnością na podłożu z polimyksyną B w porównaniu do szczepu dzikiego [45]. Ciekawym przykładem jest sposób eliminowania antybiotyków  $\beta$ -laktamowych przez *Pseudomonas aeruginosa*. Szczep *P. aeruginosa*



Rys. 3. Degradacja antybiotyków  $\beta$ -laktamowych przez  $\beta$ -laktamazy w świetle pęcherzyka

oporny na te antybiotyki wytwarza pęcherzyki zewnątrzblonowe zawierające  $\beta$ -laktamazy (Rys. 3). Dzięki temu, że błona OMVs podobnie jak OM zawiera porony tworzące kanały dyfuzyjne,  $\beta$ -laktamy obecne w środowisku dyfundują do wnętrza pęcherzyków, a następnie ulegają inaktywacji przez znajdujące się tam enzymy [63].

Bakterie wykształciły różne mechanizmy zwalczania fagów, do których zaliczyć również można produkcję OMVs (Rys. 4). Stwierdzono, że wynikiem interakcji bakteriofaga T4 z pęcherzykami zewnątrzblonowymi *E. coli* jest nieodwracalna utrata aktywności faga. Powyższe badania popierają koncepcję, iż OMVs mogą stanowić „przynętę” w celu ochrony komórek przed czynnikami przeciwdrobnoustrojowymi [44].



Rys. 4. Produkcja pęcherzyków zewnątrzblonowych w celu ochrony komórek przed atakiem fagów

#### 3.2. Udział w transporcie pozakomórkowym

Pęcherzyki zewnątrzblonowe zaangażowane są w transport szeregu związków, m.in. biorą udział w transferze DNA [81] i dostarczają do komórek eukariotycznych wiele czynników wirulencji, które znajdują się – zarówno w świetle pęcherzyka jak i na jego powierzchni [45]. Najważniejszą zaletą transportu pęcherzykowego jest to, że substancja dostarczana jest do docelowej lokalizacji w relatywnie wysokim stężeniu, a sam transport może odbywać się na większe

odległości w porównaniu do typowej sekrecji. Może on przebiegać na drodze fuzji błony OMV i błony komórki docelowej, internalizacji pęcherzyka w procesie fagocytozy lub poprzez przyczepienie się pęcherzyka do komórki docelowej i jego częściowej lizy [8, 23, 34].

OMVs biorą także udział w przenoszeniu enzymów wspomagających bakterie w zdobywaniu niezbędnych składników odżywczych i pierwiastków. Proteazy, tak jak np. aminopeptydazy *P. aeruginosa* transportowane zarówno w świetle jak i na powierzchni pęcherzyków pozwalają na degradację związków wielkocząsteczkowych i uwalnianie do środowiska aminokwasów, które mogą mieć decydujące znaczenie dla przetrwania bakterii w określonych warunkach [5]. Podobnie ma się sprawa z jonami metali w sytuacji ich niedoboru w środowisku. Błona pęcherzyka może zawierać specyficzne białka odpowiedzialne za wiązanie jonów na jego powierzchni, co pozwala na koncentrację ich stężenia w sąsiedztwie bakterii [42].

### 3.3. Udział w tworzeniu biofilmu

Jedną z reakcji bakterii na stres jest wytwarzanie wielokomórkowych, skomplikowanych struktur otoczonych pozakomórkową matryks. Ostatnie badania wskazują na dodatnią korelację pomiędzy ilością wydzielanych pęcherzyków, a zdolnością bakterii do tworzenia

biofilmu [6]. W przypadku *Helicobacter pylori* OMVs zaangażowane są w proces agregacji komórek [82]. Sugeruje się również, że pęcherzyki pełnią funkcję pośrednika w interakcji komórek bakteryjnych, egzopolisacharydów, DNA i białek z powierzchnią, do której przytwierdzony jest dany biofilm [65].

W przedstawionej poniżej tabeli (Tab. I) zebrano przykłady funkcji pęcherzyków w różnych procesach fizjologicznych wraz z przykładami bakterii je produkującymi.

### 4. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe w konstrukcji szczepionek

Infekcje bakteryjne są wciąż jedną z głównych przyczyn hospitalizacji milionów ludzi na świecie. Leczenie chorób bakteryjnych staje się coraz trudniejsze ze względu na szybkie rozprzestrzenianie się i wzrost liczby szczepów opornych na stosowane w leczeniu antybiotyki. Za najlepszy sposób radzenia sobie z infekcjami w trwającej właśnie „erze postantybiotykowej” uznaje się immunizację społeczeństwa – czyli stosowanie szczepionek. Tradycyjne szczepionki opierają się na zastosowaniu żywych, atenuowanych komórek bądź zabitych patogenów lub na zastosowaniu anatoksyn – czyli toksyn pozbawionych zjadliwości, ale o zachowanych właściwościach antygenowych. Niestety, dla wielu patogenów skonstruowanie bezpiecznej, skutecznej i w pełni specyficznej szczepionki, której produkcja opierałaby się na klasycznych metodach otrzymywania nie jest możliwe.

Po odkryciu, że OMVs transportują wiele biomolekuł wykazujących zdolność do wywołania przeciwnie sobie odpowiedzi układu odpornościowego, ich potencjał jako niereplikujących szczepionek nowej generacji stał się ważnym aspektem badań immunoterapeutycznych [75].

Pierwsza szczepionka zawierająca pęcherzyki zewnątrzkomórkowe opracowana została prawie 30 lat temu. Był to preparat przeciwko meningokokowemu zapaleniu opon mózgowo-rdzeniowych, które wywołuje *Neisseria meningitidis* serotyp B. Skuteczność tej szczepionki sięgała ponad 80% [68].

W rzeczywistości, do roku 2010 jedynymi komercyjnie dostępnymi szczepionkami opartymi na OMVs były te skierowane przeciwko *Neisseria meningitidis*. Sukcesy związane z ich medycznym zastosowaniem skłoniły naukowców do badań nad właściwościami pęcherzyków zewnątrzkomórkowych innych bakterii Gram-ujemnych. Szczególnie istotnym aspektem tych badań było określenie w jakim stopniu pęcherzyki wpływają na układ odpornościowy i czy są one zdolne do wywołania swoistej odpowiedzi immunologicznej. Na podstawie powyższych kryteriów wyłoniono wiele bakterii patogennych, których OMVs w przyszłości

Tabela I  
Przykłady funkcji OMVs powiązanych z wybranymi procesami fizjologicznymi [za 45]

Funkcja	Przykłady bakterii Gram-ujemnych
Transport DNA Transformacja	<i>A. tumefaciens</i> , <i>B. burgdorferi</i> , <i>E. coli</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sv. <i>Typhimurium</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>Y. pestis</i>
Transport innych cząsteczek (w tym czynników wirulencji)	<i>E. agglomerans</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>M. morgani</i> , <i>N. meningitidis</i> , <i>P. trifolii</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. fragi</i> , <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sv. <i>Typhimurium</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>V. cholerae</i>
Odpowiedź na czynniki stresogenne działające na osłony komórkowe	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sv. <i>Typhimurium</i>
Ochrona przed czynnikami antydrobnoustrojowymi	<i>E. coli</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. putida</i>
Tworzenie i utrzymanie biofilmu	<i>H. pylori</i> , <i>P. aeruginosa</i>
Biominalizacja Absorbacja UV Działanie owadobójcze Reaktywność redoks	<i>S. putrefaciens</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>X. nematophilus</i>

mogłyby posłużyć w konstrukcji szczepionek. Są to m.in. *Acinetobacter baumannii*, *Brucella melitensis*, *Francisella novicida*, *Haemophilus influenzae*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae*, *Treponema pallidum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Borrelia burgdorferi*, *Bordetella pertussis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pestis* i wiele innych [13, 60]. Niektóre z przykładów przedstawiono bardziej szczegółowo poniżej.

#### 4.1. *Neisseria meningitidis*

Co roku z powodu zakażeń *N. meningitidis* choruje 1,2 mln ludzi na całym świecie, z czego 10% umiera. Ta będąca dwoinką bakteria, należąca do klasy Betaproteobacteria kolonizuje błony śluzowe górnych dróg oddechowych człowieka (występuje jako normalna flora bakteryjna w nosogardzieli 5–15% dorosłych osób), z których czasami przechodzi do płynu mózgowo-rdzeniowego i krwiobiegu, powodując zagrażające życiu zapalenie opon mózgowych i posocznicę [72].

Do tej pory zidentyfikowano trzynaście grup serologicznych *N. meningitidis* w oparciu o antygenowe różnice polisacharydów otoczki. Najpowszechniejszymi z nich są serogrupy: A, B, C, W i Y, które odpowiadają za 90% wszystkich zachorowań na meningokokowe zapalenie opon mózgowych na świecie.

W przypadku meningokoków, polisacharydowa otoczka okazała się być cennym narzędziem w tworzeniu skutecznych szczepionek, niestety z wyłączeniem grupy serologicznej B, która odpowiada za 30–80% zachorowań mieszkańców krajów Ameryki Łacińskiej, Europy i USA. Otóż serotyp B *Neisseria meningitidis* zawiera w osłonach homopolimery kwasu N-acetylonauraminowego, które wchodzą w skład ludzkich glikoprotein w tkance mózgu [22]. To determinowało niską immunogenność szczepionki tworzonej na bazie otoczki [80]. Dopiero zastosowanie OMVs pozwoliło na stworzenie skutecznego preparatu. Prace nad szczepionką rozpoczęto od wytypowania potencjalnie najlepszych antygenów. Odpowiednimi kandydatami okazały się białka PorA i PorB, ze względu na wysoki poziom ekspresji w komórce i wysoką immunogenność [66]. OMVs do produkcji szczepionek uzyskiwano przy użyciu ekstrakcji detergentem, otrzymując tzw. dOMVs. Metoda ta pozwala na produkcję jednorodnych pęcherzyków ze zmniejszoną zawartością lipopolisacharydu, będącego silną endotoksyną, ale wciąż na poziomie, który zapewnia utrzymanie prawidłowej struktury pęcherzyka i wzmocnienie poszczepiennej odpowiedzi na podane antygeny.

Skonstruowane w ten sposób szczepionki, tzw. I generacji (first-generation vaccines based on outer membrane vesicles) okazały się być skuteczne, ale w wąskim zakresie, co wynika z dużej różnorodności białek PorA i PorB wśród szczepów serogrupy B [73].

Dzięki analizie genomu szczepu MC58 *N. meningitidis* zidentyfikowano 350 genów potencjalnych antygenów, które następnie wprowadzano do komórek *Escherichia coli*. Nadprodukcja badanych białek w heterologicznym gospodarzu i immunizacja myszy tak przygotowanymi antygenami umożliwiła wyłonienie najbardziej immunogennych cząsteczek [55]. Ostatecznie, do konstrukcji szczepionki wybrano 5 antygenów, które połączono w rekombinowane białka, w tym:

- NHBA (*Neisseria heparin binding antigen*) – antygen *Neisseria* wiążący heparynę
- NadA (*Neisseria meningitidis adhesin A*) – adhezyna A biorąca udział w inwazji bakterii na komórkę nabłonkową
- fHbp (*factor H binding protein*) – białko wiążące surowiczy czynnik H

Badania na zwierzętach dowiodły znacznej skuteczności i szerszego zakresu ochrony przed zakażeniami *N. meningitidis* serotypem B, w porównaniu do wcześniej stosowanych szczepionek I generacji [67]. Nową szczepionkę o nazwie Bexsero®, opatentowaną przez firmę Novartis do 2014 roku dopuszczono do użytku w 34 krajach, w tym w Kanadzie, Australii i państwach Unii Europejskiej. Firma Novartis zapoczątkowała erę szczepionek nowej generacji (next generation OMVs vaccines).

Kaaijk i wsp. powrócili do pomysłu szczepionki z białkiem PorA. Stworzyli genetycznie zmodyfikowany szczep, który wyraża różne warianty tego białka. Tak powstały szczepionki HexaMen® (zawierająca pęcherzyki dwóch szczepów, wyrażających po trzy różne wersje białka PorA) i NonaMen® (trzy różne szczepy, każdy wyrażający trzy różne warianty PorA). Jak wynika z badań klinicznych, oba preparaty są skuteczne, dobrze tolerowane i bezpieczne w użyciu [33].

Kolejnym krokiem w rozwoju szczepionek przeciwko serotypowi B *N. meningitidis* opartych na OMVs było stworzenie preparatów o obniżonej zawartości lipopolisacharydu, tak by ich produkcja wykluczała konieczność stosowania ekstrakcji detergentem. Metoda ta skutkuje utratą wielu lipoprotein, co obniża ogólny potencjał immunogeny pęcherzyków [76]. Problem rozwiązano dzięki odkryciu genu *lpxL1*. Mutacja w tym genie związana jest z modyfikacją lipidu A, która skutkuje obniżeniem toksyczności lipopolisacharydu, przy jednoczesnym braku wpływu na jego właściwości jako adiuwantu [77].

Obecnie trwają próby stworzenia multiwalentnej szczepionki przeciwko serogrupom A, W i X [51]. Serotypy te odpowiadają za większość zachorowań w Afryce. Do tej pory badaniu klinicznemu pierwszej fazy poddana jest biwalentna szczepionka z antygenami serotypów A i W, uzyskana ze szczepów najczęściej identyfikowanych w ogniskach zakaźnych meningokokowego zapalenia opon mózgowych [1].

Tabela II  
Przykłady szczepionek opartych o użycie OMVs przeciwko meningokokowemu zapaleniu opon mózgowych

Nazwa szczepionki	Charakterystyka	Producent
VA-MENGOC-BC*	Zaprojektowana do zwalczania wybuchu choroby meningokokowej na Kubie (przeciwko serogrupom B i C). Skuteczność ok. 80% [27].	Finlay Institute, Vacunas Finlay S.A.
MenBvac*	Opracowana w Norwegii w związku z epidemią choroby w latach 1988–91. Skuteczność sięga 87% [17].	Norwegian Institute of Public Health
MeNZB*	Opracowana w Norwegii, nigdy niedopuszczona do użytku w tym kraju. Stosowana podczas epidemii w Nowej Zelandii. Skuteczność ponad 75%.	Norwegian Institute of Public Health, Chiron Vaccines
Bexsero*	Szczepionka stymuluje wytwarzanie przeciwciał rozpoznających antygeny NHBA, NadA, fHbp i PorA. Wysoka skuteczność [2].	Novartis
Trumenba*	Produkt dopuszczony do użytku w USA od 2014 roku. Skład obejmuje dwa warianty białka fHbp. Preparat został uznany za całkowicie bezpieczny.	Pfizer
HexaMen*	Zawiera OMVs dwóch rekombinowanych szczepów – każdy z nich wyraża trzy warianty białka PorA. Skuteczność ponad 50% [52].	National Institute of Public Health and Environment (RIVM)
NonaMen*	Preparat zawiera OMVs trzech rekombinowanych szczepów – łącznie składa się z 9 wersji białka PorA. Szacowana skuteczność wynosi 80% [33].	National Institute of Public Health and Environment (RIVM)

W przedstawionej powyżej tabeli (Tab. II) zebrano informacje dotyczące opatentowanych szczepionek anty-*Neisseria* wraz z ich charakterystyką.

#### 4.2. *Vibrio cholerae*

Bakterie *Vibrio cholerae* należące do klasy Gamma-proteobacteria są czynnikiem etiologicznym cholery. Choroba ta przenoszona jest drogą fekalno-oralną i charakteryzuje się obfitą, wodnistą biegunką, prowadzącą do odwodnienia, a często także, w przypadku nieleczenia, do śmierci. Najważniejszymi czynnikami chorobotwórczymi *V. cholerae* jest produkcja pili TCP (toxin-coregulated pilus), które ułatwiają przyleganie do mikrokosmków gospodarza i uwalnianie egzotoksyny [38]. Od 2000 roku na świecie odnotowuje się stały wzrost liczby zachorowań na cholere. Duże ogniska epidemii występują w krajach rozwijających się na terenie Afryki i Azji. Według oficjalnych danych przekazanych do WHO, na świecie notuje się ok. 200 000 przypadków tej choroby rocznie. WHO ocenia jednak, że zgłaszanych jest jedynie 5–10% przypadków [62].

Do tej pory zidentyfikowano 200 serogrup tego gatunku, ale za epidemie cholery odpowiadają wyłącznie szczepy *V. cholerae* O1 i w mniejszym stopniu O139. Te dwie spokrewnione serogrupy wyróżnia unikalna kompozycja i struktura lipopolisacharydu w błonie. *V. cholerae* O1 dalej dzieli się na biotyp klasyczny i El Tor [11].

Na rynku farmaceutycznym istnieją komercyjnie dostępne szczepionki przeciwko *V. cholerae* na bazie zabitych bądź atenuowanych bakterii, niemniej jednak nie zapewniają one długoterminowej ochrony. Obecnie żadna szczepionka nie jest licencjonowana do użytku dla dzieci w wieku poniżej 2 lat i żaden z dostępnych na rynku preparatów nie chroni przed cholera wywołaną przez serotyp O139 [64].

Rozwiązaniem problemu może okazać się zastosowanie pęcherzyków zewnątrzblonowych. Schild i wsp. opublikowali badania, w których wykazali, że podanie myszom preparatów z oczyszczonymi OMVs *V. cholerae* (donosowo, dożołądkowo lub dootrzewnowo) wywołuje trwałą i wysoki poziom produkcji przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom obecnym w pęcherzykach, 1000-krotnie wyższy niż w grupie kontrolnej.

Co więcej, samica przekazuje przeciwciała przeciwko antygenom *V. cholerae* potomstwu, co chroni je przed zakażeniem [64]. W Indiach powstała multiwalentna szczepionka nazwana w skrócie CPMVs (*ch*olera *p*entavalent OMVs) z pęcherzyków zewnątrzblonowych pięciu szczepów, obejmujących serotypy O1, O139 i O6. Wyniki badań potwierdzają jej właściwości immunogenne i zdolność pobudzania układu odpornościowego myszy do produkcji przeciwciał różnych klas. W tym przypadku również potomstwo immunizowanych samic uzyskiwało odporność na zakażenia *V. cholerae*. Niewątpliwie CPMVs ma potencjał, by stać się podstawą licencjonowanej szczepionki przeciwko cholere, dlatego, że zapewnia ochronę przed większością chorobotwórczych szczepów [71].

#### 4.3. *Bordetella pertussis*

Krztusiec to ostra choroba układu oddechowego, charakteryzująca się nawracającymi napadami kaszlu i przedłużającą się dusznością. Chorobę wywołują pałeczki *Bordetella pertussis*, wykazujące wysokie powinowactwo do komórek rzęskowych nabłonka oddechowego. Patogeneza tego gatunku związana jest z produkcją adhezyn i toksyn. Choroba podlega transmisji poprzez kontakt bezpośredni lub kichanie. Szacuje się, że na całym świecie rocznie występuje ok. 20 milionów zachorowań. Obecnie na rynku farmaceutycznym dostępne są dwa rodzaje szczepionek przeciwko



krztuscowi: pierwsza z nich oparta jest na zastosowaniu zabitych bakterii, druga natomiast to preparat bezkomórkowy w skład którego wchodzi immunogenne składniki, takie jak fimbrie, toksyna krztuszcowa PT (pertussis toxin), hemaglutynina, i pertaktyna [43].

Pomimo szeroko zakrojonego programu szczepień, krztusiec powraca nie tylko wśród dzieci, lecz również wśród dorosłych. Przypuszczalnie odpowiedzialna za to jest zbyt niska skuteczność dostępnych preparatów immunogennych. Alternatywnym podejściem jest konstrukcja szczepionek na bazie OMVs.

Fernández i wsp. przeprowadzili badania z użyciem pęcherzyków, w których potwierdzili ich wysoką skuteczność w zapobieganiu chorobie, na mysim modelu krztusca. Po 2 tygodniach od podania szczepionki gryzoniom infekowano *B. pertussis*. Myszy immunizowane preparatem wykazywały wysoki poziom ochrony przed rozwojem choroby (wynoszący ok. 90%) w porównaniu do zwierząt, którym aplikowano roztwór PBS (ok. 12%). Po czterech dniach od infekcji, w wymazach z płuc osobników grupy badanej nie identyfikowano żywych bakterii, w przeciwieństwie do wymazów z narządów oddechowych grupy kontrolnej [20].

#### 4.4. *Chlamydia trachomatis*

Drobnoustroje z rodzaju *Chlamydia* sp. są pasywnymi wewnątrzkomórkowymi charakteryzującymi się cyklem życiowym, w którym bakterie występują w dwóch formach morfologicznych – jako zakaźne ciała elementarne (EBs – elementary bodies) i nieinfekcyjne ciała siateczkowate (RBs – reticulate bodies). *Chlamydia* sp. występują powszechnie w przyrodzie i wywołują wiele schorzeń u ludzi i zwierząt [53].

Początkiem konstrukcji szczepionki przeciw *Chlamydia trachomatis* były analizy *in silico* genomu bakterii, w celu wytypowania potencjalnie najbardziej immunogennych antygenów. Finco i wsp. wyselekcjonowali 120 białek, a do oceny ich immunogenności posłużyły eksperymenty mające na celu sprawdzenie zdolności stymulacji produkcji IFN- $\gamma$  i specyficznych limfocytów T (badania *in vitro* na splenocytach myszy). Ostatecznie wybrano 7 białek. Dalsze badania prowadzone były na ortologicznych odpowiednikach tych białek z *Chlamydia muridarum* na mysim modelu zapalenia płuc. Potwierdziły one wysoką skuteczność w indukcji odpowiedzi komórkowej i humoralnej [21]. Jednym z wytypowanych do badań białek była silnie konserwowana ewolucyjnie proteaza serynowa – HtrA (*high temperature requirement A protease*). Enzym odpowiada za usuwanie nieprawidłowo zwiniętych białek [12]. Gen proteazy *C. muridarum* został wprowadzony do komórek *E. coli*, a wyrażone białko identyfikowano w produkowanych przez *E. coli* pęcherzykach zewnątrzblonowych, którymi ostatecznie

immunizowano myszy BALB/c. Wynikiem była indukcja produkcji specyficznych przeciwciał anti-HtrA. Co więcej, badania *in vitro* udowodniły, że surowica myszy immunizowanych preparatem HtrA-OMVs neutralizuje zakażenia *Chlamydia* sp. na poziomie znacznie wyższym, niż surowica myszy immunizowanej tylko białkiem HtrA lub tylko OMVs [4]. Zgromadzone dane stanowią solidną podstawę do dalszych badań w kierunku zastosowania pęcherzyków jako bazy pod szczepionkę przeciwko *Chlamydia* sp.

#### 4.5. *Burkholderia pseudomallei*

Pałeczki *Burkholderia pseudomallei* wywołują melioidozę – tropikalną chorobę ludzi i zwierząt podobną w przebiegu do nosacizny, gruźlicy lub duru brzuszego. Może ona występować w jednej lub kilku postaciach klinicznych, np. jako ostre, miejscowe zakażenie, w postaci płucnej lub posocznicy. Często prowadzi do śmierci chorego. Do zakażenia dochodzi poprzez uszkodzoną skórę, drogi oddechowe lub przewód pokarmowy, a głównym źródłem pałeczek jest zanieczyszczona woda i gleba. Melioidoza występuje głównie w krajach południowej Azji i północnej Australii [79]. Choroba ta jest trudna w leczeniu ze względu na naturalną oporność *B. pseudomallei* na wiele antybiotyków. Obecnie na rynku nie ma żadnej komercyjnie dostępnej szczepionki przeciwko melioidozie, chociaż kilka preparatów jest testowanych w badaniach przedklinicznych [69].

Nieves i wsp. wykazali, że OMVs *B. pseudomallei* indukują produkcję specyficznych przeciwciał, nawet bez udziału egzogennej adiuwanty. Co więcej, badania na myszach udowodniły, że preparat immunogeny zawierający pęcherzyki zewnątrzblonowe podawany podskórnie zapewnia wysoki poziom ochrony w przypadku zakażenia *B. pseudomallei*, natomiast podawany donosowo nie wywołuje dostatecznego efektu ochronnego [49].

W późniejszych badaniach przeprowadzono również test aktywności bakteriobójczej surowicy. Szczep K96243 *B. pseudomallei* inkubowano w pożywce z dodatkiem bydlęcej surowicy płodowej – FBS (fetal bovine serum) lub z dodatkiem FBS wzbogaconej o surowicę myszy immunizowanych pęcherzykami zewnątrzblonowymi. Po inkubacji określano liczbę zdolnych do przeżycia bakterii wysiewając je w różnych rozcieńczeniach na podłoże stałe. Wyniki potwierdziły obecność we krwi gryzoni immunoglobulin skierowanych przeciwko *B. pseudomallei*. Po inkubacji z surowicą myszy wcześniej immunizowanych OMVs stwierdzono znaczny spadek ilości żywych bakterii. W przypadku inkubacji pałeczek *Burkholderia* w roztworze FBS zaobserwowano wzrost liczby bakterii w porównaniu do początkowej ich ilości [50].

#### 4.6. *Acinetobacter baumannii*

Wśród Gram-ujemnych pałeczek, do których zalicza się m.in. takie patogeny, jak *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* czy *Burkholderia cepacia* wyróżnić również można bakterie rodzaju *Acinetobacter*.

W praktyce najczęściej izoluje się szczepy należące do gatunku *A. baumannii*, które stanowią ponad 70% klinicznych izolatów. Bakterie te są patogenami oportunistycznymi odgrywającymi coraz większą rolę w zakażeniach pacjentów leczonych na oddziałach intensywnej terapii. Wywołują przede wszystkim zakażenia układu oddechowego, a także bakteriemie, zakażenia układu moczowego, skóry i ran czy zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych lub wsierdza. Rzadko powiązane są z zakażeniami pozaszpitalnymi.

Leczenie infekcji wywołanych przez *A. baumannii* jest trudne, ponieważ wysoki odsetek szczepów tych bakterii posiada oporność na wiele, a czasami na wszystkie skuteczne niegdyś antybiotyki [61].

W związku z tym, istnieje konieczność opracowania nowych leków, ale przede wszystkim konstrukcji skutecznej szczepionki anty-*Acinetobacter*.

Jun i wsp. udowodnili, że OMVs *A. baumannii* są cytotoksyczne w stosunku do komórek linii nabłonka ludzkiego (Hep-2). Uszkodzenia komórek oceniano przy użyciu mikroskopii odwróconej i za pomocą testu określającego stopień proliferacji komórek z użyciem WST 1 (water soluble tetrazolium salts). Zaobserwowano, że zaaplikowanie pęcherzyków w ilości  $\geq 20 \mu\text{g/ml}$  powoduje zmianę morfologii komórek Hep-2 (kurczenie lub zaokrąglenie) i ich odrywanie od podłoża. Określono również zdolność OMVs do wywołania reakcji prozapalnej. W tym celu izolowano RNA z Hep-2 potraktowanych wcześniej preparatem zawierającym pęcherzyki zewnątrz błonowe i przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji w celu uzyskania cDNA pięciu cytokin (IL-1b, IL-6, IL-8, MIP-1a (macrophage inflammatory protein – ludzkie białko zapalne makrofagów) i MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1 – białko chemotaktyczne dla monocytów)). Komplementarny DNA posłużył do reakcji PCR w czasie rzeczywistym, pozwalającej na oszacowanie ilości kwasu deoksyrybonukleinowego. Okazało się, że komórki w odpowiedzi na OMVs transkrybują geny wszystkich badanych cytokin, a ich poziom zależy od dawki pęcherzyków. Jednocześnie potwierdzono działanie prozapalne preparatów pęcherzykowych w warunkach *in vivo* [32].

Porównano również, w warunkach *in vivo* nasilenie odpowiedzi prozapalnej powodowanej przez zakażenie komórek bakteriami z odpowiedzią wywołaną przez podanie preparatów pęcherzykowych. Okazuje się, że produkcja ww. cytokin jest znacznie wyższa w przypadku zaaplikowania pęcherzyków (o stężeniu  $15 \mu\text{g/ml}$ )

niż w przypadku odpowiedzi komórek na zakażenie komórkami *A. baumannii* [32].

Dotychczasowe wyniki badań nad OMVs *A. baumannii* stanowią obiecującą perspektywę na stworzenie szczepionki przeciwko schorzeniom wywołanym przez ten mikroorganizm. Po podaniu OMVs domięśniowo myszom (w trzech dawkach) zaobserwowano powstawanie specyficznych przeciwciał IgG, a w przypadku immunizacji donosowej również IgA. Poziom immunoglobulin był na tyle wysoki, że po zakażeniu zwierząt bakteriami *A. baumannii* i wywołaniu sepsy poziom przeżywalności zwierząt był 10-krotnie wyższy w grupie immunizowanej OMVs niż w grupie kontrolnej. Ponadto, myszy, którym podano surowicę ze specyficznymi przeciwciałami anty-*Acinetobacter* były całkowicie chronione przed zakażeniem tym patogenem, w przeciwieństwie do grupy kontrolnej, w której jedynie 20% myszy przeżyło infekcję [28].

#### 4.7. *Francisella noatunensis*

Rodzaj *Francisella* obejmuje trzy gatunki nieruchliwych, ściśle tlenowych pałeczek. Jeden z nich, *F. tularensis* jest wewnątrzkomórkowym patogenem człowieka. Progową dawką infekcyjną dla ludzi wynosi zaledwie 10 bakterii [29]. Cechą charakterystyczną typowych postaci tularemii jest nagły początek choroby z dreszczami, bólami mięśni i głowy, wysoką temperaturą, ogólnym rozbiciem, brakiem apetytu. Może również przebiegać łagodnie lub bezobjawowo. W miejscu wniknięcia patogenu następuje namnożenie bakterii i tworzenie owrzodzeń [39]. Drugi gatunek, *F. noatunensis* powoduje choroby ryb (francisellosis) odpowiedzialne za straty ekonomiczne w sektorze hodowli ryb. Znane są dwa podgatunki *Francisella noatunensis*, pierwszy z nich – *F. noatunensis* spp. *noatunensis* – infekuje ryby żyjące w wodach chłodniejszego klimatu, natomiast podgatunek *orientalis* bytuje w wodach klimatu cieplejszego. Obecnie nie ma żadnej komercyjnie dostępnej szczepionki przeciwko temu patogenowi, a wcześniej badana szczepionka oparta o atenuowane szczepy *Francisella noatunensis* okazała się być mało skuteczna [10].

Analiza LC-MS OMVs produkowanych przez *F. noatunensis* spp. *noatunensis* ujawniła obecność wielu białek związanych z wirulencją, w tym trzy białka kodowane przez geny będące częścią genów zgrupowanych w postaci wyspy patogenności FPI (*Francisella pathogenicity island*).

Brudal i wsp. przeprowadzili szczepienia dootrzewnowe ryb *Danio rerio*. Podawano  $40 \mu\text{g}$  OMVs zawieszonych w PBS lub aplikowano tylko PBS (grupa kontrolna). Po 32 dniach, część ryb infekowano *F. noatunensis* spp. *noatunensis* ( $10^8$  bakterii). Zaobserwowano, że grupa ryb nieimmunizowanych, a poddanych zakażeniu wykazywała takie objawy jak: zmniejszona ruchli-

wość, spadek masy ciała czy brak apetytu, co odpowiada symptomom choroby wywołanej przez pałeczki *Francisella*. Natomiast ryby immunizowane przed zakażeniem, nie wykazywały żadnych objawów chorobowych. Liczba bakterii w poszczególnych narządach była określana pośrednio za pomocą reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Analiza w oparciu o ilość DNA odpowiadającą wielkości genomu pojedynczej komórki *F. noatunensis* (tzw. ekwiwalent genomu) wykazała zmniejszoną liczbę bakterii w nerkach, śledzionie i sercu ryb immunizowanych pęcherzykami, w porównaniu do grupy kontrolnej (nieimmunizowanej OMVs) [9].

#### 4.8. *Shigella* spp.

Należące do rodziny *Enterobacteriaceae* pałeczki *Shigella* to Gram-ujemne, względnie beztlenowe, niezdolne do ruchu drobnoustroje. Gatunek *S. dysenteriae* obejmuje 13 serotypów, *S. flexneri* – 16 serotypów, *S. boydii* – 18 serotypów, a *S. sonnei* – 1 serotyp. *S. dysenteriae* wytwarza jedną z najsilniejszych toksyn, jaką jest toksyna Shiga. Pałeczki *S. sonnei* i *S. boydii* powodują zatrucie o łagodniejszym przebiegu niż szczepy *S. flexneri* i *S. dysenteriae*.

Szacuje się, że co roku ponad 150 milionów ludzi na świecie choruje na tzw. czerwonkę bakteryjną, z czego około milion przypadków kończy się śmiercią. Do wywołania choroby wystarczy niewielka liczba komórek bakteryjnych (10–100), które nie giną w kwaśnym środowisku żołądka. Zakażenia występują często u małych dzieci i ludzi starszych. Do najbardziej charakterystycznych objawów szigelozy należą gorączka, ból brzucha i wodniste lub krwawe biegunki. Oporność na antybiotyki wśród rodzaju *Shigella* jest bardzo częsta i ciągle wzrasta [57].

Szczegółowa wiedza dotycząca epidemiologii zakażeń pozwala na wybór potencjalnych kandydatów do skutecznej szczepionki, umożliwiającej zapanowanie nad szigelozą. Od lat prowadzone są badania nad skutecznym preparatem anty-*Shigella*, który chroniłby przed zakażeniami spowodowanymi przez różne serotypy tego patogena [78].

Mitra i wsp. opracowali multiwalentną szczepionkę na bazie pęcherzyków zewnątrzblonowych o nazwie MOMVs (*multi-serotype outer membrane vesicles*), zawierającą antygeny sześciu szczepów *Shigella* spp. (*S. sonnei*, *S. dysenteriae* 1, *S. flexneri* 2a, 3a i 6 oraz *S. boydii* 4). Zastosowanie tych szczepów wiąże się z wykształceniem oporności na czerwonkę w skali globalnej, w związku z podobieństwem antygenowym do szerokiego grona innych pokrewnych serotypów. Wszystkie użyte w badaniu na myszach OMVs wykazywały podobny poziom immunogenności, a wywołana przez nie produkcja przeciwciał typu IgG utrzymywała się na wysokim poziomie, nawet w 120 dniu po ostatniej

dawce szczepionki. Badaniu poddano również zdolność surowicy myszy immunizowanych i nieimmunizowanych do opsonizacji drobnoustrojów, umożliwiającą ich fagocytozę przez komórki żerne. Wyniki pokazują, że bakterie inkubowane z mysią surowicą anty-MOMVs były skuteczniej fagocytowane i zabijane przez makrofagi w porównaniu do próby kontrolnej.

Zbadano również stopień odporności biernej nabytej u mysich noworodków. Czterodniowe myszy zakażano szczepami *Shigella* i określano ich przeżywalność. Większość potomstwa nieimmunizowanych samic wykazywała objawy choroby i ostatecznie nie przeżywała infekcji, w przeciwieństwie do potomstwa grupy samic immunizowanych MOMVs, w której śmiertelność młodych nie wynosiła więcej niż 10%. Jest to związane z przenikaniem przeciwciał wytworzonych przez układ immunologiczny matki przez łożysko podczas ciąży i podczas karmienia mlekiem [48].

#### 4.9. *Campylobacter jejuni*

Pałeczki *Campylobacter* są obecnie jednym z najczęściej izolowanych etiologicznych czynników zatrucia i zakażeń pokarmowych pochodzenia bakteryjnego w populacji ludzkiej. Zakażenia u ludzi wywołują głównie pałeczki należące do gatunków *C. jejuni*, *C. coli* i *C. lari*, spośród których najczęściej izolowany od pacjentów jest *C. jejuni* subsp. *jejuni* wywołujący ok. 90–95% przypadków kamylobakteriozy [70].

Gatunek *C. jejuni* powszechnie występuje w produktach pochodzenia zwierzęcego. Badania prowadzone w kierunku obecności pałeczek *Campylobacter* spp. na powierzchni tuszek drobiowych wykazały znaczne ich zanieczyszczenie, sięgające nawet 80%. Niebezpieczeństwo zakażenia niesie także spożycie zanieczyszczonej bakteriami wody lub kontakt ze zwierzętami domowymi i hodowlanymi [14]. Po przedostaniu się do przewodu pokarmowego człowieka i przetrwaniu w niesprzyjającym im, kwaśnym środowisku żołądka, pałeczki docierają do nabłonka jelita, gdzie przenikają przez śluzówkę i wnikają do komórek nabłonka jelitowego [83].

Zakażenie może przebiegać w sposób bezobjawowy lub prowadzić do występowania nudności, wymiotów, bólów brzucha, podwyższonej temperatury ciała, a przede wszystkim do ostrej biegunki z obecnością krwi w kale. Sporadycznie pałeczki *Campylobacter* mogą wywołać powikłania, takie jak reaktywne zapalenie stawów, zespół Guillaina-Barrégo (1% ludzi zakażonych), czy zespół Millera-Fischer [70].

Według danych Zakładu Epidemiologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego liczba zachorowań na kamylobakteriozę w naszym kraju w 2014 roku była dość niska i wynosiła 654 potwierdzonych przypadków [24]. W Polsce jest to nadal choroba, która nie jest wystarczająco często diagnozowana, rozpoznawana

i rejestrowana, dlatego trudno oszacować rzeczywistą liczbę przypadków i częstość występowania kamylobakteriozy w naszym kraju.

W większości przypadków zakażenia *C. jejuni* przemijają samoistnie, wymagając jedynie uzupełniania płynów. Niemniej jednak, w niektórych przypadkach nieodzowne jest zastosowanie antybiotykoterapii. Zjawisko nasilającej się antybiotykooporności wynikające z często nieuzasadnionego stosowania antybiotyków w terapii ludzi jak i zwierząt przybiera coraz poważniejszą postać. Badania epidemiologiczne wykazują gwałtowny wzrost oporności na powszechnie stosowane terapie, co niewątpliwie utrudnia zwalczanie przypadków kamylobakteriozy, wydłużając czas leczenia lub powodując całkowitą nieskuteczność stosowanej terapii [26].

Prace nad szczepionką anty-*Campylobacter* dla ludzi wiążą się z ryzykiem wystąpienia chorób autoimmunologicznych, ze względu na podobieństwo lipooligosacharydu (LOS) *C. jejuni* do ludzkich glikosfingolipidów obecnych w komórkach nerwowych [74]. Dlatego wprowadzenie do powszechnego stosowania szczepień ochronnych drobiu – głównego rezerwuaru *Campylobacter jejuni*, wydaje się być bezpieczniejszą alternatywą w strategii zapobiegania przypadkom kamylobakteriozy u ludzi.

Od wielu lat różne ośrodki badawcze na całym świecie prowadzą badania nad stworzeniem skutecznej szczepionki anty-*Campylobacter* dla drobiu. Testowane propozycje można podzielić na preparaty skonstruowane w oparciu o zabite komórki drobnoustrojów tzw. CWC (*Campylobacter whole-cell vacinnes*) oraz szczepionki podjednostkowe zawierające jedynie wybrane antygeny *Campylobacter* [30].

Jang i wsp. przeprowadzili analizę proteomiczną pęcherzyków zewnątrzkomórkowych *C. jejuni* szczepu NCTC11168 z zastosowaniem techniki spektrometrii mas. Badania proteomiczne potwierdziły obecność w OMVs białek warunkujących chorobotwórczość pałeczek *Campylobacter jejuni*, takich jak: czynniki adhezyjne (CadF, PEB1, MOMP, FlaC, FspA), białka budujące rzęskę (FlgE, FlgK, FliI, FliD i FliF, FlaA, FlaB), białka sekrecyjne (Cj0511) czy cytoletalna toksyna – CDT (cytolethal distending toxin) [31]. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe *C. jejuni* indukują produkcję wielu czynników związanych z niespecyficznymi mechanizmami obronnymi w organizmie człowieka. Jedną z najlepiej opisanych cytokin uwalnianych we wczesnej fazie zakażenia pałeczkami *Campylobacter* jest IL-8. Elmi i wsp. przeprowadzili eksperyment, w którym porównali stężenie wydzielanej interleukiny po inkubacji z komórkami *C. jejuni* 11168H i OMVs tego szczepu. Ilość produkowanej przez IECs (intestinal epithelial cells) IL-8 pod wpływem 100 µg OMVs była znacznie wyższa w porównaniu do komórek kontroli negatywnej, i oscylowała na podobnym poziomie

w odniesieniu do IECs inkubowanych z komórkami *C. jejuni*. Istotna statystycznie różnica występowała nawet przy zastosowaniu 10 µg OMVs [19].

## 5. Podsumowanie

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, początkowo obserwowane tylko w specyficznych warunkach hodowli, są obecnie nieodłączną częścią mikrobiologii. W ciągu ostatnich 50 lat stało się jasne, że ich wytwarzanie przez bakterie Gram-ujemne jest zjawiskiem powszechnym i typowym. Badania nad OMVs obecnie w dużej mierze obejmują poznanie ich roli w fizjologii bakterii, procesie patogenezy i interakcji ze środowiskiem zewnętrznym. OMVs stanowią alternatywną drogę wydzielania i transportu wielu białek i innych biomolekuł, w tym kwasów nukleinowych. Transport tego typu pozwala na interakcje ze środowiskiem pozakomórkowym, jednocześnie wykluczając ryzyko związane z kontaktem bezpośrednim np. z komórkami eukariotycznymi podczas procesu patogenezy. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe stały się ważnym narzędziem w walce z chorobami zakaźnymi. Zainicjowane do tej pory programy szczepienne przeciwko serotypowi B *Neisseria meningitidis* zdecydowanie dowodzą, iż warto inwestować w tworzenie szczepionek na bazie OMVs również w walce z innym bakteriami patogennymi.

Co więcej, obserwuje się stały wzrost zainteresowania OMVs jeśli chodzi o możliwości i drogi ich zastosowania – nie tylko w prewencji bakteryjnych chorób zakaźnych. Obecnie naukowcy coraz częściej skupiają się w swoich badaniach nad możliwością zmiany ich właściwości. Dzięki technikom biologii molekularnej można przeprogramować skład biomolekuł transportowanych przez OMVs (zarówno w ich świetle, jak i na ich powierzchni). To umożliwia przenoszenie unikalnych kombinacji antygenów, przeciwciał, receptorów czy różnego typu enzymów, co ostatecznie pozwoli na ich zastosowanie w różnych gałęziach biotechnologii.

Wprowadzanie specyficznych genów i wyrażanie rekombinowanych białek w komórkach producenta umożliwia optymalizację procesu produkcji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, a w konsekwencji tworzenie swoistych „minifabryk”, niezbędnych do wprowadzenia technologii związanej z OMVs na szeroką skalę. Kto wie, czy w przyszłości nie uda się stworzyć w pełni specyficznych, całkowicie nietoksycznych szczepionek na bazie OMVs, wywołujących wysoki poziom ochrony przed poszczególnymi drobnoustrojami? Możliwe, że w niedługim czasie pojawią się również inne zastosowania dla OMVs, jak np. ich wykorzystanie w procesach bioremediacji, przetwarzaniu materiałów drzewnych, diagnostyce, czy dostarczaniu leków w terapiach docelowych [3].

## Piśmiennictwo

- Acevedo R., Fernández S., Zayas C., Acosta A., Sarmiento M.E., Ferro V.A.: Bacterial outer membrane vesicles and vaccine applications. *Front. Immunol.* **5**, DOI: 10.3389/fimmu.2014.00121 (2014)
- Bai X., Findlow J., Borrow R.: Recombinant protein meningococcal serogroup B vaccine combined with outer membrane vesicles. *Expert Opin. Biol. Ther.* **11**, 969–985 (2011)
- Baker J.L., Chen L., Rosenthal J.A., Putnam D., DeLisi M.P.: Microbial biosynthesis of designer outer membrane vesicles. *Curr. Opin. Biotechnol.* **29**, 76–84 (2014)
- Bartolini E., Ianni E., Frigimelica E., Petracca R.: Recombinant outer membrane vesicles carrying *Chlamydia muridarum* HtrA induce antibodies that neutralize chlamydial infection *in vitro*. *J. Extracell. Vesicles.* **2**, DOI: 10.3402/jev.v2i0.20181 (2013)
- Bauman S.J., Kuehn M.J.: Purification of outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* and their activation of an IL-8 response. *Microbes Infect.* **8**, 2400–2408 (2006)
- Baumgarten T., Sperling S., Seifert J., von Bergen M., Steiniger F., Wick L., Heipieper H.: Membrane vesicle formation as a multiple-stress response mechanism enhances *Pseudomonas putida* DOT-T1E cell surface hydrophobicity and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 6217–6224 (2012)
- Beveridge T.J.: Structures of Gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **181**, 4725–4733 (1999)
- Bomberger J.M., MacEachran D.P., Coutermarsh B.A., Ye S., O'Toole G.A., Stanton B.A.: Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles. *PLoS Pathog.* **5**, DOI: 10.1371/journal.ppat.1000382 (2009)
- Brudal E., Lampe E., Reubsæet L., Roos N., Hegna I., Thrane I., Koppang E., Winther-Larsen H.C.: Vaccination with outer membrane vesicles from *Francisella noatunensis* reduces development of francisellosis in a zebrafish model. *Fish Shellfish Immunol.* **42**, 50–57 (2015)
- Brudeseth B.E., Wiulsrød R., Fredriksen B.N., Lindmo K., Løklung K.E., Bordevik M.: Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. *Fish Shellfish Immunol.* **35**, 1759–1768 (2013)
- Chatterjee S. N., Chaudhuri K.: Lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae*. Physical and chemical characterization. *Biochim. Biophys. Acta*, **1639**, 65–79 (2003)
- Clausen T., Southan C., Ehrmann M.: The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. *Mol. Cell.* **10**, 443–455 (2002)
- Collins B.S.: Gram-negative outer membrane vesicles in vaccine development. *Discov. Med.* **12**, 7–15 (2011)
- Daczowska-Kozon E.: Kamylobakterioza – możliwe źródła infekcji. *Folia Univ. Agric. Stetin. Scientia Alimentaria*, **238**, 21–28 (2004)
- De S.N.: Enterotoxicity of bacteria-free culture-filtrate of *Vibrio cholerae*. *Nature*, **183**, 1533–1534 (1959)
- Deatherage B.L., Lara J.C., Bergsbaken T., Rassouljian Barrett S.L., Lara S., Cookson B.T.: Biogenesis of bacterial membrane vesicles. *Mol. Microbiol.* **72**, 1395–1407 (2009)
- Delbos V., Lemée L., Bénichou J., Berthelot G., Deghmane A.E., Leroy J.P., Houivet E., Hong E., Taha M.K., Caron F.: Impact of MenBvac, an outer membrane vesicle (OMV) vaccine, on the meningococcal carriage. *Vaccine*, **31**, 4416–4420 (2013)
- Ellen A.F., Albers S.V., Huibers W., Pitcher A., Hobel C.F., Schwarz H., Folea M., Schouten S., Boekema E.J., Poolman B.: Proteomic analysis of secreted membrane vesicles of archaeal *Sulfolobus* species reveals the presence of endosome sorting complex components. *Extremophiles*, **13**, 67–79 (2009)
- Elmi A., Dorrell N. i wsp.: *Campylobacter jejuni* outer membrane vesicles play an important role in bacterial interactions with human intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* **80**, 4089–4098 (2012)
- Fernández S., Fajardo E.M., Mandiarote A., Año G., Padrón M.A., Acosta M.: A proteoliposome formulation derived from *Bordetella pertussis* induces protection in two murine challenge models. *BMC Immunol.* **14**, DOI: 10.1186/1471-2172-14-S1-S8 (2013)
- Finco O., Frigimelica E., Buricchi F., Petracca R., Galli G.: Approach to discover T- and B-cell antigens of intracellular pathogens applied to the design of *Chlamydia trachomatis* vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 9969–9974 (2011)
- Finne J., Leinonen M., Makela P.H.: Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. Implications for vaccine development and pathogenesis. *Lancet*, **2**, 355–357 (1983)
- Furuta N., Tsuda K., Omori H., Yoshimori T., Yoshimura F., Amano A.: *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles enter human epithelial cells via an endocytic pathway and are sorted to lysosomal compartments. *Infect. Immun.* **77**, 4187–4196 (2009)
- Główny Inspektorat Sanitarny: Stan sanitarny kraju w roku 2014. [http://gis.gov.pl/images/kafelki/stan\\_sanitarny\\_kraju.pdf](http://gis.gov.pl/images/kafelki/stan_sanitarny_kraju.pdf) (06.09.2016)
- Gurung M., Moon D.C., Choi C.W., Lee J.H., Bae Y.C., Kim J., Lee Y.C., Seol S.Y., Cho D.T., Kim S.I.: *Staphylococcus aureus* produces membrane-derived vesicles that induce host cell death. *PLoS One*, **6**, DOI: 10.1371/journal.pone.0027958 (2011)
- Helms M., Simonsen J., Olsen K.E., Mølbak K.: Adverse health events associated with antimicrobial drug resistance in *Campylobacter* species: a registry-based cohort study. *J. Infect. Dis.* **191**, 1050–1055 (2005)
- Holst J.D., Martin R., Campa C., Oster P., O'Hallahan J., Rosenqvist E.: Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. *Vaccine*, **27**, DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.04.071 (2009)
- Huang W., Yao Y., Long Q., Yang X., Sun W.: Immunization against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* effectively protects mice in both pneumonia and sepsis models. *PLoS One*, **9**, DOI: 10.1371/journal.pone.0100727 (2014)
- Huntley J.F., Conley P.G., Hagman K.E., Norgard M.V.: Characterization of *Francisella tularensis* outer membrane proteins. *J. Bacteriol.* **189**, 561–574 (2007)
- Jagusztyn-Krynicka E.K., Łaniewski P., Wyszynska A.: Update on *Campylobacter jejuni* vaccine development for preventing human campylobacteriosis. *Expert. Rev. Vaccines*, **8**, 625–645 (2009)
- Jang K.S., Sweredoski M.J., Graham R.L., Hess S., Clemons W.M.: Comprehensive proteomic profiling of outer membrane vesicles from *Campylobacter jejuni*. *J. Proteomics*, **98**, 90–98 (2014)
- Jun S.H., Lee J.H., Kim B.R., Kim S.I., Park T.I., Lee J.C., Lee Y.C.: *Acinetobacter baumannii* outer membrane vesicles elicit a potent innate immune response via membrane proteins. *PLoS One*, **8**, DOI: 10.1371/journal.pone.0071751 (2013)
- Kaaijk P., van Straaten I., van de Waterbeemd B., Boot E.P., Levels L.M., van Dijken H.H., van den Dobbelen G.P.: Preclinical safety and immunogenicity evaluation of a nonavalent PorA native outer membrane vesicle vaccine against serogroup B meningococcal disease. *Vaccine*, **31**, 1065–1071 (2013)
- Kadurugamuwa J.L., Beveridge T.J.: Membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa* and *Shigella flexneri* can be integrated into the surfaces of other Gram-negative bacteria. *Microbiology*, **145**, 2051–2060 (1999)

35. Kadurugamuwa J.L., Beveridge, T.J.: Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J. Bacteriol.* **177**, 3998–4008 (1995)
36. Kahn M.E., Maul G., Goodgal S.H.: Possible mechanism for donor DNA binding and transport in *Haemophilus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6370–6374 (1982)
37. Kitagawa R., Takaya A., Ohya M., Mizunoe Y., Takade A., Yoshida S., Isogai E., Yamamoto T.: Biogenesis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium membrane vesicles provoked by induction of PagC. *J. Bacteriol.* **192**, 5645–5656 (2010)
38. Klose K.: Regulation of virulence in *Vibrio cholerae*. *Int. J. Med. Microbiol.* **29**, 81–88 (2001)
39. Kłapeć T., Cholewa A.: Tularemia – wciąż groźna zoonoza. *Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu*, **17**, 155–160 (2011)
40. Knox K.W., Vesik M., Work E.: Relation between excreted lipopolysaccharide complexes and surface structures of a lysine limited culture of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **92**, 1206–1217 (1966)
41. Kulp A., Kuehn M.J.: Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**, 163–184 (2010)
42. Lee E.Y., Bang J.Y., Park G.W., Choi D.S., Kang J.S.: Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli*. *Proteomics*, **7**, 3143–3153 (2007)
43. Loch C.: A common vaccination strategy to solve unsolved problems of tuberculosis and pertussis? *Microbes Infect.* **10**, 1051–1056 (2008)
44. Manning A.J., Kuehn M.J.: Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol.* **11**, DOI: 10.1186/1471-2180-11-258 (2011)
45. Manning A.J., Kuehn M.J.: Functional advantages conferred by extracellular prokaryotic membrane vesicles. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 131–141 (2013)
46. Mashburn L.M., Whiteley M.: Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature*, **437**, 422–425 (2005)
47. McBroom A.J., Kuehn M.J.: Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Mol. Microbiol.* **63**, 545–558 (2007)
48. Mitra S., Chakrabarti M.K., Koley H.: Multi-serotype outer membrane vesicles of Shigellae confer passive protection to the neonatal mice against shigellosis. *Vaccine*, **31**, 3163–3173 (2013)
49. Nieves W., Asakrah S., Qazi O., Brown K.A., Kurtz J.: A naturally derived outer membrane vesicle vaccine protects against lethal pulmonary *Burkholderia pseudomallei* infection. *Vaccine*, **29**, 8381–8389 (2011)
50. Nieves W., Petersen H., Judy B.M., Blumentritt C.A., Russell-Lodrigue K., Roy C.J., Torres A.G., Morici L.A.: A *Burkholderia pseudomallei* outer membrane vesicle vaccine provides protection against lethal sepsis. *Clin. Vaccine Immunol.* **21**, 747–754 (2014)
51. Norheim G., Tunheim G., Naess L.M., Bolstad K., Fjeldheim A.K., Garcia L.: A trivalent outer membrane vesicle (OMV) vaccine against serogroup A, W-135 and X meningococcal disease. XVIIIth International Pathogenic Neisseria Conference. Würzburg: Conventus Congress Management & Marketing GmbH (2012)
52. Panatto D., Amicizia D., Lai P.L., Cristina M.L., Domnich A., Gasparini R.: New versus old meningococcal Group B vaccines: How the new ones may benefit infants & toddlers. *Indian J. Med. Res.* **138**, 835–846 (2013)
53. Pawlikowska M., Deptuła W.: Swoista odporność humoralna a chlamydie i chlamydofile. *Post. Hig. Med. Dosw.* **15**, 505–511 (2006)
54. Perez J.L., Acevedo R., Callico A., Fernandez Y., Cedre B., Ano G.: A proteoliposome based formulation administered by the nasal route produces vibriocidal antibodies against El Tor Ogawa *Vibrio cholerae* O1 in BALB/c mice. *Vaccine*, **27**, 205–212 (2009)
55. Pizza M., Scarlato V., Masignani V.: Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science*, **287**, 1816–1820 (2000)
56. Rachel R., Wyschkony I., Riehl S., Huber H.: The ultrastructure of *Ignicoccus*: evidence for a novel outer membrane and for intracellular vesicle budding in an archaeon. *Archaea*, **1**, 9–18 (2002)
57. Ram P.K., Crump J.A., Gupta S.K., Miller M.A., Mintz E.D.: Part II. Analysis of data gaps pertaining to *Shigella* infections in low and medium human development index countries, 1984–2005. *Epidemiol. Infect.* **136**, 577–603 (2008)
58. Renelli M., Matias V., Lo R.Y., Beveridge T.J.: DNA containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology*, **150**, 2161–2169 (2004)
59. Rivera J., Cordero R.J., Nakouzi A.S., Frases S., Nicola A., Casadevall A.: *Bacillus anthracis* produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 19002–19007 (2010)
60. Rosenthal J.A., Chen L., Baker J.L., Putnam D., DeLisa M.P.: Pathogen-like particles: biomimetic vaccine carriers engineered at the nanoscale. *Curr. Opin. Biotechnol.* **28**, 51–8 (2014)
61. Rupali J., Danziger L.H.: Multidrug-resistant *Acinetobacter infections*: an emerging challenge to clinicians. *Ann. Pharmacother.* **38**, 1449–1459 (2004)
62. Sack D.A., Sack R.B., Chaignat C.L.: Getting serious about cholera. *N. Engl. J. Med.* **355**, 649–651 (2006)
63. Schaar V., Nordstrom T., Morgelin M., Riesbeck K.: Moraxella catarrhalis outer membrane vesicles carry  $\beta$ -lactamase and promote survival of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by inactivating amoxicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 3845–3853 (2011)
64. Schild S., Nelson E.J., Camilli A.: Immunization with *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles induces protective immunity in mice. *Infect. Immun.* **76**, 4554–4563 (2008)
65. Schooling S.R., Hubble A., Beveridge T.J.: Interactions of DNA with biofilm-derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **191**, 4097–4102 (2009)
66. Segal S., Pollard A.J.: Vaccines against bacterial meningitis. *Br. Med. Bull.* **72**, 65–81 (2005)
67. Serruto D., Bottomley M.J., Ram S.: The new multicomponent vaccine against meningococcal serogroup B, Bexsero®: immunological, functional and structural characterization of the antigens. *Vaccine*, **30**, 87–97 (2012)
68. Sierra G., Campa H.C., Varcacel N.M., Izquierdo P.L., Sotolongo P.F., Garcia L.: Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Ann.* **14**, 195–210 (1991)
69. Silva E.B., Dow S.W.: Development of *Burkholderia mallei* and *Pseudomallei* vaccines. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **3**, DOI: 10.3389/fcimb.2013.00010 (2013)
70. Silva J., Leite D., Fernandes M.: *Campylobacter* spp. as a food-borne pathogen: A Review. *Front. Microbiol.* **2**, DOI: 10.3389/fmicb.2011.00200 (2011)
71. Sinha R., Koley H., Nag D., Mitra S., Mukhopadhyay A.K., Chattopadhyay B.: Pentavalent outer membrane vesicles of *Vibrio cholerae* induce adaptive immune response and protective efficacy in both adult and passive suckling mice models. *Microbes Infect.* **17**, 215–227 (2015)

72. Sinha S., Langford P., Kroll J.: Functional diversity of three different DsbA proteins from *Neisseria meningitidis*. *Microbiology*, **150**, 2993–3000 (2004)
73. Tan L.K., Carlone G.M., Borrow R.: Advances in the development of vaccines against *Neisseria meningitidis*. *N. Engl. J. Med.* **362**, 1511–1520 (2010)
74. Tribble D.R., Baqar S., Carmolli M.P., Porter C.: *Campylobacter jejuni* strain CG8421: a refined model for the study of *Campylobacteriosis* and evaluation of *Campylobacter* vaccines in human subjects. *Clin. Infect. Dis.* **49**, 1512–1519 (2009)
75. Unal C.M., Schaar V., Riesbeck K.: Bacterial outer membrane vesicles in disease and preventive medicine. *Semin. Immunopathol.* **33**, 395–408 (2011)
76. van de Waterbeemd B., Streefland M., van der Ley P., Zomer B., van Dijken H.: Improved OMV vaccine against *Neisseria meningitidis* using genetically engineered strains and a detergent-free purification process. *Vaccine*, **28**, 4810–4816 (2010)
77. van der Ley P., Steeghs L., Hamstra H.J.: Modification of lipid A biosynthesis in *Neisseria meningitidis* lpxL mutants: influence on lipopolysaccharide structure, toxicity, and adjuvant activity. *Infect. Immun.* **69**, 5981–5990 (2001)
78. Von Seidlein L., Kim D.R., Ali M., Lee H., Wang X.: A multi-centre study of *Shigella diarrhoea* in six Asian countries: disease burden, clinical manifestations, and microbiology. *PLoS Med.* **3**, DOI: 10.1371/journal.pmed.0030353 (2006)
79. Wiersinga W.J., Currie B.J., Peacock S.J.: Melioidosis. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1035–1044 (2012)
80. Wyle F.A., Artenstein M.S., Brandt B.L.: Immunologic response of man to group B meningococcal polysaccharide vaccines. *J. Infect. Dis.* **126**, 514–521 (1972)
81. Yaron S., Kolling G.L., Simon L., Matthews K.R.: Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4414–4420 (2000)
82. Yonezawa H., Osaki T., Kurata S., Fukuda M., Kawakami H., Ochiai K., Hanawa T., Kamiya S.: Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation. *BMC Microbiol.* **9**, DOI: 10.1186/1471-2180-9-197 (2009)
83. Young K.T., Davis L.M., Dirita V.J.: *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 665–679 (2007)
84. Zhou L., Srisatjaluk R., Justus D.E., Doyle R.J.: On the origin of membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **163**, 223–228 (1998)

Klaudia Gustaw<sup>1\*</sup>, Magdalena Michalak<sup>1</sup>, Magdalena Polak-Berecka<sup>1</sup>, Adam Waśko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra Biotechnologii, Żywności Człowieka i Towaroznawstwa Żywności,  
Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Wpłynęło w czerwcu 2016 r.  
Zaakceptowano we wrześniu 2016 r.

1. Wstęp. 2. Występowanie. 3. Cechy morfologiczne FLAB. 4. Cechy fizjologiczne FLAB. 5. Właściwości biochemiczne FLAB. 6. Filogenetyka. 7. Krótka charakterystyka wybranych gatunków z rodzaju *Fructobacillus*. 7.1. *Fructobacillus fructosus*. 7.2. *Fructobacillus ficulneus*. 7.3. *Fructobacillus durionis*. 7.4. *Fructobacillus pseudoficulneus*. 7.5. *Fructobacillus tropaeoli*. 7.6. *Lactobacillus kunkeei*. 7.7. *Lactobacillus florum*. 8. Podsumowanie

#### Fructophilic lactic acid bacteria (FLAB) – a new group of heterofermentative microorganisms from the plant environment

**Abstract:** Recently, a unique kind of lactic acid bacteria (LAB) i.e. fructophilic lactic acid bacteria (FLAB), has been described. This specific group prefers D-fructose over D-glucose as a carbon source to growth. They can be found in fructose rich environments such as flowers, fruits and food products made of fermented fruits, for example tempoyak. In recent years, it has been revealed that insects which feed on food high in fructose are an abundant source of fructophilic bacteria. Bacterial communities inhabiting intestinal tracts of honeybees, bumblebees, *Camponotus* ants and tropical fruit flies were examined. At present FLAB includes six species: *Fructobacillus fructosus*, *Fructobacillus durionis*, *Fructobacillus ficulneus*, *Fructobacillus pseudoficulneus*, *Fructobacillus tropaeoli* and *Lactobacillus kunkeei* classified by Endo as obligatorily fructophilic, and only one species, namely *Lactobacillus florum*, as facultatively fructophilic. Latest publications describe new species of potential fructophilic characteristics, which suggests that there is still much to discover in that group.

1. Introduction. 2. Occurrence / Habitat. 3. Morphological characteristics of FLAB. 4. Physiological characteristics of FLAB. 5. Biochemical properties of FLAB. 6. Phylogenetics. 7. Characterization of selected species of the genus *Fructobacillus*. 7.1. *Fructobacillus fructosus*. 7.2. *Fructobacillus ficulneus*. 7.3. *Fructobacillus durionis*. 7.4. *Fructobacillus pseudoficulneus*. 7.5. *Fructobacillus tropaeoli*. 7.6. *Lactobacillus kunkeei*. 7.7. *Lactobacillus florum*. 8. Summary

**Słowa kluczowe:** FLAB, *Fructobacillus*, fruktofilne bakterie kwasu mlekowego

**Key words:** FLAB, *Fructobacillus*, fructophilic lactic acid bacteria

## 1. Wstęp

FLAB (fructophilic lactic acid bacteria) są nietypową grupą bakterii kwasu mlekowego, które preferują fruktozę zamiast glukozy jako źródło węgla [10]. Występują one w niszach ekologicznych bogatych we fruktozę, takich jak: nektar kwiatów, owoce oraz żywność fermentowana wytwarzana na bazie owoców. Bakterie te wyizolowano także z przewodów pokarmowych owadów żywiących się pokarmem bogatym we fruktozę, takich jak trzmiele, pszczoły, tropikalne muszki owocowe, czy też mrówki z rodzaju *Camponotus*. *Fructobacillus* spp. są grupą mikroorganizmów należącą do fruktofilnych bakterii kwasu mlekowego. Początkowo zostały one zaklasyfikowane jako gatunek *Leuconostoc*, jednak ze względu na ich pozycję filogenetyczną, właściwości biochemiczne i morfologiczne nazwa ta została zmieniona na *Fructobacillus* [2, 5, 31] nawiązując do fruktozy, która stanowi dominujące źródło węgla wykorzystywane przez te mikroorganizmy [12]. Do grupy FLAB obecnie

należą następujące gatunki: *F. pseudoficulneus*, *F. fructosus*, *F. ficulneus*, *F. tropaeoli*. *Lactobacillus kunkeei* oraz *Lactobacillus florum*. W południowej Afryce *F. tropaeoli* został wyizolowany z kwiatów rośliny *Tropaeolum majus* [10]. Pierwotnie *F. fructosus* został zaklasyfikowany jako *Lactobacillus fructosus*, bazując na jego morfologicznych właściwościach. Następnie po szczegółowych badaniach filogenetycznych został zaklasyfikowany jako *Leuconostoc fructosus* [28], natomiast w 2008 roku Endo i Okada zmienili jego nazwę na *F. fructosus*. Wszystkie gatunki *Fructobacillus* posiadają zestaw unikalnych cech, które odróżniają je od ich filogenetycznych sąsiadów, jest to preferencja fruktozy zamiast glukozy jako źródła węgla, oraz konieczność obecności zewnętrznego akceptora elektronu do fermentacji glukozy. Dotychczas na temat rodzaju *Fructobacillus* ukazało się zaledwie kilka publikacji naukowych. Tylko jeden dokument został opublikowany na temat izolacji *F. fructosus* [28], jeden na temat *F. ficulneus* [2], oraz dwa o *F. pseudoficulneus* [5, 12] i jeden o *F. tropaeoli* [18]. Do tej pory jedynym

\* Autor korespondencyjny: Katedra Biotechnologii, Żywności Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Skromna 8, 20-704 Lublin; e-mail: klaudiagustaw1@gmail.com



gatunkiem z rodzaju *Lactobacillus*, zakwalifikowanym do grupy FLAB był *Lb. kunkeei*. Gatunek ten został oryginalnie wyizolowany z wina, i w czasie propozycji jego zaklasyfikowania, jego fruktofilne cechy nie zostały omówione [9]. Dopiero w 2012 *Lb. kunkeei* dołączył do grupy FLAB [11]. Powodem występowania tak małej liczby publikacji na ten temat, mogą być problemy dotyczące sposobu izolacji bakterii z rodzaju *Fructobacillus*, związane z używaniem konwencjonalnych pożywek takich jak MRS, Rogosa SL, KPL, pożywki z kwasem sorbowym, pożywki na bazie soku pomidorowego czy innych pożywek na bazie sacharozy [23]. Żadna z tych pożywek nie zawiera fruktozy jako źródła węgla. Gatunki *F. fructosus* i *F. pseudoficulnes* udało się wyizolować z kwiatów i owoców za pomocą specjalnie skomponowanej pożywki FYP, zawierającej fruktozę jako jedyne źródło węgla [10]. Gatunki *Fructobacillus* mają kilka unikalnych cech których nie posiadają inne bakterie z grupy LAB. Znajomość gatunków *Fructobacillus* jest więc konieczna do uzyskania pełnego obrazu różnorodności LAB.

## 2. Występowanie

Bakterie kwasu mlekowego można znaleźć w różnych środowiskach, a szereg badań sugeruje, że LAB dostosowują się do środowisk w których żyją [33, 34]. Gatunki bakterii pochodzące z przetworów mlecznych takie jak *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus bulgaricus*, preferują laktozę zamiast glukozy jako źródło węgla, oraz w celu zdominowania środowiska bogatego w białko wykształciły bardzo rozwinięte systemy proteolityczne [37]. Jelitowe bakterie kwasu mlekowego są zwykle odporne za żółć i produkują bakteriocyny pozwalające na konkurowanie z innymi bakteriami [27]. Sugeruje się, że FLAB zamieszkując nisze bogate we fruktozę utraciły zdolność metabolizowania glukozy w czasie ewolucyjnych zmian umożliwiających zasiedlenie tej niszy ekologicznej [14]. W 1956 roku *F. fructosus* był po raz pierwszy wyizolowany z kwiatów w Japonii [28], i gatunek ten nie został opisany przez ponad 50 lat. Gatunki *Fructophilic* wyizolowywano z wina, kwiatów i tradycyjnego napoju Taberny wytwarzanego i spożywanego w południowym Meksyku [5, 10, 18]. Jest to słodkie musujące wino uzyskiwane na drodze naturalnej fermentacji z soku palm *Acrocomia aculeate* [38]. Gatunek *F. pseudoficulneus* jest najczęściej izolowany z naturalnych środowisk, takich jak banany, figi, kwiaty czy też z Taberny [5, 10, 30]. Natomiast *F. ficulneus* i *F. durionis* udało się pozyskać tylko z fig, oraz tempoyaku – fermentowanej przyprawy z duriana, spożywanej przez Malajów w Indonezji i Malezji [2, 31]. Niedawno opisano gatunek *F. tropaeoli* wyizolowany z kwiatów

[29]. Ostatnie badania sugerują, że bogatym źródłem gatunków *Fructobacillus* są fermentowane ziarna kakaowca [30, 37, 39]. Wyizolowany z wina, miodu i kwiatów jest *Lb. kunkeei* [10, 14]. Co ciekawe, FLAB odkryto w przewodach pokarmowych różnych owadów. Trzmiele i tropikalne muszki owocowe są ściśle związane z kwiatami, a ich dieta jest bogata we fruktozę. Mrówki *Camponotus* zbierają i spożywają spadź produkowaną przez mszyce [24, 41]. Wyniki te pokazują, że czynnikami determinującymi zasiedlanie środowiska przez FLAB jest dostępność fruktozy oraz warunki anaerobowe. Mikroorganizmy te nie mogą wzrastać w warunkach beztlenowych, jeśli jedynym źródłem węgla jest glukoza, dlatego możliwe jest występowanie bakterii fruktofilnych w przewodach pokarmowych wegetarian. Należy podkreślić, że na tle bakterii kwasu mlekowego powiązanych z żywnością, grupa FLAB jest unikalna i może być wykorzystana w przyszłości w przemyśle spożywczym i paszowym [14].

## 3. Cechy morfologiczne FLAB

Komórki bakterii z rodzaju *Fructobacillus* są Gram-dodatnie, nie posiadają zdolności do ruchu oraz nie wytwarzają zarodników. Są fakultatywnie beztlenowe [17]. Wszystkie z pięciu gatunków *Fructobacillus* mają komórki kształtu pałeczkowatego zbliżonego do morfologii pałeczek bakterii kwasu mlekowego. Natomiast *F. pseudoficulneus* pierwotnie został opisany jako bakterie o kształcie owalnym, jednakże obraz wykonany za pomocą elektronowego mikroskopu skaningowego (SEM) wyraźnie wskazuje ich pałeczkowaty kształt [30]. Komórki występują pojedynczo lub w parach, kolonie inkubowane w warunkach tlenowych są nieco większe od kolonii rosnących w warunkach beztlenowych. Jednakże różnice warunków hodowli nie mają istotnego wpływu na morfologię komórek badanych szczepów.

## 4. Cechy fizjologiczne FLAB

Niektóre gatunki *Fructobacillus* są znane ze sprawnie działających mechanizmów utrzymujących równowagę osmotyczną komórki, *F. durionis*, *F. ficulneus*, *F. fructosus*, *F. pseudoficulneus* wykazują wzrost na pożywce z dodatkiem 30% fruktozy. Na podłożu z zawartością 40% fruktozy, nadal występuje wzrost bakterii, jednakże jest on znacznie spowolniony [12]. Gatunek *F. tropaeoli* rośnie słabo w obecności 30% fruktozy [18]. Prawie każdy gatunek *Fructobacillus* jest osmotolerancyjny, dlatego cecha ta może być wykorzystana przy selektywnej izolacji tych gatunków. Pierwotnie dzięki wykorzystaniu pożywki z zawartością 30% glukozy udało się wyizolować *F. ficulneus* [10], pozostałe gatunki

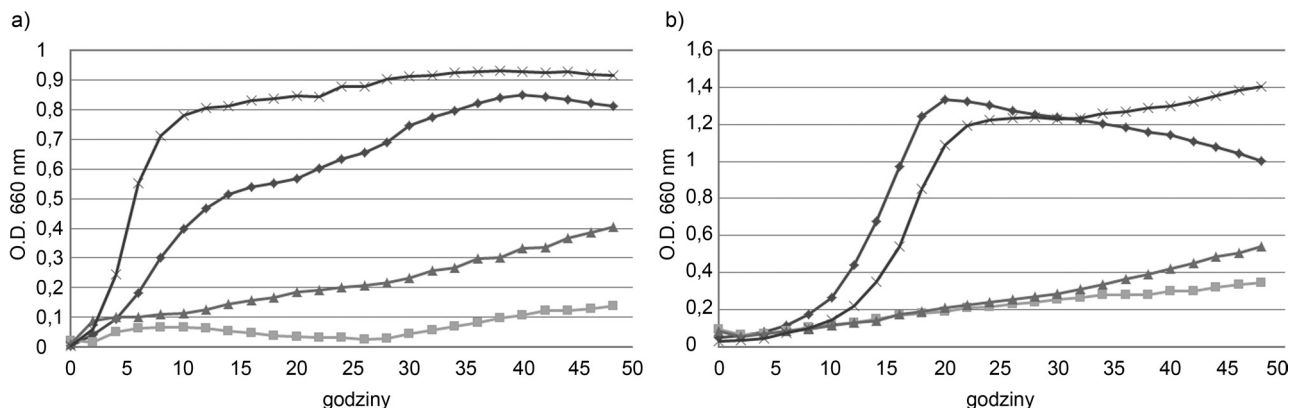
*Fructobacillus* wyizolowano już dzięki selekcyjnym właściwościom pożywki z 30% zawartością fruktozy [10]. Znakomity system osmotyczny fruktofilnych bakterii kwasu mlekowego pozwala *F. durionis*, *F. ficulneus*, *F. fructosus*, *F. pseudoficulneus* na wzrost w pożywkach o zawartości 5% NaCl [12], w przeciwieństwie do *F. trophaeoli* który nie rośnie w takich warunkach [18].

## 5. Właściwości biochemiczne FLAB

Dzięki występowaniu kilku unikalnych cech biochemicznych rodzaj *Fructobacillus* można było odróżnić od innych gatunków należących do bakterii mlekowych. Podstawową i najważniejszą właściwością jest ich dobry wzrost na pożywkach z D-fruktozą, a słaby na D-glukozie, która jest najbardziej powszechnym substratem wzrostu u LAB [19]. Wśród bakterii z rodzaju *Lactobacillus* opisano już podobne przystosowania np. *Lactobacillus sanfranciscencis* fermentuje maltozę, zaś *Lactobacillus vacciostercus* metabolizuje ksylozę [33]. FLAB mogą rosnąć na glukozie, ale tylko w obecności 1% pirogronianu lub w warunkach tlenowych. Wyniki te sugerują, iż fruktofilne bakterie kwasu mlekowego potrzebują obecności akceptora elektronów w postaci tlenu lub pirogronianu do metabolizmu glukozy. Organizmy te świetnie rosną na agarowych pożywkach zawierających glukozę jako jedyne źródło węgla tylko w warunkach tlenowych, natomiast w warunkach beztlenowych wzrost nie występuje lub jest znikomy [14, 33]. W obecności tlenu na podłożu agarowym można zaobserwować dobry wzrost FLAB, po 2 dniach powstają kolonie o średnicy 1–2 mm, natomiast w warunkach beztlenowych i przy braku akceptorów elektronów kolonie osiągają średnicę 0,1–0,2 mm [13]. Cecha ta pozwala łatwo odróżnić bakterie należące do FLAB od pozostałych bakterii z grupy LAB [14]. Fruktofilne gatunki LAB można podzielić na dwie grupy czyli na bakterie fruktofilnie, obligatoryjnie oraz na

fakultatywnie fruktofilne [12]. Cechami różnicującymi obligatoryjne od fakultatywnych bakterii jest wzrost na D-glukozie bez akceptora elektronów i wytwarzanie etanolu z D-glukozy [10]. Gatunki obligatoryjnie fruktofilne preferują fruktozę jako substrat do wzrostu, natomiast aby metabolizować glukozę potrzebują zewnętrznego akceptora elektronów czyli fruktozy, pirogronianu lub tlenu [19]. Jest to spowodowane różnicami w wydajności ATP pochodzących z fermentacji. W obecności tlenu 2 mole ATP jest wytwarzane podczas metabolizmu 1 mola glukozy, zaś 1,5 mola ATP produkowane jest w obecności pirogronianu [38]. Bakterie z grupy FLAB wykorzystując fruktozę jako akceptor tlenu produkują 0,67 moli na jeden mol zużytej fruktozy [3]. Obligatoryjne FLAB nie wytwarzają etanolu z D-glukozy, do grupy tej obecnie zaliczane są wszystkie gatunki *Fructobacillus* oraz *Lb. kunkeei*, który wykazuje praktycznie te same charakterystyki wzrostu co gatunki *Fructobacillus* oraz potrzebuje akceptora elektronu do metabolizmu glukozy [10]. Fakultatywnie fruktofilne LAB rosną na pożywce z D-glukozą bez obecności akceptora elektronów oraz produkują z D-glukozy etanol. Przykładem fakultatywnych gatunków FLAB obecnie jest jedynie *Lb. florum*, który dobrze rośnie zarówno na glukozie jak i na fruktozie w obecności akceptora elektronów [10, 17]. Jednakże *Lb. florum* różni się od innych FLAB pod względem cechy wzrostu na glukozie bez akceptora elektronów. Gatunek *Lb. florum* wykazuje zdolność do wzrostu na glukozie lecz w opóźnionym tempie [14].

Kolejną interesującą cechą FLAB jest ich brak zdolności do produkcji etanolu w metabolizmie glukozy, przy czym są one kwalifikowane jako heterofermentatywne LAB [10]. Zamiast etanolu z glukozy wytwarzany jest kwas octowy, cecha ta pozwoliła na odróżnienie od *Leuconostoc* i stworzenie nowego rodzaju *Fructobacillus*. [40]. Endo i inni przypuszczają, że wytłumaczeniem wyjątkowej charakterystyki FLAB, jest niewystarczająca regeneracja  $NAD^+$  [12]. Dehydrogenaza alkoholowa (ADH) i dehydrogenaza aldehydu octo-



Rys. 1. Charakterystyki wzrostu przykładowych FLAB na różnych pożywkach

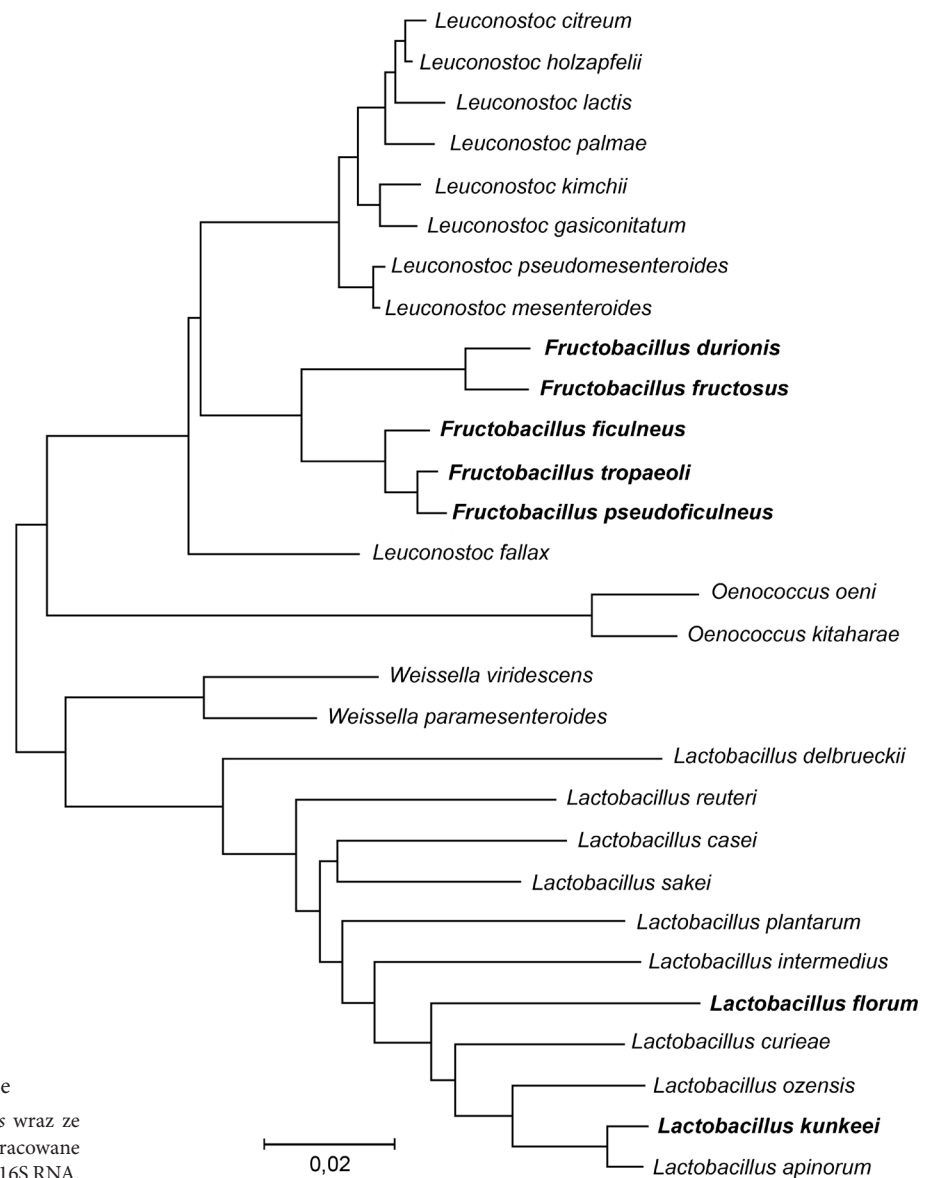
Wzrost a) *Fructobacillus ficulneus* DSMZ 13613, b) *Lactobacillus florum* DSMZ 22689, na:  $\diamond$  FYP,  $\square$  GYP,  $\Delta$  GYP z zawartością 1% pirogronianu,  $\times$  MRS w warunkach tlenowych.

wego (ALDH) odgrywają kluczową rolę w metabolicznych szlakach heterofermentatywnych LAB w regeneracji  $\text{NAD}^+$ . Badania przeprowadzone w 2013 roku wykazały brak obecności genu *adhE* kodującego dwufunkcyjne białko odpowiedzialne za działanie ADH i ALDH u *Fructobacillus* spp., a co za tym idzie, brak u tych bakterii szlaku wymaganego do produkcji etanolu. Tłumaczy to niedobór  $\text{NAD}^+$  i potrzebę występowania akceptorów elektronów w metabolizmie glukozy. Fruktofilne cechy u *Fructobacillus* spp. w głównej mierze wynikają z braku genu *adhE* [19]. Gen *adhE* u obligatoryjnie heterofermentatywnych LAB jest wykorzystywany do wytwarzania etanolu z fosforanu acetylu poprzez aldehyd octowy [29].

W oparciu o wyniki badań zdolności fermentacji węglowodanów, można stwierdzić, że FLAB metabolizują ograniczoną ilość węglowodanów, od dwóch do pięciu [10]. Większość gatunków FLAB metabolizuje tylko glukozę, fruktozę i mannitol. Przy czym meta-

bolizm fruktozy trwa znacznie krócej, około 1 dnia, natomiast do metabolizmu glukozy potrzeba od 2 do 4 dni [14]. Wszystkie gatunki *Fructobacillus* fermentują glukozę i fruktozę, fermentacja mannitolu jest opóźniona. FLAB nie prowadzą fermentacji pentoz, prawdopodobnie ze względu na brak izomeraz i epimeraz. Również *Lb. kunkeei* i *Lb. florum* są asacharolityczne, jednakże można je odróżnić od innych gatunków *Fructobacillus* na podstawie zdolności do fermentacji kilku węglowodanów.

Wszystkie bakterie FLAB należą do obligatoryjnie heterofermentatywnych bakterii kwasu mlekowego, ponieważ produkują  $\text{CO}_2$  z glukozy. Zasadniczo obligatoryjne heterofermentatywne LAB wykorzystują szlak fosforanowo-pentozowy do metabolizmu glukozy przy wytwarzaniu równomolowych ilości kwasu mlekowego, etanolu, dwutlenku węgla czy też śladowych ilości kwasu octowego. Fruktofilne gatunki produkują octan zamiast etanolu [11]. Poza śladowymi ilościami etanolu



Rys. 2. Drzewo filogenetyczne

Relacje filogenetyczne dla *Fructobacillus* wraz ze spokrewnionymi gatunkami zostały opracowane na podstawie sekwencji genu kodującego 16S RNA.

z glukozy wszystkie pięć gatunków *Fructobacillus* produkują prawie równomolowe ilości kwasu mlekowego i kwasu octowego. Stosunek kwasu D-mlekowego do L-mlekowego produkowanego przez FLAB wynosi 9:1 [18].

## 6. Filogenetyka

Rodzaj *Fructobacillus* jest filogenetycznie umieszczony wewnątrz rodziny *Leuconostocaceae* wraz z rodzajami: *Leuconostoc*, *Oenococcus* i *Weissella*. *Fructobacillus* spp. są podzielone na dwie podgrupy na podstawie analizy sekwencji wysoce konserwatywnego regionu genu 16S rRNA. Pierwszy subklaster zawiera *F. fructosus* i *F. durionis*, natomiast w drugim znajdują się gatunki *F. ficulneus*, *F. pseudoficulneus* oraz *F. tropaeoli*. Podobieństwo analizowanej sekwencji 16S rRNA pomiędzy gatunkami waha się od 94,2% do 99,2%. Rodzaj *Fructobacillus* dzieli 90,4% do 94,4% podobieństwa sekwencji z *Leuconostoc*, 82,8% do 83,3% z *Oenococcus* oraz 85,4% do 89,1% z *Weissella* [13].

Gatunki należące do rodzaju *Weissella* oraz większość gatunków LAB posiadają różne regiony międzygenowe (ISR) genu 16S-23S rRNA [40, 44]. Jednakże gatunki *Lactobacillus*, *Leuconostoc* i *Oenococcus* posiadają tylko jeden rodzaj ISR [12, 44]. Pomiędzy sobą rodzaj *Fructobacillus* ma 81,3% do 92,4% podobieństwa jeśli chodzi o regiony ISR, oraz dzielą 69,2–80,1% podobieństwa z gatunkami *Leuconostoc* [13].

Niektóre gatunki *Fructobacillus* posiadają wysokie podobieństwo sekwencji genu 16S rRNA, z tego powodu analiza wielu loci (MLSA) sekwencji genów houskeeping pozwala na bardziej wiarygodne rozróżnienie gatunków *Fructobacillus*. Sekwencje genów *rpoC* oraz *recA* potwierdzają że rodzaj *Fructobacillus* jest różny filogenetycznie od pozostałych LAB [12]. Prace z 2007 roku Chelo i innych oraz De Bruyne i innych potwierdzają niezależność filogenetycznej pozycji gatunków *Fructobacillus* od pokrewnych taksonów [6, 8]. W powyższych badaniach z 2007 roku sekwencje *dnaA*, *rpoC*, *gyrB*, *dnaK*, *pheS*, *atpA* oraz *rpoA* użyto w metodzie MLSA. Okazało się że *F. pseudoficulneus* i *F. tropaeoli* posiadają w 99,2% podobne sekwencje genów 16S rRNA, i w 84,6% posiadają podobne sekwencje genów *recA* [13].

## 7. Krótka charakterystyka wybranych gatunków z rodzaju *Fructobacillus*

### 7.1. *Fructobacillus fructosus*

Po raz pierwszy opisany jako *Lactobacillus fructosus*, został wyizolowany z kwiatów w Japonii i opisany przez Kodama w 1956 roku [28]. Komórki *F. fructo-*

*sus* są Gram-dodatnimi, nieruchliwymi pałeczkami o wymiarach  $0,5-0,8 \times 2-8 \mu\text{m}$ . Zazwyczaj występują pojedynczo lub w parach. Gatunek jest fakultatywnie beztlenowy, katalazo ujemny, należy do obligatoryjnie fruktofilnych bakterii kwasu mlekowego, dlatego też obecność zewnętrznego akceptora elektronów, czyli tlenu, pirogronianu oraz D-fruktozy stymuluje jego wzrost na D-glukozie [12]. W warunkach beztlenowych *F. fructosus* na D-glukozie nie wykazuje wzrostu. Kolonie na agarze GYP po inkubacji przez 2 dni w warunkach tlenowych są białe, gładkie o średnicy 1 do 2 mm, natomiast w warunkach beztlenowych osiągają około 0,1 do 0,2 mm. Optymalna temperatura do wzrostu dla tego gatunku to około 30°C. Wzrost występuje od 6°C do 40°C, w 45°C następuje zahamowanie wzrostu. Optimum pH waha się pomiędzy od 6,5 do 7,0, wzrost nie występuje w pH 4,5. Co ciekawe, szczep *F. fructosus* może rosnąć w obecności 5% NaCl i 40% fruktozy, ze względu na sprawny system osmotyczny [19]. Komórki tych bakterii są heterofermentatywne, produkują kwas mlekowy i kwas octowy z D-glukozy w proporcji 1:1 z bardzo małą ilością etanolu. Gatunek *F. fructosus* potrafi produkować duże ilości kwasu mlekowego i octowego, molowy stosunek wynosi 1:0,6 do 1:0,9. Stosunek molowy etanolu w porównaniu do kwasu mlekowego sięga 0,02:1 [18]. Z D-glukozy jest wytwarzany gaz. Izomer mleczanu jest D(-), mannitol jest wytwarzany z D-fruktozy, molowy stosunek waha się od 0,7:1 do 1:1. Bakteria nie redukuje azotanów. Z sacharozy nie jest produkowany dekstran. Dehydro-laza arginianu nie występuje u tego gatunku. Bakterie *F. fructosus* nie hydrolizują elastyny, żelatyny, kazeiny, fibryny czy eskuliny. Hydrolizują tylko D-fruktozę, D-glukozę oraz mannitol. Wykazuje słabą aktywność fosfatazy alkalicznej, oraz chymotrypsyny [18]. Procentowa zawartość molowa % G+C w DNA wynosi 43. W genomie *F. fructosus* brak jest genu *adhE* [19].

### 7.2. *Fructobacillus ficulneus*

Gatunek ten został wyizolowany z dojrzałej figi z Portugalii w 2002 roku, pierwotnie jako *Leuconostoc ficulneum* [5]. Gatunek *F. ficulneus* to Gram-dodatnie, nieruchliwe pałeczki o wielkości  $0,5 \times 1,5-3 \mu\text{m}$ . Pałeczki występują pojedynczo lub w parach. Wzrost występuje powyżej 6°C i poniżej 40°C, optymalna temperatura wzrostu wynosi 30°C. Brak wzrostu w pH 4,5, optimum pH jest zbliżone do obojętnego od 6,5 do 7,0. Zarówno *F. ficulneus* jak i *F. fructosus* jest zdolny do wzrostu w obecności 5% NaCl lub 40% fruktozy. Gatunek *F. ficulneus* jest fakultatywnym beztlenowcem, który co jest dość wyjątkowe wśród FLAB, wykazuje aktywność katalazy. Należy do obligatoryjnie fruktofilnych LAB, rośnie na pożywce z glukozą jedynie w obecności akceptora elektronów tlenu, pirogro-

nianu i D-fruktozy. W warunkach beztlenowych nie wykazuje wzrostu na pożywce, której jedynym źródłem węgla jest D-glukoza. Kolonie na agarze GYP po inkubacji w warunkach tlenowych po 2 dniach osiągają od 1 do 2 mm, w warunkach beztlenowych około 0,1 do 0,2 mm. Bakterie *F. ficulneus* są heterofermentatywne, produkują z D-glukozy w proporcji 1:1 kwas octowy i kwas mlekowy, natomiast produkują znikome ilości etanolu. Wytwarzają gaz z D-glukozy i z D-fruktozy. Produkują izomer D(-) mleczanu. Bakterie te nie mają zdolności do redukcji azotanów. Nie produkują dekstranu z sacharozy. U tego gatunku nie występuje enzym dehydrolaza argininy, ponadto nie hydrolizuje elastyny, eskuliny, firbyny, kazeiny oraz żelatyny. Stosunek molowy % G+C w DNA jest równy 43 [12].

### 7.3. *Fructobacillus durionis*

Obecnie *F. durionis*, dawniej *Leuconostoc durionis* został wyizolowany z tempoyaku, czyli malezyjskiej fermentowanej kwasowej przyprawy wytwarzanej z mięszu owocu duriana [31]. Są to bakterie Gram-dodatnie, pałeczki o wymiarach  $0,5 \times 2-6 \mu\text{m}$ . Komórki nie posiadają zdolności do ruchu, zazwyczaj występują pojedynczo lub w parach. Optymalny wzrost występuje w temperaturze od  $5^\circ\text{C}$  do  $35^\circ\text{C}$ , zahamowanie wzrostu obserwuje się przy  $45^\circ\text{C}$ . Bakteria jest zdolna do wzrostu na pożywce o 5% zawartości NaCl czy też 40% fruktozy. Są fakultatywnymi beztlenowcami nie wykazują aktywności katalazy. Należą do obligatoryjnie fruktofilnych LAB, gdzie dodatkowy akceptor elektronów tlen, pirogronian oraz D-fruktoza poprawiają wzrost na pożywce z D-glukozą w warunkach tlenowych, zaś w warunkach beztlenowych na pożywce z D-glukozą wzrost nie występuje. Kolonie na pożywce GYP po inkubacji przez 2 dni są gładkie i białe, w warunkach tlenowych osiągają około 1–2 mm średnicy, zaś w beztlenowych warunkach około 0,1–0,2 mm. Gatunek *F. durionis* jest heterofermentatywny i produkuje małe ilości etanolu oraz kwas mlekowy i octowy z D-glukozy w ilości 1:1 [12]. Gaz jest produkowany z D-glukozy, izomer mleczanu jest D(-). Z D-fruktozy produkowany jest mannitol. Gatunek ten nie redukuje azotanów oraz nie produkuje dekstranu z sacharozy ani amoniaku z argininy. Procentowa molowa zawartość G+C DNA wynosi 44 [13].

### 7.4. *Fructobacillus pseudoficulneus*

Gatunek ten został wyizolowany z dojrzałej figi z regionu Alentejo w Portugalii w 2006 roku, pierwotnie zaklasyfikowany jako *Leuconostoc pseudoficulneus* [5]. Komórki są Gram-dodatnimi, jajowatymi pałeczkami, osiągającymi rozmiary  $0,5 \times 1-5 \mu\text{m}$ . Występują pojedynczo lub w parach, nie posiadają zdolności do

ruchu oraz nie zarodnikują. Kolonie są małe, gładkie, okrągłe, wypukłe o nieprzejrzysto szaro-białym kolorze. Optimum temperaturowe do wzrostu to około  $30^\circ\text{C}$ , przy czym wzrost występuje od  $37^\circ\text{C}$  do  $4^\circ\text{C}$ . Optymalne pH dla tego gatunku waha się pomiędzy 6,5 i 7,0 lecz komórki mogą występować w pH od 4,8 do 8,5. Gatunek *F. pseudoficulneus* wykazuje wzrost na pożywce z 3% i 5% zawartością NaCl, lecz nie przy stężeniu 10% NaCl. Bakterie te są fakultatywnie beztlenowe i obligatoryjnie fruktofilne, dodatkowy akceptor elektronów taki jak pirogronian, tlen czy D-fruktoza jest niezbędny do wzrostu na D-glukozie w warunkach beztlenowych. Kolonie na agarze GYP po dwudniowej inkubacji osiągają w warunkach tlenowych 1–2 mm, w warunkach beztlenowych około 0,1–0,2 mm średnicy [13]. Bakterie należące do tego gatunku są zdolne do wzrostu w obecności 40% fruktozy. Aktywność katalazy i oksydazy cytochromu nie została wykryta u tego gatunku. Dehydrolaza argininy nie jest produkowana. Nie zaobserwowano wzrostu w obecności 10% etanolu. Gaz jest produkowany z D-glukozy. Występuje D(-) izomer mleczanu. Gatunek *F. pseudoficulneus* to bakterie heterofermentatywne, produkują kwas mlekowy i octowy w ilości 1:1 oraz śladowe ilości etanolu. Mannitol jest produkowany z D-fruktozy, azotany nie są redukowane. Dekstran nie jest produkowany z sacharozy. W komórkach przeważają kwasy tłuszczowe 11, 12-okradecenowy (18:1D11, 18:1v7c) i kwas heksadekanowy. Nie produkowany jest żółty pigment. Żelatyna, skrobia eskulina nie są hydrolizowane. Kwas może być wytwarzany z D-fruktozy, D-glukozy i D-mannitolu, natomiast nie jest wytwarzany z D-adonitolu, amigdaliny, L-arabinozy, D-arabitolu, arbutyny, celobiozy, dulcitolu, eskuliny, erytrytolu, D-fukozy, D-galaktozy,  $\beta$ -gencjiozy, glukonianu, glicerolu, glikogenu, inozytolu, insuliny, laktozy, D-maltozy, D-mannozy, D-melezytozy, D-melibiozy, D-rafinozy, L-ramnozy, D-rybozy, salicyny, D-sorbitolu, L-sorbozy, sacharozy, D-trehalozy, D-turanozy, ksylitolu lub D-ksylozy. Aktywność fosfataz alkalicznych i kwasowych oraz  $\alpha$ -chymotrypsyny została wykryta. Typowy szczep to LC51T (= DSM 15468T = CECT 5759T), gdzie zawartość G+C w DNA to 44,5 mol% [5].

### 7.5. *Fructobacillus tropaeoli*

Gatunek opisany przez Endo i innych w 2011, wyizolowany z kwiatu nasturcji *Tropaeolum majus* z południowej Afryki. W celu izolacji świeże kwiaty zostały zebrane w czerwcu 2009 roku, przeniesione i rozdrobione w sterylnych plastikowych torebkach, do których następnie dodano pożywki FYP, inkubowano oraz przeniesiono na płytki z agarem. Po wielokrotnych pasażach uzyskano czyste izolaty. Bazując na analizie filogenetycznej genu 16S rRNA, *F. tropaeoli* został ujęty

w podgrupie z *F. ficulneus* oraz *F. pseudoficulneus*. Szczep wykazywał wszystkie cechy specyficzne dla obligatoryjnych FLAB [10]. Komórki są Gram-dodatnie, pałeczkowatego kształtu o wymiarach  $0,8 \times 1,5-6 \mu\text{m}$ , występują pojedynczo, w parach lub w formie łańcuszków. Gatunek dobrze rośnie w  $15^\circ\text{C}$ , słabo w  $10^\circ\text{C}$ , a zahamowanie wzrostu następuje w  $45^\circ\text{C}$  [18]. Optymalne pH wynosi 4–8 i dopuszczalna jest obecność 2,5% NaCl. Nie wykazuje wzrostu natomiast przy 30% stężeniu fruktozy. Bakterie z gatunku *F. tropaeoli* nie wykazują aktywności katalazy i są fakultatywnie beztlenowe. Są obligatoryjnie fruktofilne, wzrost na D-glukozie zostaje poprawiony wraz z dodaniem zewnętrznego akceptora elektronów czyli tlenu lub pirogronianu. Wzrost na D-glukozie jest wstrzymany w warunkach beztlenowych. Po inkubacji przez 2 dni na agarze GYP, kolonie są białe gładkie i w warunkach tlenowych osiągają 1–2 mm średnicy, w warunkach beztlenowych kolonie są mniejsze o średnicy 0,1–0,2 mm. Heterofermentatywne bakterie *F. tropaeoli* produkują kwas mlekowy i octowy z D-glukozy, w stosunku 1:1, przy jednoczesnej produkcji niewielkich ilości etanolu. Gaz jest produkowany z D-glukozy, D- i L-mleczan są produkowane w stosunku 9:1. Z D-fruktozy produkowany jest mannitol, azotany nie są redukowane. Kwas jest produkowany tylko z D-fruktozy, D-glukozy i mannitolu. D-fruktoza jest fermentowana szybciej niż D-glukoza. Kwas nie jest produkowany z D- lub L-arabinozy, D- lub L-arabitolu, N-acetyloglukozaminy, maltozy, rybozy, adonitolu, amigdaliny, arbutyny, celobiozy, dulcitolu, eskuliny, erytrytolu, D- lub L-fruktozy,  $\beta$ -gencjobiozy, 2- lub 5-ketoglukonianu, glukonianu potasu, metylo- $\alpha$ -D-glukozydu, glicerolu, glikogenu, mio-inozytolu, inuliny, D-liksozy, D-mannozy,  $\alpha$ -D-mannozydu metylu, melezytozy, rafinozy, ramnozy, sacharozy, salicyny, skrobi, sorbitolu, L-sorbozy, D-tagalozy, trehalozy, turanozy, ksylitolu, L-ksylozy, D-galaktozy, laktozy, melibiozy, D-ksylozy. Dekstran nie jest wytwarzany z sacharozy. W składzie peptydoglikanu komórek bakterii *F. tropaeoli* nie występuje kwas mezo-diaminopimelinowy. Procentowa molowa zawartość G+C w DNA wynosi 44 [13].

### 7.6. *Lactobacillus kunkeei*

Gatunek ten został wyizolowany w 1998 roku z dostępnego w handlu wina Cabernet Sauvignon charakteryzującego się powolnie przechodzącą fermentacją [9]. Bakterie kwasu mlekowego są powszechnie uważane za organizmy powodujące psucie napojów alkoholowych, ze względu na produkcję kwasu octowego i innych związków zmieniających smak czy zapach [7]. W roku odkrycia *Lb. kunkeei* nie zauważono fruktofilnych właściwości tych bakterii. Dopiero w 2009 r. szczepy *Lb. kunkeei* zostały wyizolowane ponownie z wina, kwiatów oraz miodu i zaklasyfikowane przez

Endo i wsp. do obligatoryjnie fruktofilnych bakterii kwasu mlekowego [10, 11]. Wszystkie wyizolowane szczepy rosły bardzo dobrze na fruktozie, a słabo na glukozie. Jednakże obserwowano znaczną poprawę wzrostu na pożywce na bazie glukozy, poprzez dodatek 1% pirogronianu lub poprzez hodowlę tlenową z wytrząsaniem, co sugeruje, iż bakterie te potrzebują zewnętrznego akceptora elektronów do metabolizmu glukozy. Powyższa obserwacja jest zgodna z definicją obligatoryjnie fruktofilnych bakterii kwasu mlekowego [18]. Co ciekawe, szczep *Lb. kunkeei* DSM 12361<sup>T</sup> rośnie wolno zarówno na glukozie jak i na fruktozie, szczep potrzebuje od 5 do 7 dni aby urosnąć na obu podłożach. Wzrost szczepu *Lb. kunkeei* DSM 12361<sup>T</sup> na glukozie poprawił się poprzez dodanie pirogronianu lub hodowlę w warunkach tlenowych. Interesującym jest fakt, iż dany szczep rośnie bardzo powoli na glukozie lub na fruktozie, natomiast bardzo dobrze przy wspólnej fermentacji glukozy i fruktozy. Bakterie należące do szczepu *Lb. kunkeei* DSM 12361<sup>T</sup> produkują mannitol z fruktozy, co oznacza że cukier ten jest wykorzystany jako akceptor elektronów w ko-fermentacji. Szczep *Lb. kunkeei* DSM 12361<sup>T</sup> w warunkach tlenowych rośnie dobrze na pożywce z glukozą, natomiast przy suplementacji fruktozą wzrost jest niewielki, co sugeruje iż fruktoza jest bardzo słabo metabolizowana. Może to wynikać ze słabej aktywności fosfatazy fosfoenolpirogronianu cukru (PTS) dla fruktozy. *Lactobacilli* zwykle posiadają dwa systemy wychwytu fruktozy, to jest fruktozowy-PTS który pozwala na wykorzystanie fruktozy jako substratu oraz poprzez użycie permeazy fruktozy która umożliwia bakterii wykorzystanie fruktozy jako akceptora elektronów [1]. Specyficzny transporter fruktozy/mannitolu jest zwykle obecny u bakterii kwasu mlekowego [7]. W przypadku szczepu *Lb. kunkeei* DSM 12361<sup>T</sup>, który używa fruktozy jako akceptora elektronów, ale słabo jako substratu, szczep ten może mieć bardzo słabą aktywność transportera fruktozy/mannitolu właściwego dla PTS. Dehydrogenaza mannitolu, która działa jako akceptor elektronów w metabolizmie fruktozy [21], jest niezwiązana z PTS. Jednakże *Lb. kunkeei* oficjalnie zaklasyfikowany jest to obligatoryjnych FLAB przez Endo [10], ponieważ wszystkie szczepy *Lb. kunkeei* produkują gaz z D-glukozy, wytwarzają równomolową ilość kwasu octowego i mlekowego oraz nieznaczne ilości etanolu (w stosunku molowym odpowiednio 1:0,9–1,2:0,005–0,01). Cechy te są unikalne w grupie obligatoryjnych heterofermentatywnych bakterii kwasu mlekowego, lecz także skorelowane z charakterystyką bakterii obligatoryjnych fruktofilnych bakterii kwasu mlekowego, włączając w to gatunki *Fructobacillus* [12].

Gatunek *Lb. kunkeei* jest Gram-dodatnią bakterią, o pałeczkowatym kształcie o rozmiarach  $0,5 \times 1-1,5 \mu\text{m}$ . Komórki występują pojedynczo, w parach, lub mogą

tworzyć łańcuszki. Są fakultatywnie beztlenowe, katalazo-ujemne, jednakże w obecności hemu uaktywniają się aktywność katalazy. Kolonie na agarze MRS po inkubacji w 30°C po dwóch dniach są białe, nieprzezroczyste, gładkie i wklęsłe, ich średnica w warunkach tlenowych mierzy około 1–2 mm, w beztlenowych są znacznie mniejsze około 0,1–0,2 mm średnicy [9]. Bakterie *Lb. kunkeei* preferuje temperatury w granicach 15–40°C, w 45°C następuje zahamowanie wzrostu. Komórki zwykle rosną przy pH 4,5–6,8, dla niektórych szczepów nawet 5,5–6,8 [11]. Gatunek ten wykazuje słaby wzrost na pożywce o 5% zawartości NaCl. Szczepy produkują prawie równomolową ilość kwasu mlekowego i octowego, przy śladowych ilościach etanolu. Kwas D-mlekowy i L-mlekowy są produkowane w stosunku 2:8. Gaz jest produkowany z glukozy. Mannitol jest produkowany z fruktozy. Azotyny nie są redukowane. Amoniak nie jest przekształcany z argininy. Dekstran nie jest wytwarzany z sacharozy. Cytrynian i jabłczan są wykorzystywane w obecności glukozy [9]. Peptydoglikan ściany komórkowej tego gatunku jest typu A4a (L-Lys-D-Asp). Zawartość G+C w DNA jest w zakresie od 36 do 37 mol%. Kwas jest produkowany z D-fruktozy, D-glukozy, i sacharozy. W zależności od

szczepu produkowany jest kwas z D-galaktozy, mannitolu, melibiozy, trehalozy, i w małym stopniu z glukonianu potasu. Kwas nie jest wytwarzany z L-arabinozy, L- i D-arbitolu, maltozy, D-arabinozy, rybozy, N-acetyloglukozaminy, aonitolu, arbutyny, amigdaliny, celobiozy, eskuliny, erytrytolu, L- i D-fukozy, β-gencjobiozy, 2 i 5-ketoglukoniany, metylo-α-D-glukozydu, rafinozy, melezytozy, ramnozy, salicyny, sorbitolu, skrobi, L-sorbozy, turanozy, D-tagatozy, L- i D-ksylozy, ksylitolu, α-D-mannozydu metylu oraz laktozy [11].

### 7.7. *Lactobacillus florum*

W 2010 roku wyizolowano *Lb. florum* z kwiatów *Paeonia suffruticosa*, i *Chrysanthemoides monilifera* pochodzących z Stellenbosch oraz z Hermanus z RPA. Gatunek *Lb. florum* jest wyjątkowy wśród FLAB ze względu na jego fakultatywną fruktofilność [17]. Bakterie z gatunku *Lb. florum* wykazują powolny wzrost na D-glukozie bez zewnętrznego akceptora elektronów oraz produkują etanol z D-glukozy, co jest cechą charakterystyczną dla fakultatywnie fruktofilnych LAB [10]. Wytwarza kwas tylko z D-glukozy, D-fruktozy, przy czym fermentacja D-fruktozy przebiega szybciej

Tabela I  
Porównanie wybranych cech fruktofilnych bakterii kwasu mlekowego

	<i>F. fructosus</i>	<i>F. ficulneus</i>	<i>F. pseudo-ficulneus</i>	<i>F. tropaeoli</i>	<i>F. durionis</i>	<i>Lb. kunkeei</i>	<i>Lb. florum</i>
Gram	+	+	+	+	+	+	+
Morfologia	pałeczki	pałeczki	pałeczki	pałeczki	pałeczki	pałeczki	pałeczki
Tolerancja tlenu	fakultatywnie beztlenowy	fakultatywnie beztlenowy	fakultatywnie beztlenowy	fakultatywnie beztlenowy	fakultatywnie beztlenowy	fakultatywnie beztlenowy	fakultatywnie beztlenowy
Próba na katalazę	ujemna	dodatnia	ujemna	ujemna	ujemna	dodatnia	ujemna
Rodzaj FLAB	obligatoryjnie fruktofilny	obligatoryjnie fruktofilny	obligatoryjnie fruktofilny	obligatoryjnie fruktofilny	obligatoryjnie fruktofilny	obligatoryjnie fruktofilny	fakultatywnie fruktofilny
Typ fermentacji, główne produkty	heterofermentatywne, produkują kwas mlekowy i octowy	heterofermentatywne, produkują kwas mlekowy i octowy	heterofermentatywne, produkują kwas mlekowy i octowy	heterofermentatywne, produkują kwas mlekowy i octowy	heterofermentatywne, produkują kwas mlekowy i octowy	heterofermentatywne, produkują kwas mlekowy i octowy	heterofermentatywne, produkują kwas mlekowy i octowy
Gaz z glukozy	tak	tak	tak	tak	tak	tak	tak
Rodzaj izomeru mleczanu	D(-)	D(-)	D(-)	D(-)	D(-)	brak danych	brak danych
Redukcja azotanów	nie redukuje	nie redukuje	nie redukuje	nie redukuje	nie redukuje	nie redukuje	nie redukuje
Dekstran z sacharozy	nie	nie	nie	nie	nie	nie	nie
Optimum temperaturowe	30°C	30°C	30°C	15°C	35°C	30°C	30°C
Wzrost w temperaturze	6–45°C	6–40°C	4–37°C	10–45°C	5–45°C	15–45°C	15–45°C
Zakres pH	6,5–7,0	6,5–7,0	4,8–8,5	4,0–8,0	6,5–7,0	4,4–6,8	4,0–8,0
Wzrost na 5% NaCl	tak	tak	tak	nie	tak	tak*	tak
Wzrost na 40% fruktozie	tak	tak	tak	nie	tak	tak*	tak*
Piśmiennictwo	[2, 10, 12, 28,]	[2, 12, 13]	[5, 12]	[14, 18]	[3, 16]	[12, 31] *–badania własne	[5, 38] *–badania własne

niż D-glukozy. Dobry wzrost obserwowano na D-fruktozie, D-glukozie w obecności zewnętrznego akceptora elektronów. Bakterie te są heterofermentatywne, wytwarzają kwas mlekowy, etanol i kwas octowy odpowiednio w stosunku 1:0,8:0,2. Komórki *Lb. florum* są Gram-dodatnie, nie ruchliwe, wielkości  $0,8 \times 1,5-7 \mu\text{m}$ . Pałeczki występują pojedynczo w parach lub w formie łańcuszków. Preferowana temperatura do wzrostu to zakres  $15-40^\circ\text{C}$ , ale nie  $45^\circ\text{C}$ . Rośnie w pH 4,0–8,0 oraz w obecności 5% NaCl. Gatunek ten jest osmotolerancyjny, komórki rosną w stężeniu 30% fruktozy, należą do fakultatywnych beztlenowców. Test na katalazę jest zazwyczaj negatywny, lecz aktywność katalazy można zaobserwować u komórek rosnących na agarze FYP zawierających 5% owczej krwi. Kolonie na agarze FYP są beżowe, gładkie i po 3 dniach osiągają średnicę 1–2 mm w beztlenowych warunkach. Wzrost kolonii w warunkach tlenowych jest słaby. Gaz jest produkowany z D-glukozy. D-mleczan i L-mleczan są produkowane w stosunku 1:1. Azotyny nie są redukowane. Glukonian potasu jest słabo fermentowany. Kwas nie jest produkowany z L- i D-arabinozy, N-acetyloglukozaminy, D-arabitolu, maltozy, rybozy, celobiozy, L-arabitolu, adonitolu, amigdaliny, arutyny, eskuliny, dulcitolu, erytrytolu, L- i D-fukozy,  $\beta$ -gencjobiozy, 2 i 5-ketoglukonianu, metylo- $\alpha$ -D-glukozydu, glikogenu, D-galaktozy, melibiozy, mannitolu, inuliny, inozytolu, D-liksozy, D-mannozy, sacharozy, rafinozy, glicerolu, melezytozy, ramnozy, salicyny, sorbitolu, skrobi, L-sorbozy, turanozy, trehalozy, D-tagatozy, L- i D-ksylozy, ksylitolu,  $\alpha$ -D-mannozydu metylu oraz laktozy. Dekstran nie jest wytwarzany z sacharozy. Pirogromian zwiększa wzrost szczepów. Gatunek nie zawiera kwasu mezo-diaminopimelinowego w peptydoglikanie ściany komórkowej. Procentowa molowa zawartość G+C w DNA wynosi 42. Typowy szczep to F9-1<sup>T</sup> = Jcm 16035<sup>T</sup> = DSM 22689<sup>T</sup> [17].

## 8. Podsumowanie

Pomimo iż istnieje stosunkowo wiele informacji naukowych na temat bakterii kwasu mlekowego, to wciąż odkrywano są mikroorganizmy o nowych właściwościach, klasyfikowane w oddzielne grupy. Występowanie i przystosowanie się grupy LAB do wielu różnorodnych nisz ekologicznych, jest możliwe dzięki różnorodnemu potencjałowi metabolicznemu tych bakterii [21]. Analiza porównawcza genomu pokazała, że w trakcie ewolucji, *Lactobacillus* znacznie odbiegł od swoich przodków [32]. Genomowe i metaboliczne uproszczenie poprzez utratę genów lub ich degradację, spowodowało adaptację do środowisk produktów spożywczych takich jak mleko, piwo, wino czy też miód, w których obecne węglowodany stały się głównym źród-

łem węgla dla bytujących w nich bakterii [4, 36]. Fruktofilne bakterie kwasu mlekowego są wyjątkową grupą opisaną niedawno [4], posiadającą niepowtarzalne charakterystyczne cechy, do których należy dobry wzrost na D-fruktozie i D-glukozie w obecności zewnętrznego akceptora elektronów, przy preferencji i szybszej fermentacji D-fruktozy. Do tej pory opisano sześć obligatoryjnie fruktofilnych gatunków *F. fructosus*, *F. durionis*, *F. ficulneus*, *F. pseudoficulneus* [12], *Lb. kunkeei* [10], *F. tropaeoli* [18] oraz jeden fakultatywnie fruktofilny *Lb. florum* [17]. Coraz częściej odkrywano są nowe gatunki posiadające fruktofilne cechy na przykład *Weissella confusa/cibaria*. Ewolucja bakterii w stronę fruktofilności zazwyczaj występuje na poziomie całego gatunku, lecz w przypadku niektórych gatunków bakterii właściwości te posiadają tylko niektóre szczepy [16].

Analiza szczepów izolowanych z przewodów pokarmowych pszczoł będących w różnych stadiach rozwoju, czy też z miodu i świeżego pyłku pszczelego wykazała u wszystkich szczepów fruktofilny charakter. Sugeruje to, iż pszczoły są bogatym i efektywnym źródłem FLAB. Co ciekawe, na podstawie wyników badań genetycznych izolaty FLAB pogrupowane zostały w grupy genetyczne, zgodne z ich źródłem pochodzenia, co wskazuje, że niektóre grupy genetyczne są wspólne dla pszczoł, larw i ich produktów [15]. Ponadto badania sugerują, iż fruktofilne bakterie kwasu mlekowego wraz z innymi gatunkami charakterystycznymi dla kwiatów i nektaru, mogą stanowić istotny czynnik zwabiania owadów zapylających. Ponad 200 gatunków roślin europejskich jest uznawanych za kwiaty często odwiedzane przez pszczoły miodne (*Apis mellifera* L.) [35]. Zauważono, iż indywidualna pszczoła ma tendencję trzymania się jednego rodzaju kwiatów przez pewien okres czasu, i spożywa nektar tylko z tego wybranego gatunku [22, 35]. Skłania to do głębszej analizy udziału mikroorganizmów w tym ekosystemie, albowiem stanowią niewidzialną większość, pod względem ilości jak i różnorodności gatunków, stąd też mogą odgrywać kluczową rolę w funkcjonowaniu zapylaczy [20, 43]. Metabolizm fruktofilnych bakterii kwasu mlekowego sprawia, iż bakterie te mogą mieć wpływ na profil chemiczny nektaru, metabolizując jego pewne składniki.

W ten sposób bakterie bezpośrednio kontrolują owady zapylające, a tym samym wpływają pośrednio na kondycję roślin [25, 26, 42]. Poznanie fruktofilnych gatunków kwasu mlekowego i innych bakterii kultur nektarowych jest kluczowym czynnikiem do poznania ekologii roślin i ich zapylaczy [22]. Odkrycie grupy FLAB znacznie poszerza informacje na temat bakterii kwasu mlekowego. Unikalne cechy fruktofilnych bakterii są ściśle powiązane z bogatym w składniki odżywcze środowiskiem, w którym żyją. Ich nietypowy metabolizm niesie ze sobą ogromny potencjał do przyszłego wykorzystania w przemyśle.



## Piśmiennictwo

- Akinterinwa O., Khankal R., Cirino P.C.: Metabolic engineering for bioproduction of sugar alcohols. *Curr. Op. Biotechnol.* **19**, 461–467 (2008)
- Antunes A., Rainey F.A., Nobre M.F., Schumann P., Ferreira A.M., Ramos A., Santos H., da Costa M.S.: *Leuconostoc ficulneum* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from a ripe fig, and reclassification of *Lactobacillus fructosus* as *Leuconostoc fructosum* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* **52**, 647–655 (2002)
- Axelsson L.: Lactic acid bacteria: classification and physiology (w) Lactic Acid Bacteria. red. S. Salminen, A. von Wright, A. Ouwehand, Marcel Dekker Inc., New York, 1993, s. 1–63
- Azcarate-Peril M.A., Klaenhammer T.R.: Genomics of lactic acid bacteria: The post-genomics challenge – from sequence to function (w) Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel Applications. red. F. Mozzi, R.R. Raya, G.M. Vignolo, Wiley-Blackwell, Hoboken, 2010, s. 32–54
- Chambel L., Chelo I.M., Ze' Ze' L., Pedro L.G., Santos M.A., Tenreiro R.: *Leuconostoc pseudoficulneum* sp. nov., isolated from a ripe fig. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* **56**, 1375–1381 (2006)
- Chelo I.M., Zé-Zé L., Tenreiro R.: Congruence of evolutionary relationships inside the *Leuconostoc-Oenococcus-Weissella* clade assessed by phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene, *dnaA*, *gyrB*, *rpoC* and *dnaK*. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* **57**, 276–286 (2007)
- Davis C.R., Wibowo D., Eschenbruch R., Lee T.H., Fleet G.H.: Practical implications of malolactic fermentation: a review. *Am. J. Enol. Viticult.* **36**, 290–301 (1985)
- De Bruyne K., Schillinger U., Caroline L., Boehringer B., Cleenwerck I., Vancanneyt M., De Vuyst L., Franz C.M.A.P., Vandamme P.: *Leuconostoc holzapfelii* sp. nov., isolated from Ethiopian coffee fermentation and assessment of sequence analysis of housekeeping genes for delineation of *Leuconostoc* species. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* **57**, 2952–2959 (2007)
- Edwards C.G., Haag K.M., Collins M.D., Hutson R.A., Huang Y.C.: *Lactobacillus kunkeei* sp. nov.: a spoilage organism associated with grape juice fermentations. *J. Appl. Microbiol.* **84**, 698–702 (1998)
- Endo A., Futagawa-Endo Y., Dicks L.M.T.: Isolation and characterization of fructophilic lactic acid bacteria from fructoserich niches. *Syst. Appl. Microbiol.* **32**, 593–600 (2009)
- Endo A., Irisawa T., Futagawa-Endo Y., Takano K., du Toit M., Okada S., Dicks L.M.: Characterization and emended description of *Lactobacillus kunkeei* as a fructophilic lactic acid bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* **62**, 500–504 (2012)
- Endo A., Okada S.: Reclassification of the genus *Leuconostoc*, and proposals of *Fructobacillus fructosus* gen. nov., comb. nov., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* **58**, 2195–2205 (2008)
- Endo A., Dicks L.M.T.: The genus *Fructobacillus*. Lactic acid bacteria biodiversity and taxonomy (w) Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy. red. H.W. Holzapfel, B.J.B. Wood, Wiley-Blackwell, Hoboken, 2014, s. 381–385
- Endo A.: Fructophilic lactic acid bacteria inhabit fructose-rich niches in nature. *Microb. Ecol. Health D.*, DOI: 10.3402/mehd.v23i0.18563 . (2012)
- Endo A., Salminen S.: Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **36**, 444–448 (2013)
- Endo A., Futagawa-Endo Y., Dicks L.M.T.: Influence of carbohydrates on the isolation of lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* **110**, 1085–1092 (2011)
- Endo A., Futagawa-Endo Y., Sakamoto M., Kitahara M., Dicks L.M.: *Lactobacillus florum* sp. nov., a fructophilic species isolated from flowers. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* **60**, 2478–2482 (2010)
- Endo A., Irisawa T., Futagawa-Endo Y., Sonomoto K., Itoh K., Takano K., Okada S., Dicks L.M.T.: *Fructobacillus tropaeoli* sp. nov., a novel fructophilic lactic acid bacterium isolated from a flower. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* **61**, 898–902 (2011)
- Endo A., Tanaka N., Oikawa Y., Okada S., Dicks L.: Fructophilic characteristics of *Fructobacillus* spp. may be due to the absence of an alcohol/acetaldehyde dehydrogenase gene (*adhE*). *Curr. Microbiol.* **68**, 531–535 (2014)
- Fuhrman J.A.: Microbial community structure and its functional implications. *Nature*, **459**, 193–199 (2009)
- Gajewska J., Blaszczyk M.K.: Probiotyczne bakterie fermentacji mlekowej (LAB). *Post. Mikrobiol.* **51**, 55–65 (2012)
- Gruter C., Moore H., Firmin N., Helantera H., Ratnieks F.L.: Flower constancy in honey bee workers (*Apis mellifera*) depends on ecologically realistic rewards. *J. Exp. Biol.* **214**, 1397–1402 (2011)
- Hammes W.P., Hertel C.: The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. (w) The Prokaryotes. red. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt, Springer, New York, 2006, s. 320–403
- He H., Chen Y., Zhang Y., Wei C.: Bacteria associated with gut lumen of *Camponotus japonicus* Mayr. *Environ. Entomol.* **40**, 1405–1409, (2011)
- Herrera C.M., Garcia I.M., Perez R.: Invisible floral larcenies: microbial communities degrade floral nectar of bumble bee-pollinated plants. *Ecology*, **89**, 2369–2376 (2008)
- Herrera C.M., Pozo M.I.: Nectar yeasts warm the flowers of a winter-blooming plant. *P. Roy. Soc. Lond. B. Bio.* **277**, 1827–1834 (2010)
- Klaenhammer T.R., Altermann E., Pfeiler E., Buck B.L., Goh Y.J., O'Flaherty S., Barrangou R., Duong T.: Functional genomics of probiotic *Lactobacilli*. *J. Clin. Gastroenterol.* **42**, 160–162 (2008)
- Kodama R.: *Lactobacillus fructosus* nov. sp., a new species of lactic acid bacteria. Studies on the nutrition of lactic acid bacteria. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* **30**, 705–708 (1956)
- Koo O.K., Jeong D.W., Lee J.M., Kim M.J., Lee J-H., Chang H.C., Kim J.H., Lee H.J.: Cloning and characterization of the bifunctional alcohol/acetaldehyde dehydrogenase gene (*adhE*) in *Leuconostoc mesenteroides* isolated from kimchi. *Biotechnol. Lett.* **27**, 505–510 (2005)
- Lefeber T., Gobert W., Vrancken G., Camu N., De Vuyst L.: Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during spontaneous cocoa bean fermentation in vessels. *Food Microbiol.* **28**, 457–464 (2011)
- Leisner J.J., Vancanneyt M. i wsp.: *Leuconostoc durionis* sp. nov., a heterofermenter with no detectable gas production from glucose. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* **55**, 1267–1270 (2005)
- Makarova K., Slesarev A., i wsp.: Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **42**, 15611–15616 (2006)
- Makarova K.S., Koonin E.V.: Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.* **189**, 1199–1208 (2007)
- Marri P.R., Hao W., Golding G.B.: Gene gain and gene loss in streptococcus: is it driven by habitat? *Mol. Biol. Evol.* **23**, 2379–2391 (2006)
- Moran N.A., Hansen A.K., Powell J.E., Sabree Z.L.: Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. *PLoS One*, **7**, e36393 (2012)
- Mtshali P.S., Divol B., Du Toit M.: Identification and characterization of *Lactobacillus florum* strains isolated from South African grape and wine samples. *Int. J. Food Microbiol.* **153**, 106–113 (2012)

37. Nielsen D.S., Teniola O.D., Ban-Koffi L., Owusu M., Andersson T.S., Holzapfel W.H.: The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.* **114**, 168–186, (2007)
38. Nuraida L., Grigolava I., Owens J.D., Campbell-Platt G.: Oxygen and pyruvate as external electron acceptors for *Leuconostoc* spp. *J. Appl. Bacteriol.* **72**, 517–522, (1992)
39. Papalexandratou Z., Falony G., Romanens E., Jimenez J.C., Amores F., Daniel H.M., De Vuyst L.: Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of the microbiota associated with traditional ecuadorian spontaneous cocoa bean fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 7698–7714 (2011)
40. Rachman C.N., Kabadjova H., Prévost H., Dousset X.: Identification of *Lactobacillus alimentarius* and *Lactobacillus farciminis* with 16S-23S rDNA intergenic spacer region polymorphism and PCR amplification using species-specific oligonucleotide. *J. Appl. Microbiol.* **95**, 1207–1216 (2003)
41. Thaochan N., Drew R.A., Hughes J.M., Vijayasegaran S., Chinajariyawong A.: Alimentary tract bacteria isolated and identified with API-20E and molecular cloning techniques from Australian tropical fruit flies, *Bactrocera cacuminata* and *B. tryoni*. *J. Insect Sci.* **10**, 1–16 (2010)
42. Vannette R.L., Gauthier M.P.L., Fukami T. Nectar bacteria, but not yeast, weaken a plant-pollinator mutualism. *P. Roy. Soc. Lond. B. Bio.* **280**, DOI: 10.1098/rspb.2012.2601 (2012)
43. Whitman W.B., Coleman D.C., Wiebe W.J. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6578–6583 (1998)
44. Zavaleta A.I., Martinez-Murcia A.J., Rodriguez-Valera F.: 16S-23S rDNA intergenic sequences indicate that *Leuconostoc oenos* is phylogenetically homogeneous. *Microbiology*, **142**, 2102–2114 (1996)

**Sebastian Niestępski<sup>1</sup>, Monika Harnisz<sup>1\*</sup>, Ewa Korzeniewska<sup>1</sup>,  
Adriana Osińska<sup>1</sup>, Bartłomiej Dziuba<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Katedra Mikrobiologii Środowiskowej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

<sup>2</sup>Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wpłynęło w czerwcu 2016 r.

Zaakceptowano w październiku 2016 r.

1. Wstęp. 2. Systematyka bakterii z rodzaju *Bacteroides*. 3. Znaczenie kliniczne *Bacteroides* spp. 4. Oporność na leki u *Bacteroides* spp. 4.1. Bakterie z rodzaju *Bacteroides* jako rezerwuar determinantów oporności. 4.2. Oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe. 5. Metody określania lekowrażliwości. 6. Podsumowanie

#### ***Bacteroides* spp. – clinical significance, antibiotic resistance and identification methods**

**Abstract:** Anaerobic *Bacteroides* species are dominant microbiota of the digestive tract of mammals. Along with other symbiotic bacteria located in the gastrointestinal tract, they contribute to the proper functioning of the organism. Some *Bacteroides* species are highly pathogenic. Virulence of these bacteria is related to their polysaccharide capsule, lipopolysaccharide and a variety of enzymes and enterotoxin. In recent years, an increase of antibiotic resistance in *Bacteroides* spp. has been noted, therefore the changes to the antibiotic resistance patterns in these bacteria should be monitored. This study summarizes the current knowledge about the bacteria of *Bacteroides* species.

1. Introduction. 2. Taxonomy of *Bacteroides* species. 3. Clinical significance of *Bacteroides* spp. 4. Antibiotic resistance. 4.1. *Bacteroides* species as a reservoir of antimicrobial resistance determinants. 4.2. Antimicrobial resistance. 5. Methods of drug resistance determination. 6. Summary

**Słowa kluczowe:** antybiotykooporność, *Bacteroides*, chorobotwórczość

**Key words:** antibiotic resistance, *Bacteroides*, pathogenicity

## **1. Wstęp**

Bakterie z rodzaju *Bacteroides* są bakteriami beztlenowymi, stanowiącymi dominującą mikrobiotę przewodu pokarmowego ssaków. Wraz z innymi bakteriami symbiotycznymi, znajdującymi się w przewodzie pokarmowym, przyczyniają się do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Biorą udział w koordynacji układu immunologicznego, pobudzaniu motoryki przewodu pokarmowego oraz przekształcaniu steroidów i kwasów żółciowych; zapobiegają też osiedlaniu się bakterii patogennych. Bakterie z rodzaju *Bacteroides* występują także w obrębie jamy ustnej, górnych odcinków układu oddechowego oraz w układzie moczowo-płciowym kobiet.

Niektóre gatunki z rodzaju *Bacteroides* zaliczane są do potencjalnych patogenów, np. *B. fragilis* jest oportunistycznym patogenem człowieka, wywołującym zakażenia jamy otrzewnej, przewodu pokarmowego oraz zapalenia wyrostka robaczkowego przez wytworzenie ropnia. Ponadto u *Bacteroides* spp. wykrywa się coraz częściej geny oporności na antybiotyki, co może stwarzać zagrożenie dla zdrowia ludzi.

## **2. Systematyka bakterii z rodzaju *Bacteroides***

Taksonomia rodzaju *Bacteroides* uległa w ostatnich latach wielu zmianom. Początkowo do tego rodzaju zaliczane były wszystkie ściśle beztlenowe, Gram-

-ujemne pałeczki, nie wytwarzające przetrwalników, które nie należały do *Fusobacterium* spp. czy *Leptotrichia* spp. Zmieniona systematyka *Bacteroides* i rodzajów spokrewnionych opiera się na analizach filogenetycznych sekwencji genu 16S rDNA i została przedstawiona w drugim wydaniu podręcznika „Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” [32].

Poniżej przedstawiono szczegółową systematykę rodzaju *Bacteroides*.

**Królestwo:** *Bacteria*

**Gromada:** *Bacteroidetes*

**Klasa:** *Bacteroidia*

**Rząd:** *Bacteroidales*

**Rodzina:** *Bacteroidaceae*

**Rodzaj:** *Bacteroides*

**Gatunki:** *Bacteroides acidifaciens*, *B. caccie*, *B. coprocola*, *B. coprosuis*, *B. dorei*, *B. eggerthii*, *B. fragilis*, *B. finegoldii*, *B. helcogenes*, *B. intestinalis*, *B. massiliensis*, *B. nordii*, *B. ovatus*, *B. plebius*, *B. pyogenes*, *B. salyeriae*, *B. stercoris*, *B. suis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis*, *B. vulgatus*.

W 2006 roku z rodzaju *Bacteroides* wyodrębniono też nowy rodzaj nazwany *Parabacteroides*. W obrębie tego rodzaju znalazły wówczas miejsce następujące gatunki *P. distasonis*, *P. goldsteinii* i *P. merdae* [55]. W kolejnych latach rodzaj ten został uzupełniony

\* Autor korespondencyjny: Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 2, 10-719 Olsztyn; Katedra Mikrobiologii Środowiskowej, ul. Prawocheńskiego 1, 10-720 Olsztyn; tel. 89 523 45 57; e-mail: monika.harnisz@uwm.edu.pl

o kolejne gatunki: *P. chartae*, *P. chinchillae*, *P. faecis*, *P. gordonii* i *P. Johnsonie* [56]. Gatunki te są fenotypowo bardzo zbliżone do *Bacteroides*, lecz różne, biorąc pod uwagę odległości filogenetyczne.

W obrębie rodzaju *Bacteroides* oraz *Parabacteroides* wyróżniana jest „grupa *Bacteroides fragilis*”. Grupa ta była wcześniej klasyfikowana jako podgatunek *B. fragilis* (tj. *B. f. ssp. fragilis*, *B. f. ssp. distasonis*, *B. f. ssp. ovatus*, *B. f. ssp. thetaiotaomicron* i *B. f. ssp. vulgatus*). Obecnie na podstawie badań homologii DNA bakterie należące do tej grupy zostały przeklasyfikowane do odrębnych gatunków [2]. Pomimo przegrupowania tych bakterii, grupa *B. fragilis* nie została rozwiązana. Bakterie należące do tej grupy są najczęściej izolowanymi beztlenowymi mikroorganizmami z zainfekowanych tkanek. Dotyczy to w szczególności gatunku *B. fragilis*, który stanowi od 41% do 78% izolatów tej grupy [62].

Śledzenie zmian systematyki w obrębie rodzaju *Bacteroides* jest ważne, ponieważ do przeprowadzenia prawidłowej diagnostyki mikrobiologicznej niezbędna jest znajomość aktualnej taksonomii bakterii. Wiedza ta może być pomocna w wyznaczaniu potencjału wirulencji czy oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe badanych bakterii.

### 3. Znaczenie kliniczne *Bacteroides* spp.

Bakterie beztlenowe często uczestniczą w zakażeniach różnych układów oraz narządów u człowieka. Spośród wszystkich bakterii beztlenowych, bakterie z rodzaju *Bacteroides* są patogenami najczęściej izolowanymi z próbek klinicznych [45]. Rodzaj *Bacteroides* zazwyczaj dzieli się na dwie grupy bakterii – grupę *B. fragilis* oraz grupę zawierającą pozostałe bakterie z tego rodzaju. Pierwsza grupa zawiera istotne klinicznie gatunki, często wykrywane w zakażeniach wywołanych przez bakterie beztlenowe tj. *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus*, *B. distasoni* oraz *B. vulgatus*. Druga grupa również zawiera kilka niebezpiecznych dla zdrowia gatunków np.: *B. ureolyticus* oraz *B. forsythus*. Zasadniczo wszystkie zakażenia spowodowane bakteriami *Bacteroides* spp. są endogenne, tzn. wywołują je szczepy obecne w organizmie pacjenta przed rozpoczęciem procesu patofizjologicznego, który prowadzi do zakażenia klinicznego [16]. *B. vulgatus* i *B. thetaiotaomicron* są najbardziej rozpowszechnionymi organizmami z rodzaju *Bacteroides* w okrężnicy człowieka. Jednakże od pacjentów z zakażeniami jamy brzusznej lub/i bakteriami najczęściej izolowanym gatunkiem tego rodzaju jest *B. fragilis*, który stanowi jedynie około 0,5% mikrobioty w jelitach człowieka [16]. Ta różnica pomiędzy występowaniem w jelitach a częstością izolacji z próbek klinicznych od pacjentów z zakażeniem

sugeruje, że niektóre gatunki *Bacteroides*, w tym *B. fragilis*, posiadają klinicznie istotne czynniki wirulencji.

Czynniki wirulencji dzieli się na trzy kategorie związane z: 1) udziałem w adherencji do tkanek gospodarza, 2) ochroną przed odpowiedzią immunologiczną (np. przed fagocytozą) oraz 3) niszczeniem tkanek.

Do czynników związanych z pierwszą grupą można zaliczyć wytwarzanie otoczki wielocukrowej, śluzu powierzchniowego oraz obecność fimbrii. U *B. fragilis* fimbrie i aglutyniny pełnią podobne funkcje jak adhezyny i umożliwiają bakterii przebywanie w tkankach gospodarza. Otoczka wielocukrowa *B. fragilis* jest odpowiedzialna za inicjację wytworzenia ropni i nie zawsze występuje u szczepów klinicznych *Bacteroides* [71].

Do czynników wirulencji związanych z unikaniem odpowiedzi systemu immunologicznego zalicza się występowanie otoczki, lipopolisacharydów oraz posiadanie szeregu zróżnicowanych enzymów. Lipopolisacharyd *B. fragilis* ma niezwykłą strukturę. Ma on budowę podobną do LPS bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, jednak występują różnice w budowie lipidu A. Różnica ta powoduje, że jest on od 10 do 1000 razy mniej toksyczny niż ten występujący u *E. coli* [70]. Przykładem enzymu związanego z wirulencją *Bacteroides* spp. jest neuraminidaza. Do produkcji tego enzymu są predysponowane *B. fragilis*. Neuraminidaza pozwala tym bakteriom nie tylko unikać odpowiedzi immunologicznej, ale ma swój udział także w adherencji do tkanek gospodarza oraz ich niszczeniu. Innymi enzymami związanymi z brakiem odpowiedzi systemu immunologicznego mogą być kolagenaza, fibrylizyna, hialuronidaza, chondroitynaza, heparynaza, lecytynaza, deoksyrybonukleazy, lipazy oraz fosfolipazy.

Niektóre szczepy gatunku *B. fragilis* wytwarzają enterotoksynę fragilizynę (*B. fragilis* enterotoxin – BFT). Toksyna ta jest metaloproteazą zależną od cynku. Szczepy, u których ona występuje nazywane są enterotoksycznymi *B. fragilis* (ETBF). Występują trzy izotypy BFT, które są kodowane przez geny *bft*: *bft-1*, *bft-2* oraz *bft-3*. Geny te występują w unikalnych dla tych szczepów odcinkach genomu i są nazywane wyspami zjadliwości [58]. BFT oddziałuje na białko powierzchniowe komórek eukariotycznych E-kadherynę, która odpowiada za przyleganie komórek. Fragilizyna umożliwia bakteriom hydrolizę wiązania peptydowego kadheryny, w następstwie czego zwiększa się przepuszczalność nabłonka jelitowego dla toksyn oraz innych antygenów. Działanie to może być przyczyną biegunek [73]. BFT indukuje cyklooksygenazę 2, która ulega aktywacji w czasie reakcji zapalnej i powoduje wydzielanie płynów w komórkach nabłonka jelit [30]. Ponadto fragilizyna jest czynnikiem stymulującym powstawanie nowotworów jelita grubego [67].

Schorzeniami wywołanymi przez *Bacteroides* spp. w obrębie jamy brzusznej są m.in.: ropnie wątroby,

trzustki, nerek, jajników oraz jajowodów. W układzie oddechowym bakterie te mogą powodować zakażenia zatok oraz płuc i opłucnej. Pęknięcie ropni może spowodować przedostanie się bakterii do krwi, co prowadzi do bakteriemii oraz rozległej infekcji organizmu. Obecności *Bacteroides* spp. przypisuje się również zakażenia innych narządów tj. mózgu, kości, szpiku oraz tkanek miękkich [29].

#### 4. Oporność na leki u *Bacteroides* spp.

##### 4.1. Bakterie z rodzaju *Bacteroides* jako rezerwuar determinantów oporności

Bakterie z rodzaju *Bacteroides*, izolowane z mikrobioty ludzkiej okrężnicy, mogą stanowić rezerwuar determinantów oporności (genów lekooporności). Mobilizacja i horyzontalny transfer genów (HGT) w jelitach stwarzają potencjalne zagrożenie dla zdrowia ludzi [68]. Mogą one być przekazywane znacznie bardziej zjadliwym bakteriom, występujących tylko okresowo w jelitach, np. bakteriom układu oddechowego, takim jak *Klebsiella pneumoniae* [43] czy *Acinetobacter baumannii* [9, 21, 27]. W ten sposób bakterie przechodzące przez jelita, zamiast na drodze mutacji i doboru naturalnego, uzyskują geny oporności na leki poprzez HTG [54, 59]. Ta genetyczna „elastyczność” umożliwia przekazywanie genów oporności między gatunkami bakterii w sposób nieprzewidywalny i sugeruje, że poziom wielolekooporności może nadal wzrastać [22]. U bakterii beztlenowych, występujących w jelitach człowieka, powszechnie stwierdza się oporność na tetracykliny, erytromycynę, leki  $\beta$ -laktamowe czy fluorochinolony. Związane jest to z rozpowszechnieniem najbardziej typowych markerów oporności, do których zaliczyć można geny *tet(Q)*, *ermF*, *cepA*, *cfxA* oraz *cfiA* [37, 68] oraz mniej powszechne geny *tet(X)*, *tet(X1)* i *bexA* [66]. Wexler [71] opisuje wzrost występowania u *Bacteroides* genu oporności na tetracyklinę *tet(Q)* z około 30% do ponad 80%, przy czym allele *tet(Q)* u różnych gatunków *Bacteroides* są w 96–100% identyczne na poziomie sekwencji DNA. Tenże autor stwierdza również wzrost występowania genu *erm* z poziomu  $> 2$  do 23%.

Badania, sprawdzające transfer genów między gatunkami bakterii, są retrospektywne i polegają na porównaniu sekwencji DNA determinantów oporności różnych gatunków bakterii np. występujących w ludzkim jelicie grubym. Jeśli geny znajdujące się u różnych gatunków są w  $> 95\%$  identyczne, przyjmuje się, że gen został przeniesiony poprzez horyzontalny transfer z jednego gatunku do drugiego. Porównanie sekwencji genów *erm* izolowanych z bakterii, które albo nie bytują na stałe w ludzkiej okrężnicy (*Streptococcus pneumoniae*) albo

występują tam w niewielkich ilościach (*Clostridium perfringens* i *Enterococcus faecalis*), z genami wykrytymi u *Bacteroides* spp. wskazują, że nastąpił transfer genów (bezpośredni lub pośredni) między tymi gatunkami [59]. Elementy zawierające geny oporności są bardzo stabilne, nawet w przypadku braku występowania presji antybiotykami [57]. Jednym z mechanizmów utrzymania ich stabilności może być organizacja genów w integrony, gdzie determinanty oporności na antybiotyki występują w tym samym integronie co enzymy, które zapewniają korzyści dla bakterii (np. zdolność do skutecznej kolonizacji). Zatem badania potencjału mobilizacji, ekspresji genów oporności na środki przeciwbakteryjne oraz ich transferu między bakteriami występującymi w jelitach, w tym *Bacteroides* spp., są konieczne do oceny ich znaczenia jako rezerwuaru genów z ekologicznego i klinicznego punktu widzenia.

##### 4.2. Oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe

W ciągu ostatnich dziesięcioleci obserwuje się wzrost częstości występowania oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe oraz genów oporności na antybiotyki. W roku 2001 w Indiach wyizolowano pierwszy oporny na metronidazol szczep *Bacteroides fragilis* [8], 10 lat później w Europie izolowano szczepy tych bakterii posiadające gen *cfiA*, który jest odpowiedzialny za oporność na kabapenemy [24]. W roku 2016 Sóki i współpracownicy opisali szczepy *Bacteroides fragilis* odporne na 7 antybiotyków [63]. Narastanie zjawiska niewrażliwości na leki prawdopodobnie związane jest z zwiększoną presją tych związków [4, 41]. Kliniczne szczepy *Bacteroides* spp. wykazują wzrastającą oporność na wiele antybiotyków, w tym na cefoksytynę, klindamycynę, metronidazol, karbapenemy oraz fluorochinolony (np. gatifloksacynę, lewofloksacynę i moksyflokscynę). Tylko najnowszej generacji fluorochinolony np. sitafloksacyna, klinafloksacyna i garenoksacyna, wykazują zazwyczaj wyższą aktywność względem *Bacteroides* spp. [60].

**Antybiotyki  $\beta$ -laktamowe.** Antybiotyki  $\beta$ -laktamowe stanowią największą i najbardziej zróżnicowaną grupę leków przeciwdrobnoustrojowych, stosowanych w leczeniu prawie wszystkich rodzajów zakażeń [42]. Leki  $\beta$ -laktamowe uznawane są za bardzo aktywne środki przeciwko *B. fragilis* [62]. Mechanizm działania środków  $\beta$ -laktamowych polega na hamowaniu działania enzymów biosyntezy ściany komórkowej tych bakterii (peptydoglikanu), tzw. białek PBP (Penicillin-Binding Proteins). Mechanizmy oporności bakterii na te antybiotyki są warunkowane przez cztery strategie: 1) syntezę PBP o niskim powinowactwie do środków  $\beta$ -laktamowych; 2) zmniejszanie przepuszczalności błon komórkowych bakterii; 3) aktywne wypompowywanie leków z komórki bakteryjnej; 4) produkcję

$\beta$ -laktamaz tj. enzymów hydrolizujących cząsteczki  $\beta$ -laktamów [42]. U *Bacteroides* spp. występują wszystkie te strategie oporności.

Najbardziej rozpowszechnionym mechanizmem oporności na środki  $\beta$ -laktamowe jest produkcja enzymu, należącego do  $\beta$ -laktamaz, cefalosporynazy klasy 2e. Kodowany jest on przez umiejscowiony chromosomalnie gen *cepA* [13, 25]. Enzym ten, hydrolizujący cefalosporyny (z wyjątkiem cefoksytyny) oraz penicyliny, występuje w niemal wszystkich gatunków *Bacteroides* spp. [53]. Jego wytwarzanie jest hamowane przez najpowszechniej stosowane inhibitory  $\beta$ -laktamaz tj. sulbaktam, kwas klawulanowy i tazobaktam, a środki zawierające te inhibitory są aktywne wobec szczepów wytwarzających  $\beta$ -laktamazę. Oporność na cefoksytynę warunkowana jest przez gen *cfxA* [13]. Jego ekspresja może być zależna od obecności struktur IS [64]. Gen *cfxA* u *B. vulgatus* jest odległym homologiem genu *cepA* *B. fragilis* [53].

Struktura antybiotyków  $\beta$ -laktamowych ułatwia ich wiązanie z miejscem aktywnym PBP. Wykazanie korelacji między aktywnością  $\beta$ -laktamu i powinowactwem PBP u *B. fragilis* jest trudne. Do niedawna większość badań prowadzono poprzez znakowanie komórek lub ekstraktów komórkowych znacznikami przeciwbakteryjnymi i analizę wyników za pomocą elektroforezy na żelu poliakrylamidowym w obecności siarczanu dodecylu sodu (SDS) [11]. Zsekwencjonowanie całego genomu *B. fragilis* pozwoliło na pełniejszą analizę struktur tej bakterii, dzięki czemu zidentyfikowano siedem domniemanych genów kodujących PBP. Sekwencje genów dla homologów najbliższych do PBP *E. coli* w genomie *B. fragilis* (*pbp1abBfr*, *pbp1cBfr*, *pbpABfr*, *pbpBBfr*, *pbp4Bfr* i *pbp7Bfr*), opracowano odpowiednio na podstawie ortologów genów *ponBEco*, *pbpCEco*, *pbpAEco*, *pbpBEco*, *dacBEc* oraz *pbpGEco* występujących u *E. coli* [49].

Pomimo powyższych trudności Georgopapadakou i wsp. [19] potwierdzili związek pomiędzy zmniejszonym powinowactwem związków  $\beta$ -laktamowych i PBP u *Bacteroides* a ich opornością na działanie tych leków. U opornych szczepów *B. fragilis* zaobserwowano zmniejszone powinowactwo PBP (80 kDa) do imipenemu, piperacyliny, cefoperazonu, cefotaksymu i ceftazydymu. Zmiany w PBP, głównie w PBP1 lub/i PBP2, są powiązane z innymi niż  $\beta$ -laktamazowe mechanizmy oporności na cefoksytynę u cefoksytynoopornych mutantów gatunków *B. fragilis* [48]. Fang i wsp. [17] stwierdzili, że powinowactwo kompleksu PBP1 (86 kDa) pochodzącego z *B. thetaiotaomicron* do cefoksytyny i piperacyliny jest > 100-krotnie i ~ 70-krotnie mniejsze, w porównaniu z ich działaniem na macierzysty szczep wrażliwy. Ponadto, autorzy wykazują, że ortolog genu *E. coli* PBP3 (*pbpBBfr*, kodującego białko PBP2Bfr) jest zaangażowany w wiązanie imipenemu [1, 49].

**Karbapenemy.** Karbapenemy należą do związków  $\beta$ -laktamowych, ale ze względu na odmienną strukturę, często są traktowane jako odrębna grupa antybiotyków. Oporność bakterii na te leki jest rzadko spotykana. Pomimo, że notuje się wzrost oporności na te środki, to karbapenemy uważa się za jedne z najbardziej aktywnych leków wobec *B. fragilis* [62]. Oporność na te środki przeciwdrobnoustrojowe warunkuje ekspresja genów *cfiA* oraz *ccrA* kodujących m.in. syntezę enzymu metalo- $\beta$ -laktamazy klasy B [13, 35]. Geny te nadają bakteriom oporność zarówno na karbapenemy,  $\beta$ -laktamy oraz  $\beta$ -laktamy ze środkami zawierającymi inhibitory  $\beta$ -laktamaz. Niektóre szczepy *Bacteroides* spp. zawierają „milczące” geny karbapenemaz, a ich poziom ekspresji jest zależny od promotora zawierającego sekwencje insercyjne (IS) powyżej sekwencji genu *cfiA/ccrA* [64, 71]. Innym mechanizmem oporności na karbapenemy mogłyby być zmiany w budowie białek wiążących penicylinę (PBP) i białek porynowych, umożliwiających przenikanie karbapenemom do komórki [1]. Badania szczepów bakterii wielolekoopornych, izolowanych z próbek klinicznych, prowadzone przez Pumbwe i in. [50] wykazały, że zwiększona czynność pomp do aktywnego usuwania antybiotyków z komórki bakterii, może być przyczyną oporności na karbapenemy.

**Aminoglikozydy.** Aminoglikozydy są inhibitorami syntezy białka, które wiążą się z podjednostką 30S rybosomu bakteryjnego. Wychwyt tego leku wymaga łańcucha tleno- lub azotano-zależnego transportu elektronów, którego brakuje u bakterii z rodzaju *Bacteroides* [7]. Pomimo tego, zauważa się u tych bakterii podwyższony poziom oporności na te związki [33].

**Makrolidy, linkozamidy i chloramfenikol.** Antybiotyki makrolidowe (np. erytromycyna) hamują syntezę białek przez wiązanie się z cząsteczką 23S rRNA (w podjednostce 50S) rybosomu bakteryjnego, blokując wyjście rosnącego łańcucha peptydowego. Linkozamidy (np. klindamycyna) również wiążą się z podjednostką 50S rybosomu [71]. Oporność na klindamycynę, powszechnie stosowanego w ciągu ostatnich lat leku przeciw bakteriom beztlenowym, wykazuje ciągle tendencję wzrostową [62]. Niewrażliwość na te antybiotyki kodowana jest przez różne geny, do których należą głównie geny *ermB*, *ermF* i *ermG*. Gen *linAn2* nadaje oporność na linkomycynę i erytromycynę; natomiast geny *mrsSA* oraz *mefA* pośredniczą w nabywaniu oporności na makrolidy i linkozamidy [13]. Geny te są zbliżone do genów, występujących u mikroorganizmów Gram-dodatnich, wywołujących oporność na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B poprzez metylację rybosomu. Ekspresja genów należących do grupy *erm* może być zwiększona dzięki aktywności sekwencji insercyjnych [64].

Chloramfenikol wiąże się z rybosomalną transferazą peptydową zapobiegając w ten sposób biosyntezie

białek. Enzym acetylotransferaza chloramfenikolu przenosi grupy acetylowe z acetylo-koenzymu A do pierwszorzędowych grup hydroksylowych chloramfenikolu w pozycji C-6, zapobiegając wiązaniu się zmodyfikowanego antybiotyku z rybosomem i jego oddziaływaniem na komórkę bakterii [5]. Badania poziomu oporności bakterii z rodzaju *Bacteroides* na chloramfenikol prowadzone w szpitalach w Stanach Zjednoczonych, nie wykazały występowania *Bacteroides* spp. opornych na ten związek przeciwbakteryjny [61].

**Tetracykliny.** Tetracykliny hamują syntezę białek bakteryjnych poprzez blokowanie przyłączania kompleksów tRNA-aminokwas do rybosomów. Środek ten był kiedyś stosowany jako antybiotyk pierwszego wyboru w leczeniu zakażeń wywołanych przez bakterie beztlenowe, a wszystkie izolowane szczepy *Bacteroides* spp. w 1950 roku były na niego wrażliwe [20]. Antybiotyk ten pozostawał skutecznym środkiem przeciw bakteriom beztlenowym aż do roku 1970 [31]. Obecnie, prawie wszystkie kliniczne izolaty *Bacteroides* spp. (>80–90%) są tetracyklinooporne [3, 66, 71]. Jednym z mechanizmów tetracyklinooporności, opisywanym u *B. fragilis*, jest aktywne usuwanie leku z komórki bakterii za pomocą pomp tzw. effluks [52]. Odmianą strategią oporności na tetracykliny warunkuje gen *tet(Q)*. Koduje on cytoplazmatyczne białko, które wchodzi w interakcję z rybosomem bakterii, przez co zablokowane jest działanie leku na bakterie [52]. Mechanizm ten jest najbardziej rozpowszechnionym u *Bacteroides* spp. typem oporności na te antybiotyki [34]. Innymi genami warunkującymi oporność na tetracykliny, wykrywanych u ścisłych beztlenowców np. *Bacteroides* spp., są geny *tet(X)* oraz dwa jego ortologi *tet(X1)* oraz *tet(X2)*. Geny te u *Bacteroides* spp. są często związane z plazmidami i transpozonomi. Warunkują one enzymatyczną inaktywację tetracykliny [52]. Gen *tet(X)* umiejscowiony jest na transpozonomach Tn4351 oraz Tn4400 i koduje enzym oksydoreduktazę zależną od FAD i NADPH, która inaktywuje tetracykliny w obecności tlenu [74]. Geny *tet(X1)* oraz *tet(X2)* zidentyfikowano na transpozonie koniugacyjnym CTnDOT wraz z genem *ermF* [72].

**Nitroimidazole.** Metronidazol jest powszechnie stosowanym środkiem w leczeniu zakażeń beztlenowych. Oporność *Bacteroides* spp. na metronidazol jest rzadko wykrywana, przy czym nie można wykluczyć, że dzieje się tak ze względu na przesiewowy sposób wykrywania beztlenowców. Prawdziwa częstotliwość występowania oporności na metronidazol u *B. fragilis* może być znacznie wyższa niż przyjmowana [69].

Oporność na te środki jest zazwyczaj spowodowana zmianami w genach *nim* i genach z nimi związanych (na przykład w strukturach IS) [13, 64, 65]. Gen *nim* niekiedy bywa „milczący”, ale może zostać aktywowany przez elementy IS [23]. Cztery geny *nim* (*nimA-D*) mogą

wystąpić w każdym gatunku *Bacteroides*. Każdy z tych genów jest związany z odrębnym ruchomym mobilnym elementem genetycznym, jak również każdy z nich ma specyficzny aktywujący element IS [23, 36]. Obecność genu *nim* nie jest jednoznaczna z opornością bakterii na metronidazol na poziomie leczenia klinicznego. W niektórych przypadkach, gen ten może ulegać ekspresji na niskim poziomie lub pozostać nieaktywny [18].

**Chinolony.** Leki z tej grupy działają poprzez hamowanie dwóch specyficznych enzymów – gyrazy DNA i topoiizomerazy IV, które uczestniczą w replikacji DNA bakterii. Mutacje tych genów są najczęstszą przyczyną oporności na chinolony. Mutacje genu *gyrA*, powodujące oporność na fluorochinolony u *B. fragilis*, zostały określone w pozycjach hot-spot 82 i 86 (równoważne z pozycjami 83 i 87 u *E. coli*) [44, 51]. Substytucje w genach *gyrB*, *parC* i *parE* są dotychczas rzadkością u *B. fragilis* i nie są dobrze poznane. Bakterie te mogą także stać się odporne na chinolony poprzez zwiększenie ich eksportu na zewnątrz komórki. Miyamae i in. [38] znaleźli mechanizm czynnego usuwania norfloksacyny z komórki u *B. fragilis* i sugerują, że mechanizm ten jest katalizowany przez pompę podobną do NorA/Bmr. Ponadto, u *B. thetaiotaomicron* stwierdzono występowanie MATE – systemu aktywnego usuwania wielu leków (m.in. fluorochinolonów i aminoglikozydów) z komórki bakterii np. białko BexA, które jest odpowiedzialne za eksport fluorochinolonów i bromku etyldyny z komórki [13, 39, 47]. U szczepów pochodzenia klinicznego i laboratoryjnego wykazano również oporność na chinolony związaną ze wzrostem aktywności pomp z rodziny RND [50]. Rodzina transporterów RND to pompy wielolekowe, szeroko rozpowszechnione u bakterii Gram-ujemnych [47]. Między innymi Snyderman i in. [62] wykazali wzrost oporności bakterii z rodzaju *Bacteroides* na moksyflokscynę z grupy fluorochinolonów.

Zwiększające się z roku na rok wykorzystywanie antybiotyków w leczeniu ludzi i zwierząt powoduje, że bakterie coraz szybciej zmniejszają swoją wrażliwość na leki. Dlatego konieczne jest dalsze zgłębianie wiedzy na temat lekooporności u bakterii, szczególnie u tych wykazujących cechy zjadliwości jak *Bacteroides* spp.

#### 4. Metody określania lekowrażliwości

Określenie wrażliwości bakterii beztlenowych na antybiotyki jest jednym z elementów rozpoznania i leczenia chorób przez niewywołanych. Istnieje wiele metod badania antybiotykooporności. Do najczęściej stosowanych należą metody oparte na hodowli bakterii *in vitro*. Do tych badań zalicza się metodę seryjnych rozcieńczeń antybiotyku w podłożu stałym lub płynnym oraz testy oparte na dyfuzji antybiotyków

do podłoża – antybiogram oraz Epsilometer test. Istnieje też druga grupa coraz powszechniej stosowanych metod, niezależnych od hodowli. Zalicza się do niej metody molekularne oparte m.in. na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), ilościowej reakcji PCR (qPCR), a także metagenomikę. W niniejszej pracy zostały opisane wybrane metody, najczęściej stosowane do oznaczania antybiotykooporności bakterii.

Metody oparte na hodowli bakterii w porównaniu z badaniami molekularnymi są stosunkowo niedrogi i proste w wykonaniu. Jednakże tylko znikomy procent bakterii można namnażać w warunkach laboratoryjnych.

Opisane poniżej metody hodowlane służą do określenia minimalnych stężeń inhibitujących (MIC) – czyli najniższego stężenia antybiotyku, w którym bakterie przestają rosnąć. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) co roku przedstawia wykaz leków stosowanych przeciwko poszczególnym grupom bakterii wraz z wartościami MIC i ich interpretacją. EUCAST do zwalczania beztlenowych bakterii Gram-ujemnych proponuje stosowanie następujących leków: penicyliny benzylowej, ampicyliny, amoksycyliny, piperacyliny, tikarcyliny, doripenemu, ertapenemu, imipenemu, meropenemu, klindamycyny, chloramfenikolu oraz metronidazolu [15]. Rozkłady wartości MIC tych antybiotyków dla bakterii z grupy *Bacteroides fragilis* zostały przedstawione w tabeli I [15].

**Metoda rozcieńczeń w agarze** polega na wprowadzeniu różnych stężeń środka przeciwbakteryjnego do pożywki z agarem odżywczym (Brucella agar z krwią) z dodatkiem heminy oraz witaminy K, która następnie zaszczipiana jest normalizowaną liczbą komórek badanych drobnoustrojów. Płytki odczytywane są po 48 godzinach inkubacji poprzez porównanie wizualnie wzrostu bakterii z różnych szczepów i serii rozcieńczeń oraz określenie MIC [6].

**Metoda rozcieńczeń w pożywce płynnej** polega na dodaniu do kolejnych dołków, zawierających płynną pożywkę Brucella bulion z krwią, seryjnych 2-krotnych rozcieńczeń leku, a następnie zaszczipienie ich przygotowanym roztworem komórek bakteryjnych. Do tej metody wykorzystuje się specjalne płytki z tworzywa sztucznego lub tace. Wartości MIC są odczytywane po 48 godzinach inkubacji. Zaletą tej metody jest możliwość badania w jednym czasie wielu antybiotyków. Jednakże technika ta jest ograniczona przez słaby wzrost bakterii beztlenowych wrażliwych na tlen, i obecnie zatwierdzona przez Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) do badania tylko bakterii z grupy *B. fragilis* [10].

Do zalet tych dwóch metod należy stosunkowo niski koszt badania, a także duża dokładność i powtarzalność wyników. Do wad natomiast należy zaliczyć dużą

praco- i czasochłonność, spowodowaną koniecznością wykonania rozcieńczeń oraz ręcznego zaszczipienia bakteriami każdej płytki czy dołka z pożywką [10, 46].

**Epsilometer test** (E-test) jest to metoda gradientowo-dyfuzyjna, umożliwiająca określenie MIC oraz wartości granicznej. Zasada testu opiera się na dyfuzji ze specjalnego plastikowego paska, powlekanego środkiem przeciwdrobnoustrojowym w wrastającym gradientie stężeń, do podłoża agarowego uprzednio zaszczipionego badanym szczepem. Dla bakterii beztlenowych najczęściej stosowanym podłożem w tej technice jest Brucella agar z krwią z dodatkiem heminy i witaminy K. Wyniki odczytuje się po inkubacji poprzez sprawdzenie symetrycznej elipsoidalnej strefy hamowania wzrostu wzdłuż paska. Wartość MIC określa się sprawdzając na skali paska, miejsce, w którym taśma przecina się ze strefą zahamowanego wzrostu [14]. Zaletą tej metody jest możliwość dokładnego ustalenia stopnia oporności mikroorganizmu na dany lek. Test ten jest jednak stosunkowo drogi. E-test, tak jak antybiogram, nie został jeszcze uznany za standardową metodę badania lekowrażliwości bakterii beztlenowych, pomimo że wyniki wielu badań są porównywalne z wynikami jakie uzyskuje się stosując metodę rozcieńczeń w agarze [6, 10, 40].

**Metody molekularne** wykazują wysoką specyficzność, a także umożliwiają badanie wszystkich bakterii obecnych w próbkach. Jednakże są one nadal dużo droższe od metod opartych na hodowli oraz nie są standaryzowane. Pomimo tego, wykorzystanie metod molekularnych do badania oporności bakterii na antybiotyki staje się obecnie coraz bardziej powszechne.

Metody molekularne opierają się na wykryciu genów warunkujących oporność bakterii na antybiotyki, np. genów *cepA*, *cfxA*, *cifA* czy też *tet(X)* kodujących oporność odpowiednio na penicyliny, cefalomycynę, karbapenemy i tetracykliny. W szczególnych przypadkach, tak jak to ma częściowo miejsce u *Bacteroides* sp., geny te mogą być uśpione, a ich aktywność jest zależna od występowania sekwencji insercyjnych [66]. W celu wykrycia genów oporności na antybiotyki stosuje się reakcje PCR i qPCR. Wykorzystują one działanie enzymu polimerazy DNA do amplifikacji (wielokrotnego kopiowania) sekwencji genów oporności. Aby reakcja przebiegła prawidłowo, konieczne jest użycie specyficznych starterów przyłączających się do analizowanego DNA w miejscu przed i za sekwencją genu. Na przykład w celu wykrycia genu *cifA* wykorzystuje się startery GBI-1 and GBI-2 [28]. Aby badać profil lekooporności konkretnego rodzaju czy gatunku bakterii konieczne jest wyizolowanie DNA z badanego materiału, a następnie przeprowadzenie reakcji PCR czy qPCR. Reakcja PCR pozwala tylko określić jakościowo występowanie analizowanych genów w badanym materiale DNA. Natomiast qPCR



Tabela I  
 Procentowy rozkład MIC antybiotyków stosowanych w leczeniu chorób wywołanych przez bakterie z grupy *Bacteroides fragilis*  
 na podstawie [15]

związek \ dawka w mg/l	0,002	0,004	0,008	0,016	0,032	0,064	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	n
Amoksycyлина	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,7	3,4	4,0	2,8	1,8	1,1	6,3	22,4	24,2	6,5	26,2	0,0	0,0	1568
Ampicylina	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	2,2	2,9	7,1	25,8	33,9	5,9	4,0	9,4	7,5	1289
Penicylina benzylowa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,2	0,2	1,9	1,7	8,6	15,4	28,4	13,4	17,8	3,6	5,8	3,2	591
Klindamycyna	0,0	0,0	0,1	0,2	2,2	10,2	7,5	10,0	16,4	12,5	9,4	5,9	2,1	0,3	0,5	1,0	0,6	4,7	16,4	1777
Dorypenem	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	1,4	10,9	57,7	17,1	4,9	2,9	1,9	1,6	1,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	515
Ertapenem	0,0	0,0	0,0	0,0	11,6	0,0	0,7	20,4	24,5	12,9	12,2	11,6	4,8	0,0	0,0	0,0	0,0	1,4	0,0	147
Imipenem	0,0	0,1	0,7	3,0	13,6	18,1	24,2	17,2	12,7	6,2	2,2	0,5	0,3	0,1	0,2	0,3	0,3	0,0	0,0	2082
Meropenem	0,0	0,0	0,0	9,2	2,6	8,8	19,0	32,0	13,7	6,0	4,3	1,9	0,4	0,6	0,9	0,0	0,6	0,0	0,0	532
Metronidazol	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	1,1	3,3	7,7	19,4	44,7	16,8	3,8	1,1	0,6	0,1	0,4	0,1	0,0	0,0	3160
Piperacylina	0,0	0,0	0,0	0,3	0,1	0,9	1,7	2,9	3,5	6,4	13,4	10,6	11,2	15,8	10,7	7,8	5,6	7,8	1,3	1063
Piperacylina-tazobaktam	0,0	0,0	0,1	0,7	0,4	4,3	8,8	16,7	7,9	9,9	13,1	10,6	8,5	4,7	5,0	8,0	0,5	0,6	0,2	3498
Tikarcylina	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,6	0,3	0,6	0,9	1,5	5,0	24,2	24,5	13,3	10,9	6,0	11,5	1275
Tikarcylina – kwas klawulanowy	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0	22,4	17,6	15,5	9,5	8,6	8,6	4,8	4,6	1,0	0,6	1,1	0,9	0,9	1226

n – ilość badanych szczepów z grupy *Bacteroides fragilis*

ponadto umożliwia ilościowe określenie obecności genów w materiale biologicznym czy też badanie ekspresji genów lekooporności.

Inną, bardziej postępową, metodą określania antybiotykkooporności bakterii, jest **metagenomika**. Polega ona na bezpośrednim klonowaniu materiału genetycznego izolowanego z próbek badawczych, a następnie jego sekwencjonowaniu i funkcjonalnej analizie. Metoda ta umożliwia np. stosunkowo szybkie określenie występowania jednocześnie wszystkich genów oporności na leki, a także wielu innych genów obecnych w analizowanej próbce. Technika ta, do prawidłowego działania, wymaga stworzenia rzetelnej bazy danych zawierającej informacje o genomach gatunków referencyjnych np. GenBank, PubMed czy Entrez. Metoda ta została wykorzystana przez Hu i in. [26] do wykrycia genów lekooporności ludzkiej mikrobioty jelitowej. Wykorzystując narzędzie bioinformatyczne BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) opisano 4,1 mln genów bakterii jelitowych, z czego 1093 genów odpowiedzialnych było za oporność na antybiotyki.

Metoda ta, ze względu na spadek kosztów sekwencjonowania DNA i rozszerzającą się bazę danych, będzie sukcesywnie wypierać tradycyjne metody badawcze oparte na hodowli bakterii w warunkach *in vitro* [12].

## 7. Podsumowanie

Beztlenowe bakterie z rodzaju *Bacteroides* są najliczniejszą grupą bakterii w przewodzie pokarmowym ssaków. Stanowią ważny element w prawidłowym funkcjonowaniu układu pokarmowego. Niektóre gatunki bakterii z rodzaju *Bacteroides* wykazują silne właściwości chorobotwórcze, które są związane z obecnością otoczek polisacharydowej, lipopolisacharydów, możliwością wytwarzania różnorodnych enzymów oraz enterotoksyny fragilizyny. W ostatnich latach zauważa się wzrost oporności *Bacteroides* spp. na wiele grup antybiotyków i coraz częściej stwierdza się konieczność monitoringu zmian profilu lekooporności tych bakterii. Niniejsza praca stanowi podsumowanie aktualnej wiedzy na temat bakterii z rodzaju *Bacteroides*.

## Piśmiennictwo

1. Ayala J., Quesada A., Vadillo S., Criado J. Piriz S.: Penicillin-binding proteins of *Bacteroides fragilis* and their role in the resistance to imipenem of clinical isolates. *J. Med. Microbiol.* **54**, 1055–1064 (2005)
2. Baron E.J., Allen S.D.: Should clinical laboratories adopt new taxonomic changes? If so, when? *Clin. Infect. Dis.* **16**, 449–450 (1993)
3. Bartha N.A., Soki J., Edit U., Nagy E.: Investigation of the prevalence of *tetQ*, *tetX* and *tetX1* genes in *Bacteroides* strains with elevated tigecycline minimum inhibitory concentrations. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **38**, 522–525 (2011)
4. Boyanova L., Kolarov R., Mitov I.: Recent evolution of antibiotic resistance in the anaerobes as compared to previous decades. *Anaerobe*, **31**, 4–10 (2015)
5. Britz M.L., Wilkinson R.G.: Chloramphenicol acetyl-transferase of *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **14**, 105–111 (1978)
6. Brook I., Wexler H.M., Goldstein E.J.: Antianaerobic antimicrobials: spectrum and susceptibility testing. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**, 526–546 (2013)
7. Bryan L.E., Kowand S.K., Van Den Elzen H.M.: Mechanism of aminoglycoside antibiotic resistance in anaerobic bacteria: *Clostridium perfringens* and *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **15**, 7–13 (1979)
8. Chaudhry R., Mathur P., Dhawan B., Kumar L.: Emergence of metronidazole-resistant *Bacteroides fragilis*, India. *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 485–486 (2001)
9. Cisneros J. M., Rodriguez-Bano J., Fernandez-Cuenca F., Ribera A., Vila J., Pascual A., Martinez-Martinez L., Bou G., Pachon J.: Risk-factors for the acquisition of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Spain: a nationwide study. *Clin. Microbiol. Infect.* **11**, 874–879 (2005)
10. Wayne P.A.: Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved standard. CLSI publication number M11-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007
11. Edwards R.: Resistance to beta-lactam antibiotics in *Bacteroides* spp. *J. Med. Microbiol.* **46**, 979–986 (1997)
12. Eisen J.A.: Environmental shotgun sequencing: its potential and challenges for studying the hidden world of microbes. *PLoS Bio.* **5**, 82 (2007)
13. Eitel Z., Soki J., Urban E., Nagy E.: The prevalence of antibiotic resistance genes in *Bacteroides fragilis* group strains isolated in different European countries. *Anaerobe*, **21**, 43–49 (2013)
14. Engberg J., Neimann J., Nielsen E.M., Aerestrup F.M., Fussing V.: Quinolone-resistant *Campylobacter* infections: risk factors and clinical consequences. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 1056–1063 (2004)
15. EUCAST Website, <http://www.eucast.org> (21 czerwca 2016 roku)
16. Falagas M.E., Siakavellas E.: *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas* species: a review of antibiotic resistance and therapeutic options. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **15**, 1–9 (2000)
17. Fang H., Edlund C., Nord C.E., Hedberg M.: Selection of cefoxitin-resistant *Bacteroides thetaiotaomicron* mutants and mechanisms involved in beta-lactam resistance. *Clin. Infect. Dis.* **35**, 47–53 (2002)
18. Gal M., Brazier J.S.: Metronidazole resistance in *Bacteroides* spp. carrying *nim* genes and the selection of slow-growing metronidazole resistant mutants. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**, 109–116 (2004)
19. Georgopapadakou N.H., Smith S.A., Sykes R.B.: Penicillin binding proteins in *Bacteroides fragilis*. *J. Antibiot.* **36**, 907–910 (1983)
20. Gillespie W.A., Guy J.: *Bacteroides* in intra-abdominal sepsis. *Lancet*, **270**, 1039–1041 (1956)
21. Goh B.K., Alkouder G., Lama T.K., Tan C.E.: Multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* intra-abdominal abscess. *Surg. Infect.* **6**, 345–347 (2005)
22. Gootz T.D. The forgotten Gram-negative bacilli: what genetic determinants are telling us about the spread of antibiotic resistance. *Biochem. Pharmacol.* **71**, 1073–1084 (2006)
23. Haggoud A., Reyssat G., Azeddoug H., Sebald M.: Nucleotide sequence analysis of two 5-nitroimidazole resistance determinants from *Bacteroides* strains and of a new insertion sequence upstream of the two genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1047–1051 (1994)

24. Hartmeyer G.N., Sóki J., Nagy E., Justesen U.S.: Multidrug-resistant *Bacteroides fragilis* group on the rise in Europe? *J. Med. Microbiol.* **61**, 1784–1788 (2012)
25. Hecht D.W.: Anaerobes: antibiotic resistance, clinical significance, and the role of susceptibility testing. *Anaerobe*, **12**, 115–121 (2006)
26. Hu Y., Meng, Z. i wsp.: Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota. *Nature Com.* **4** (2013)
27. Jain R., Danziger L.H.: Multidrug-resistant *Acinetobacter* infections: an emerging challenge to clinicians. *Ann. Pharmacother.* **38**, 1449–1459 (2004)
28. Kato N., Yamazoe K., Han C.-G., Ohtsubo E.: New insertion sequence elements in the upstream region of *cfiA* in imipenem-resistant *Bacteroides fragilis* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 979–985 (2003)
29. Kierzkowska M., Majewska A., Sawicka-Grzelak A., Młynarczyk G.: Pałeczki Gram-ujemne beztlenowo rosnące – diagnostyka i znaczenie kliniczne. *Post. Mikrobiol.* **55**, 91–98 (2016)
30. Kim J.M., Lee J.Y., Yoon Y.M., Oh Y.K., Kang J.S., Kim Y.J., Kim K.H.: *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces cyclooxygenase-2 and fluid secretion in intestinal epithelial cells through NF-kappa B activation. *Eur. J. Immunol.* **36**, 2446–2456 (2006)
31. Kislak J.W.: The susceptibility of *Bacteroides fragilis* to 24 antibiotics. *J. Infect. Dis.* **125**, 295–298 (1972)
32. Krieg NR, Ludwig W, Euzeby JP, Whitman WB. Phylum XIV. *Bacteroidetes* phyl. nov. (w) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, red. W. Whitman, Springer, New York, 2011, s. 25–41
33. Lacombe-Anttoneli A., Piriz S., Vadillo S.: In vitro antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria isolated from caprine footrot. *Acta Vet. Hung.* **55**, 11–20 (2007)
34. Leng Z., Riley D.E., Berger R.E., Krieger J.N., Roberts M.C.: Distribution and mobility of the tetracycline resistance determinant *tet Q*. *J. Antimicrob. Chemother.* **40**, 551–559 (1997)
35. Livermore D.M., Woodford N.: Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 489–495 (2000)
36. Lofmark S., Fang H., Hedberg M., Edlund C.: Inducible metronidazole resistance and *nim* genes in clinical *Bacteroides fragilis* group isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 1253–1256 (2005)
37. Lorenzo M., Garcia N., Alfonso Ayala J., Vadillo S., Piriz S., Quesada A.: Antimicrobial resistance determinants among anaerobic bacteria isolated from footrot. *Vet. Microbiology*, **157**, 112–118 (2012)
38. Miyamae S., Nikaido H., Tanaka Y., Yoshimura F.: Active Efflux of norfloxacin by *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 2119–2121 (1998)
39. Miyamae S., Ueda O., Yoshimura F., Hwang J., Tanaka Y., Nikaido H.: A MATE family multidrug efflux transporter pumps out fluoroquinolones in *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 3341–3346 (2001)
40. Nagy E., Justesen U.S., Eitel Z., Urbán E.: Development of EUCAST disk diffusion method for susceptibility testing of the *Bacteroides fragilis* group isolates. *Anaerobe*, **31**, 65–71 (2015)
41. Nagy E., Urban E., Nord C.E.: Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 371–379 (2011)
42. Nikonow E., Baraniak A., Gniadkowski M.: Oporność bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe wynikająca z wytwarzania  $\beta$ -laktamaz. *Post. Mikrobiol.* **52**, 261–271 (2013)
43. Ogawa W., Li D.W., Yu P., Begum A., Mizushima T., Kuroda T., Tsuchiya T.: Multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae* MGH78578 and cloning of genes responsible for the resistance. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 1505–1508 (2005)
44. Oh H., El Amin N., Davies T., Appelbaum P.C., Edlund C.: *gyrA* mutations associated with quinolone resistance in *Bacteroides fragilis* group strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1977–1981 (2001)
45. Papaparaskevas J., Katsandri A., Pantazatou A., Stefanou I., Avlami A., Legakis N., Tsakris A.: Epidemiological characteristics of infections caused by *Bacteroides*, *Prevotella* and *Fusobacterium* species: A prospective observational study. *Anaerobe*, **17**, 113–117 (2011)
46. Parija S.C.: Textbook of microbiology and immunology. Elsevier Health Sciences, New Delhi, 2014
47. Piddock L.J.V. Multidrug-resistance efflux pumps – not just for resistance. *Nature Rev. Microbiol.* **4**, 629–636 (2006)
48. Piddock L.J.V., Wise R.: Cefoxitin resistance in *Bacteroides* species: evidence indicating two mechanisms causing decreased susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* **19**, 161–170 (1987)
49. Piriz S., Vadillo S., Quesada A., Criado J., Cerrato R., Ayala J.: Relationship between penicillin-binding protein patterns and beta-lactamases in clinical isolates of *Bacteroides fragilis* with different susceptibility to beta-lactam antibiotics. *J. Med. Microbiol.* **53**, 213–221 (2004)
50. Pumbwe L., Wareham D.W., Aduse-Opoku J., Brazier J.S., Wexler H.M.: Genetic analysis of mechanisms of multidrug resistance in a clinical isolate of *Bacteroides fragilis*. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 183–189 (2007)
51. Ricci V., Peterson M.L., Rotschafer J.C., Wexler H., Piddock L.J.: Role of topoisomerase mutations and efflux in fluoroquinolone resistance of *Bacteroides fragilis* clinical isolates and laboratory mutants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1344–1346 (2004)
52. Roberts M.C.: Update on acquired tetracycline resistant genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **245**, 195–203 (2005)
53. Rogers M.B., Parker A.C., Smith C.J.: Cloning and characterization of the endogenous cephalosporinase gene, *cepA*, from *Bacteroides fragilis* reveals a new subgroup of Ambler class A beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 2391–2400 (1993)
54. Sachs J.: Are antibiotics killing us? *Discover*, **26**, 36 (2005)
55. Sakamoto M., Benno Y.: Reclassification of *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides goldsteini* and *Bacteroides merdae* as *Parabacteroides distasonis* gen. nov., comb. nov., *Parabacteroides goldsteini* comb. nov. and *Parabacteroides merdae* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 1599–1605 (2006)
56. Sakamoto M., Tanaka Y., Benno Y., Ohkuma M.: *Parabacteroides faecis* sp. nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**, 1342–1346 (2015)
57. Salyers A.A., Amabile-Cuevas C.F.: Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 2321–2325 (1997)
58. Sears C.L. The toxins of *Bacteroides fragilis*. *Toxicon*, **39**, 1737–1746 (2001)
59. Shoemaker N.B., Vlamakis H., Hayes K., Salyers A.A.: Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. And among *Bacteroides* and other genera in the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 561–568 (2001)
60. Snyderman D.R., Gorbach S.L., I wsp.: In vitro activities of newer quinolones against *Bacteroides* group organisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3276–3279 (2002)
61. Snyderman D.R., Gorbach S.L., I wsp.: National survey on the susceptibility of *Bacteroides fragilis* group: report and analysis of trends in the United States from 1997 to 2004. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 1649–1655 (2007)
62. Snyderman D.R., Hecht D.W. i wsp.: Update on resistance of *Bacteroides fragilis* group and related species with special attention to carbapenems 2006–2009. *Anaerobe*, **17**, 147–151 (2011)

63. Sóki J., Hedberg M., Patrick S., Bálint B., Herczeg R., Nagy I., Hecht D.W., Nagy E., Urbán E.: Emergence and evolution of an international cluster of MDR *Bacteroides fragilis* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **71**, 2441–2448 (2016)
64. Sóki J.: Extended role for insertion sequence elements in the antibiotic resistance of *Bacteroides*. *World J. Clin. Infect. Dis.* **3**, 1–12 (2013)
65. Sutter V.L., Citron D.M., Edelstein M.A.C., Finegold S.M.: Wadsworth anaerobic bacteriology manual, 4th ed. Star Publishing Co., Belmont, 1985
66. Székely E., Eitel Z., Molnár S., Szász I.É., Bilca D., Sóki J.: Analysis of Romanian *Bacteroides* isolates for antibiotic resistance levels and the corresponding antibiotic resistance genes. *Anaerobe*, **31**, 11–14 (2015)
67. Toprak N.U., Yagci A., Gulluoglu B.M., Akin M.L., Demirkalem P., Celenk T., Soyletir G.: A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**, 782–786 (2006)
68. Vedantam G., Hecht D.W.: Antibiotics and anaerobes of gut origin. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 457–461 (2003)
69. Wareham D.W., Wilks M., Ahmed D., Brazier J.S., Millar M.: Anaerobic sepsis due to multidrug-resistant *Bacteroides fragilis*: microbiological cure and clinical response with linezolid therapy. *Clin. Infect. Dis.* **40**, 67–68 (2005)
70. Weintraub A., Larsson B.E., Lindberg A.A.: Chemical and immunochemical analyses of *Bacteroides fragilis* lipopolysaccharides. *Infect. Immun.* **49**, 197–201 (1985)
71. Wexler H.M.: *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 593–621 (2007)
72. Whittle G., Hund B.D., Shoemaker N.B., Salyers A.A.: Characterisation of the 13-kilobase ermF region of the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3488–3495 (2001)
73. Wu S., Lim K.C., Huang J., Saidi R.F., Sears C.L.: *Bacteroides fragilis* enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-cadherin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 14979–14984 (1998)
74. Yang W., Moore I.F., Koteva K.P., Bareich D.C., Hughes D.W., Wright G.D.: *TetX* is a flavin-dependent monooxygenase conferring resistance to tetracycline antibiotics. *J. Biol. Chem.* **279**, 52346–52352 (2004)

Barbara Katarzyna Pawłowska<sup>1\*</sup>, Beata Magdalena Sobieszkańska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu,

Wpłynęło w czerwcu 2016 r.  
Zaakceptowano w sierpniu 2016 r.

1. Wprowadzenie. 2. Amyloidy bakteryjne. 2.1. Fimbrie spiralne. 2.1.1. Synteza fimbrii spiralnych. 2.1.2. Regulacja ekspresji operonu *csg*. 2.1.3. Udział fimbrii spiralnych w wirulencji bakterii. 2.1.4. Rola fimbrii spiralnych w patogenezie zakażeń człowieka. 2.2. Inne amyloidy bakteryjne. 2.3. Amyloidy grzybicze. 3. Podsumowanie

#### Amyloids, common proteins among microorganisms

**Abstract:** Historically, the term *amyloid* was used strictly with reference to human neurodegenerative diseases. Nowadays, it is known that many proteins have the potential to conformational changes into  $\beta$ -sheet structures with tendency to form insoluble amyloid fibrils. Moreover, amyloid proteins are widespread among microorganisms. Bacteria and fungi produce functional amyloids which exhibit all characteristics of amyloid proteins, but in contrast to a numerous group of human toxic amyloids, they play important physiological functions in microorganisms. There is growing evidence that functional amyloids are important in bacterial adhesion and invasion. Furthermore, amyloids make biofilms thicker, rougher, and more resistant to drying out. The increasing interest in better understanding of the nature of these unusual microbial proteins and their role in pathogenesis are likely to contribute to the effective treatment or prevention of infectious diseases in humans.

1. Introduction. 2. Bacterial amyloids. 2.1. Curli fibers. 2.1.1. Curli biogenesis. 2.1.2. Regulation of *csg* operon. 2.1.3. Participation of curli in bacterial virulence. 2.1.4. Role of curli in pathogenesis. 2.2. Other bacterial amyloids. 2.3. Fungal amyloids. 3. Recapitulation

**Słowa kluczowe:** amyloidy funkcjonalne, biofilm, fimbrie spiralne

**Key words:** functional amyloids, biofilm, curli fibers

## 1. Wprowadzenie

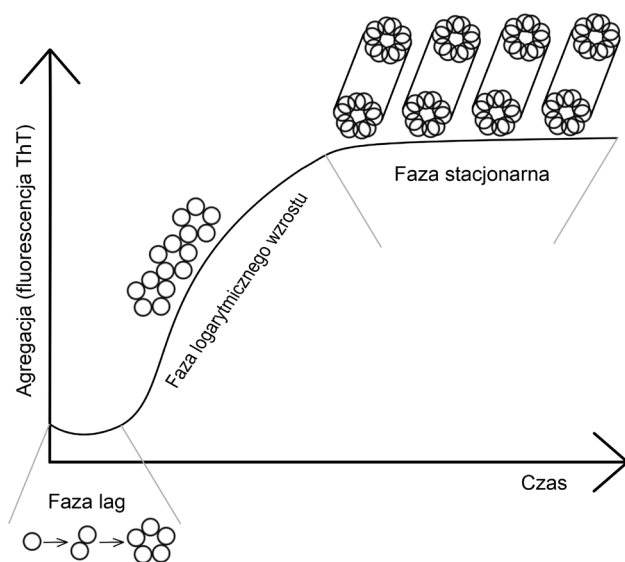
Termin amyloid po raz pierwszy został zastosowany przez Rudolfa Virchowa, który w 1854 roku zaobserwował pozakomórkowe złogi w tkance mózgu i na podstawie niebieskiego wybarwienia jodyną, błędnie opisał je jako skrobia (łac. *amylum*; grec. *amylon*). Pierwsze szczegółowe badania nad amyloidami przeprowadzili Friedreich i Kekule, którzy w 1859 roku potwierdzili białkowe pochodzenie złogów, wykluczając tym samym obecność węglowodanów w badanej masie. Postęp wiedzy o II-rzędowej strukturze białek przyczynił się do odkrycia, że amyloidy w przeciwieństwie do innych białek o strukturze  $\alpha$ -helisy, posiadają prawoskrętną konfigurację  $\beta$ . Charakterystyczna dla wszystkich białek amyloidowych, regularna struktura nierozgałęzionych włókien, tzw.  $\beta$ -harmonijka warunkuje ich wysoką oporność na proteolizę [14, 80, 85]. Do powstawania włókien amyloidowych w organizmie człowieka dochodzi na skutek błędnego uformowania łańcucha polipeptydowego. Przyczyną zmian prawidłowej konformacji białka mogą być różnorodne środowiskowe [56]. Do zmiany struktury drugorzędowej białka z  $\alpha$ -helisy na  $\beta$ -harmonijkę może dojść na skutek: zmian pH lub temperatury, mechanicznego stresu, glikacji oraz oksy-

dacji [18]. Nieprawidłowa konformacja przestrzenna białek prowadzi do polimeryzacji monomerów w toksyczne dla komórek formy przejściowe [17, 29]. Do zakończenia procesu agregacji dochodzi w momencie osiągnięcia stanu równowagi, czyli powstania nierozpuszczalnych struktur, tj. amorficznych agregatów lub włókien amyloidu [30, 35].

Powstawanie włókien amyloidowych w organizmie człowieka towarzyszy rozwojowi amyloidoz, tj. chorób polegających na odkładaniu się w tkankach lub określonych narządach wewnętrznych złogów białek amyloidowych. Gromadzenie się włókien amyloidowych w mózgu prowadzi natomiast do rozwoju chorób neurodegeneracyjnych, m. in. choroby Alzheimera oraz Parkinsona. Dotychczas rozpoznano dużą, heterogenną grupę toksycznych białek amyloidowych, tym nie mniej, występujące w organizmie człowieka amyloidy nie zawsze związane są z procesem patologicznym i mogą również pełnić funkcje fizjologiczne. Przykładem jest odkryte w 2006 roku premelanosomowe białko 17 (Pmel17), które uczestniczy w procesie polimeryzacji i biosyntezy melaniny [24].

W przeciwieństwie do białek amyloidowych powstających w organizmie człowieka przede wszystkim w procesach chorobowych, liczne drobnoustroje tj. bakterie

\* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, ul. T. Chałubińskiego 4, 50-368 Wrocław; tel.: 71 784 12 78; email: pawlowska.barba@gmail.com



Rys. 1. Proces polimeryzacji białek amyloidowych  
Agregacja monomerów prowadzi do powstania toksycznych form pośrednich (oligomerów), protofibryli oraz włókien amyloidów.

i grzyby wytwarzają tzw. amyloidy funkcjonalne, które pośredniczą w ich procesach fizjologicznych [27, 90, 95].

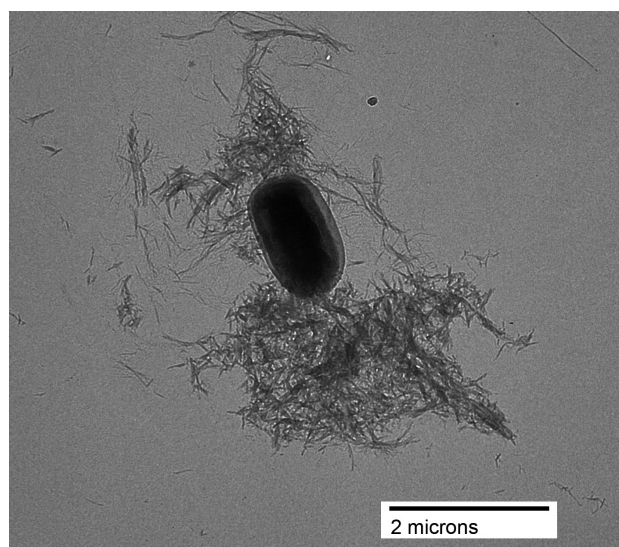
Amyloidy funkcjonalne drobnoustrojów powstają w skomplikowanych procesach biosyntezy, co odróżnia je od nieprawidłowo pofałdowanych, toksycznych amyloidów ludzkich. Pomimo istotnych różnic na etapie tworzenia amyloidów wytwarzanych przez drobnoustroje oraz organizm człowieka, białka te cechują się szeregiem wspólnych właściwości fizyko-chemicznych. [13]. Struktura  $\beta$ -harmonijki, która charakteryzuje wszystkie amyloidy odpowiada za ich niezwykłą oporność na trawienie proteazami oraz denaturację enzymatyczną, cieplną i chemiczną. Włókna amyloidowe cechuje wytrzymałość na rozciąganie porównywalna do stali, a sztywność mechaniczna tych białek jest zbliżona do jedwabiu [87]. Ze względu na wysoką trwałość włókien amyloidowych do izolacji monomerów tych białek stosuje się stężony kwas mrówkowy lub heksafluoro-2-propanol (HFIP). W pozostałych kwasach oraz zasadach białka amyloidowe nie rozpuszczają się [60, 86]. Ponadto, do charakterystycznych cech wszystkich białek amyloidowych zalicza się zdolność wiązania czerwieni Kongo, tioflawiny T oraz kurkuminy [45, 49, 55]. Dodatek czerwieni Kongo lub kurkuminy do podłoża hodowlanego umożliwia wykrywanie białek amyloidowych na powierzchni bakterii, ponieważ barwniki te wbudowują się w strukturę  $\beta$ -harmonijki, wpływając zarówno na kolor jak i morfologię kolonii. Zastosowanie czerwieni Kongo jest również wykorzystywane do wykrywania charakterystycznej dla amyloidów dwójłomności w świetle spolaryzowanym, którą obserwuje się w postaci żółto-zielonego świecenia. Tioflawina T jest barwnikiem fluorescencyjnym, który stosowany jest do badań nad kinetyką procesów polimeryzacji białek

amyloidowych. Wbudowanie tioflawiny T w strukturę  $\beta$ -harmonijki powstających włókien amyloidu prowadzi do wzmocnienia jego fluorescencji. W procesie agregacji białek amyloidowych wyróżnia się trzy etapy: 1) fazę lag, która odpowiada oligomeryzacji globularnych monomerów, 2) fazę tworzenia i wydłużania włókien amyloidu oraz 3) fazę stabilizacji, która odzwierciedla zakończony proces polimeryzacji i stałą liczbę włókien (Rys. 1).

## 2. Amyloidy bakteryjne

### 2.1. Fimbrie spiralne

Pierwsze doniesienia o bakteryjnych amyloidach pojawiły się w 1989 roku [66]. Jak dotychczas, fimbrie spiralne są jedynym wykrytym u Gram-ujemnych pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* antygenem bakteryjnym zbudowanym z amyloidu (Rys. 2.). Ekspresja genów *csg* (*curli-specific genes*), które kodują te adhezyny została potwierdzona u *Salmonella* sp., *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp. *Proteus* sp oraz gatunku *Escherichia coli* (*E. coli*) [98].



Rys. 2. Fimbrie spiralne na powierzchni *E. coli*  
Zdjęcie z transmisyjnego mikroskopu elektronowego dzięki uprzejmości prof. M. Chapmana.

#### 2.1.1. Synteza fimbrii spiralnych

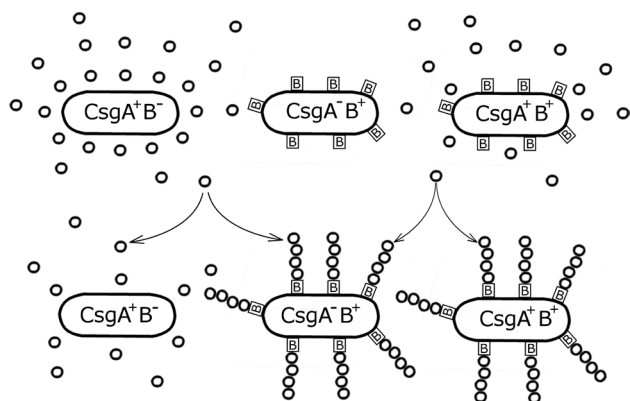
Za biogenezę fimbrii spiralnych odpowiadają białka kodowane przez siedem genów zlokalizowanych na dwóch operonach: *csgDEFG* oraz *csgBAC*. Podczas transkrypcji operon *csgDEFG* jest przepisywany w lewo, natomiast *csgBAC* w prawo. Operon *csgBAC* zawiera geny, które kodują dwie kluczowe podjednostki strukturalne tj. białka CsgA i CsgB. Białka te posiadają zbl-

zoną masę cząsteczkową (~17 kDa) a ich struktura obejmuje pięć homologicznych odcinków, których model przypomina spinkę do włosów [5]. Powtarzające się sekwencje aminokwasów są bogate w glicynę, glutaminę i asparaginę, co jest typowe dla peptydów amyloidogennych [69]. Pomiedzy resztami glutaminy i sparaginy powstają wiązania wodorowe, które zapewniają trwałość i odporność białek amyloidowych na proteolizę [72, 97].

Podjednostki strukturalne fimbrii spiralnych polimeryzują poza komórką bakteryjną, co odróżnia te adhezyny od pozostałych typów fimbrii, których synteza rozpoczyna się przy podstawie błony zewnętrznej.

Sekretcja białka CsgA i CsgB do przestrzeni zewnątrzkomórkowej jest możliwa, ponieważ podczas syntezy fimbrii spiralnych w błonie zewnętrznej bakterii powstają kanały zbudowane z lipoproteiny CsgG. Translokacja głównych podjednostek strukturalnych jest zależna od innych białek: CsgC, CsgE oraz CsgF. Rolą białka CsgC jest zapobieganie autotoksyczności poprzez hamowanie przedwczesnej amyloidogenezy na etapie transportu monomerów CsgA. Białko CsgE jest obecne w przestrzeni periplazmatycznej bakterii i pełni rolę pomocniczą podczas naprowadzania cząstek CsgA w kierunku kanału zlokalizowanego w błonie zewnętrznej. W momencie uwolnienia do środowiska pozakomórkowego podjednostek CsgA i CsgB istotną rolę odgrywa związana z błoną zewnętrzną cząsteczka CsgF, która odpowiada za zakotwiczenie białka CsgB, a następnie wpływa na szybkość polimeryzacji monomerów CsgA w włókna amyloidowe fimbrii spiralnych [22, 44].

Zakotwiczenie białka zarodnikowego CsgB w błonie zewnętrznej zapoczątkowuje proces nukleacji, gdyż jest sygnałem wzbudzającym polimeryzację rozpuszczalnych monomerów CsgA. W warunkach *in vivo*



Rys. 3. Synteza fimbrii spiralnych

CsgA<sup>+</sup>B<sup>-</sup> – bakteria wydziela do środowiska monomery CsgA, ale brak ekspresji CsgB na jej powierzchni uniemożliwia syntezę fimbrii spiralnych; CsgA<sup>-</sup>B<sup>+</sup> – bakteria nie wytwarza CsgA, ale posiada na swojej powierzchni białko CsgB, stąd na jej powierzchni powstają fimbrie spiralne, gdy w środowisku obecne są monomery CsgA; CsgA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> – bakteria zdolna do samodzielnej syntezy fimbrii spiralnych.

białko CsgB jest niezbędne podczas biosyntezy fimbrii spiralnych, gdyż komórka bakteryjna niewykazująca ekspresji tego białka jest niezdolna do zakotwiczenia na błonie zewnętrznej powstających włókien amyloidu. Cząsteczki CsgA oraz CsgB mogą być natomiast syntezowane przez dwie, różne bakterie, które należą do odmiennych gatunków np. *Salmonella* sp. i *E. coli*. Wariant taki jest możliwy, ponieważ bakteria, pozbawiona ekspresji białka zarodnikowego CsgB, uwalnia do środowiska zewnętrznego monomery CsgA, które mogą agregować na powierzchni innej bakterii, posiadającej w błonie zewnętrznej białko zarodnikowe CsgB (Rys. 3.) [33].

### 2.1.2. Regulacja ekspresji operonu *csg*

W przeciwieństwie do nieprawidłowo formowanych ludzkich białek amyloidowych, biogeneza fimbrii spiralnych jest ściśle uporządkowana. Za prawidłowy przebieg tego wieloetapowego procesu odpowiadają czynniki regulatorowe. Najważniejszym z nich jest białko CsgD, które zalicza się do rodziny regulatorów transkrypcyjnych FixJ/UhpA/LuxR [12]. Za funkcje regulatorowe tych białek odpowiada domena C-końcowa, która ma właściwości wiążące DNA. Białko CsgD łącząc się z promotorem operonu *csgBAC* indukuje jego pozytywną regulację [79].

W odróżnieniu od innych białek z rodziny FixJ/UhpA/LuxR, białko CsgD nie ma wpływu na własną ekspresję. Jest ona zależna od: fazy wzrostu bakterii, sygnałów środowiskowych, międzykomórkowej cząsteczki sygnalizacyjnej tj. cyklicznego guanozyno-3',5'-monofosforanu (c-GMP) oraz małego regulatorowego RNA [51]. Bakteryjne małe RNA są obecnie przedmiotem intensywnych badań ze względu na ich istotny wpływ na regulację ekspresji genów. Regulatorowym RNA, które oddziałuje na gen *csgD* jest czynnik RydC, pełniący rolę ryboregulatora u *Salmonella* sp. oraz u *E. coli*. Do prawidłowego funkcjonowania czynnika RydC niezbędna jest obecność białka opiekuńczego Hfq. Kompleks RydC-Hfq łączy się z *csgD* mRNA na zasadzie komplementarności, a następnie blokuje proces translacji, co skutkuje wyciszeniem biogenezy fimbrii spiralnych i utratą zdolności tworzenia biofilmu. [8]. Wznowienie translacji następuje dopiero po znacznym obniżeniu poziomu białka RydC w komórce bakteryjnej.

Istotnym czynnikiem środowiskowym regulującym biosyntezę fimbrii spiralnych jest temperatura. Choć większość bakterii wykazuje ekspresję genów operonu *csg* wyłącznie w temperaturze poniżej 30°C, wiele patogennych szczepów *E. coli* syntezuje fimbrie spiralne również w temperaturze ciała ludzkiego. Zdolność pałeczek *E. coli* do biogenezy fimbrii spiralnych w temperaturze 37°C pojawia się na skutek mutacji

w genie *csgD* [93]. W warunkach *in vitro* fimbrie spiralne produkowane są w stacjonarnej fazie wzrostu bakterii, na podłożach hodowlanych o niskiej osmolalności, przy ograniczonym dostępie azotu, fosforu i żelaza. Ponadto, ekspresja genu *csgD* jest najwyższa w warunkach mikroaerofilnych [5, 28].

### 2.1.3. Udział fimbrii spiralnych w wirulencji bakterii

Fimbrie spiralne pełnią istotne funkcje podczas wieloetapowego procesu tworzenia biofilmów. Udział tych adhezyn jest szczególnie ważny podczas pierwszej fazy tworzenia struktury biofilmu, czyli w momencie wstępnej adhezji bakterii do powierzchni abiotycznych lub biotycznych [94]. Fimbrie zbudowane z amyloidu przyczyniają się do efektywnej kolonizacji tkanek roślinnych, nierdzewnej stali, polistyrenu czy szkła [4, 42, 71, 80]. Po skolonizowaniu powierzchni, dzięki hamowaniu przez fimbrie spiralne agregacji komórek bakteryjnych, mogą one tworzyć mikrokolonie. Dojrzały biofilm jest strukturą trójwymiarową, pokrytą warstwą zewnątrzkomórkowej macierzy, która chroni bakterie przed szkodliwymi czynnikami (m.in. antybiotykami). Ukryte wewnątrz biofilmu patogeny jelitowe są bezpieczne, gdyż macierz zewnątrzkomórkowa posiada cechy wytrzymałej bariery fizycznej. Charakterystyczne właściwości fizyczne i chemiczne macierzy są utrzymywane przez fimbrie spiralne, które stanowią główny, białkowy składnik macierzy zewnątrzkomórkowej tworzonej przez *E. coli* i *Salmonella* sp. Dzięki wysokiej trwałości i oporności amyloidów na proteolizę, biofilmy stanowią swoiste schronienie dla bakterii, umożliwiające im namnażanie pomimo niekorzystnych warunków panujących poza strukturą biofilmu. Bakterie prezentujące na swojej powierzchni fimbrie spiralne produkują biofilmy, które są wyraźnie grubsze i bardziej rozległe w porównaniu do biofilmów syntezowanych przez drobnoustroje pozbawione tych antygenów [43, 95].

Unikalną cechą fimbrii spiralnych jest ich zdolność wiązania białek plazmatycznych i komórkowych, co świadczy o udziale tych antygenów w patogenezie zakażeń u człowieka. Powinowactwo do białek głównego układu zgodności tkankowej MHC-I (*major histocompatibility complex*) umożliwia modulowanie odpowiedzi przeciwzapalnej gospodarza, ponieważ w warunkach fizjologicznych cząsteczki MHC-I odpowiadają m.in. za obronę przed patogenami [40, 64, 67]. Amyloidowe fimbrie mogą wiązać zarówno łańcuch ciężki  $\alpha$  białka MHC-I, jak i jego podjednostkę tj.  $\beta_2$ -mikroglobulinę. Ponadto, w badaniach *in vitro* wykazano, że bakterie prezentujące fimbrie spiralne wykazują zwiększoną adhezję do linii komórkowej o prawidłowej ekspresji cząsteczek MHC-I w porównaniu do linii o zredukowanej ekspresji tych antygenów na powierzchni [67].

Zdolność wiązania plazminogenu ułatwia bakteriom produkującym fimbrie spiralne inwazję do tkanek gospodarza. Na skutek wiązania plazminogenu powstaje plazmina, która odpowiada m.in. za przerwanie ciągłości tkanek. Uszkodzenie komórek gospodarza sprzyja z kolei inwazji bakterii do głębszych warstw tkanek. Ponadto, Gophna i wsp. [32] wykazali, że po wprowadzeniu operonu *csg* odpowiedzialnego za syntezę fimbrii spiralnych do genomu nieinwazyjnych szczepów *E. coli* bakterie te wykazywały zdolność do inwazji.

Główna jednostka strukturalna CsgA posiada dwa miejsca wiążące, które mogą równocześnie reagować z różnymi cząsteczkami [65]. Jednoczesne wiązanie dwóch, odmiennych białek może pobudzać układ odpornościowy gospodarza do nasilonej reakcji immunologicznej. Białko CsgA zalicza się do wzorców molekularnych związanych z patogenami (PAMP, *pathogen associated molecular patterns*), co oznacza, że jest ono selektywnie rozpoznawane przez błonowe Toll-like receptory (TLR) [92]. Fimbrie spiralne, podobnie jak ludzkie amyloidy (m.in.  $\beta$ , amyлина oraz surowiczy amyloid A), rozpoznawane są przez receptory TLR2 [11, 50, 96]. W proces wiązania bakteryjnych włókien amyloidu zaangażowane są również receptory TLR1, których aktywacja jest niezbędna do skutecznego wzbudzenia nieswoistej odpowiedzi odpornościowej. Związanie białka CsgA przez kompleks TLR1/2 skutkuje m.in. wzmożoną syntezą i sekrecją cytokin prozapalnych, tj. interleukiny (IL) -1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-17A, IL-22, IL-23 oraz TNF- $\alpha$  [6, 38, 59, 75, 91]. Z drugiej strony, wiązanie TLR2 powoduje: a) wzmożoną ekspresję kinazy 3-fosfatidyloinozytolu (PI3K, *phosphoinositide 3-kinase*), która reguluje przepuszczalność bariery jelitowej poprzez uszczelnianie ciasnych połączeń międzykomórkowych oraz b) sekrecję IL-10, która ma właściwości przeciwzapalne [68].

### 2.1.4. Rola fimbrii spiralnych w patogenezie zakażeń człowieka

Rola fimbrii spiralnych w chorobotwórczości człowieka nie została jak dotychczas jednoznacznie potwierdzona. Szczepy prezentujące fimbrie spiralne w temperaturze ciała ludzkiego izolowano z przypadków sepsy, zakażeń układu moczowego oraz biegunek u ludzi [6, 7, 15, 37, 39, 46].

Pierwsze doniesienia o udziale fimbrii spiralnych w patogenezie chorób człowieka ukazały się 2000 roku [6]. Rezultatem badań przeprowadzonych przez Bian i wsp. [6] było wykrycie w surowicy krwi chorych z sepsą przeciwciał anti-CsgA, co potwierdza udział tych antygenów w zakażeniach ogólnoustrojowych. Ponadto, obecność przeciwciał anti-CsgA została potwierdzona w surowicy dzieci, które zmarły w wyniku zespołu uogólnionej reakcji zapalnej, podczas gdy



w grupie kontrolnej zdrowych dzieci przeciwciała te nie były obecne [31].

Amyloidowe fimbrie spiralne są również istotne podczas rozwoju zakażeń układu moczowego [61]. Badania na zwierzętach wykazały, że uropatogenne szczepy *E. coli* (UPEC) prezentujące fimbrie spiralne skuteczniej kolonizują pęcherz moczowy w porównaniu do szczepów mutantów pozbawionych genów *csg* [10]. Co więcej, Hung i wsp. [39] wykazali, że istnieje związek pomiędzy zdolnością uropatogenów do syntezy fimbrii spiralnych w temperaturze ciała ludzkiego, a rozwojem u chorych powikłania zakażenia układu moczowego w postaci wtórnego zakażenia krwi. Ponadto, w zakażeniach układu moczowego poważny problem kliniczny stanowi biofilm, który rozwija się na cewnikach moczowych. Fimbrie spiralne są kluczowym antygenem bakteryjnym zaangażowanym w proces syntezy biofilmu, dlatego nowatorskie podejście do leczenia zakażeń układu moczowego zakłada hamowanie syntezy u bakterii również i tych adhezyn. Interesujące badania przeprowadzili Kai-Larsen i wsp. [41], którzy udowodnili, że produkowana przez nabłonek pęcherza moczowego i nerek katelicydyna LL-37, hamuje polimeryzację białka CsgA, co uniemożliwia syntezę fimbrii spiralnych u namnażających się uropatogenów.

Istnieje niewiele doniesień naukowych o udziale fimbrii spiralnych w patogenezie zakażeń układu pokarmowego. Opisane przypadki dotyczą biegunek i zapaleń jelit wywołanych przez szczepy *E. coli*, u których amyloidowe fimbrie stanowiły jedyny znany czynnik wirulencji [15, 37]. Zdolność syntezy fimbrii spiralnych wykazują również szczepy *E. coli* wywołujące biegunki u dzieci [88]. Przeprowadzone w 2013 roku badania epidemiologiczne wskazują, że fimbrie spiralne są istotne w patogenezie biegunek osób dorosłych, które są wywoływane przez szczepy *E. coli* o rozsianym typie adhezji (DAEC, *diffusely adherent E. coli*). Natomiast, u dzieci do piątego roku życia nie obserwuje się różnic w odsetku szczepów DAEC tworzących fimbrie spiralne pomiędzy grupą dzieci z biegunką a grupą dzieci zdrowych [53].

## 2.2. Inne amyloidy bakteryjne

Jak dotychczas, zdolność syntezy funkcjonalnych amyloidów potwierdzono u bakterii z klas *Gammaproteobacteria*, *Bacterioidetes*, *Firmicutes* i *Actinobacteria* [48]. Główną funkcją bakteryjnych amyloidów jest udział w tworzeniu biofilmów, które powstają w różnorodnych niszach ekologicznych. Do bakterii wytwarzających biofilm w środowisku wodnym, tj. jeziorach słodkowodnych lub wodzie pitnej należy *Pseudomonas* sp., który wytwarza amyloidowe fimbrie Fap (*functional amyloids in Pseudomonas*). Operon zawierający sześć genów (*fapA-F*), które kodują białka strukturalne fimbrii Fap wykryto u gatunków *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*

oraz *P. putida* [19]. Główną podjednostką strukturalną tych adhezyn jest białko FapC, które polimeryzuje w włókna amyloidu. Cząsteczka FapC składa się z trzech podobnych fragmentów, które są połączone przez regiony o różnej długości i składzie aminokwasowym. Regiony pomiędzy powtarzającymi się fragmentami mają zwykle charakter hydrofilowy, stąd prawdopodobnie wywierają wpływ na właściwości dojrzalej struktury biofilmu. Sygnałem do wzbudzenia procesu nukleacji jest aktywacja białka FapB. Pozostałe cząsteczki biorące udział w biogenezie fimbrii Fap biorą udział w transporcie monomerów FapC przez błonę zewnętrzną bakterii lub pełnią inne funkcje opiekuńcze [34].

Pałeczki niefermentujące zaliczane do gatunku *P. aeruginosa* należą do drobnoustrojów oportunistycznych, których chorobotwórczość jest związana ze zdolnością tworzenia biofilmu (np. w płucach osób chorych na mukowiscydozę lub na powierzchni ran). W środowisku szpitalnym gatunek ten odpowiada za częste i trudne w eradykacji zakażenia, ponieważ wielooporne szczepy *P. aeruginosa* z łatwością kolonizują urządzenia medyczne i armaturę sanitarną. Za charakterystyczne właściwości tego gatunku odpowiadają m.in. fimbrie Fap, które są zaangażowane w proces adhezji i agregacji bakterii oraz odpowiadają za stabilizację trójwymiarowej struktury biofilmu [34]. Badania przeprowadzone przez Herbst i wsp. [34] wykazały, że funkcjonalny amyloid produkowany przez *Pseudomonas* sp. chroni biofilm przed wysychaniem, a ponadto zwiększa jego hydrofobowość oraz sztywność. Co więcej, synteza fimbrii Fap moduluje aktywność innych czynników wirulencji *P. aeruginosa*: a) ogranicza wytwarzanie elastazy B i proteazy A; b) stymuluje syntezę alginianu oraz c) wzmacnia aktywność systemu sekrecji typu IV [34].

Fimbrie Fap *Pseudomonas* sp. oraz fimbrie spiralne *E. coli* wykazują podobieństwo zarówno pod względem właściwości fizycznych jak i pełnionych funkcji. Co więcej, proces tworzenia fimbrii Fap jest homologiczny do biogenezy fimbrii spiralnych, ale nie wymaga obecności białka regulatorowego. [20].

Gram-dodatnie laseczki *Bacillus subtilis* należą do saprofitów występujących w glebie, które biorą udział w rozkładaniu związków organicznych. Biofilm, który budują saprofity glebowe jest ściśle pokryty macierzą pozakomórkową złożoną z egzopolisacharydu oraz białek: BslA i TasA. Właściwości amyloidogenne białka TasA umożliwiają polimeryzację w włókna, które tworzą sieć otaczającą bakterie we wnętrzu biofilmu. Adhezyny zbudowane z białka TasA osiągają u *B. subtilis* zmienną długość i szerokość około 10–15 nm. Wzajemne połączenie sąsiadujących komórek bakteryjnych za pomocą fimbrii zwiększa wytrzymałość tworzonej struktury [76]. Biogeneza amyloidowych fimbrii u *B. subtilis* jest zależna od obecności operonu *tasA-sipW-tasA*, który zawiera wyłącznie trzy geny.

Główną podjednostką strukturalną jest białko TasA, wykazujące właściwości przeciwbakteryjne o szerokim spektrum działania. Macierz zewnątrzkomórkowa, która zawiera białko TasA nabiera właściwości toksycznych, co przypuszczalnie ma istotny wpływ na zwalczanie konkurencyjnych bakterii [9, 76, 89]. Gen *sipW* koduje peptydazę sygnałową, której zadaniem jest odcięcie od białek TasA oraz TapA sekwencji sygnałowych, a następnie kontrola ich sekrecji poza komórkę bakteryjną. Ponadto, białko SipW pełni funkcje regulatorowe, gdyż wpływa na ekspresję genów zaangażowanych w syntezę egzopolisacharydów. Produktem trzeciego genu operonu *tasA-sipW-tasA* jest białko TapA, którego rolą jest: a) zakotwiczenie wytwarzanych fimbrii w ścianie komórkowej bakterii; b) wzbudzenie polimeryzacji monomerów TasA oraz c) późniejsza kontrola nad efektywnym tworzeniem amyloidowych włókien [77]. Szczepy pozbawione białka TapA tworzą cienkie i nieprawidłowo uformowane fimbrie, które nie spełniają swoich funkcji [78].

Właściwości amyloidu funkcjonalnego posiadają również fimbrie MTP (*Mycobacterium tuberculosis pili*), które wytwarzają mykobakterie chorobotwórcze dla człowieka. Homologia fimbrii MTP oraz fimbrii spiralnych *E. coli* dotyczy ich morfologii, właściwości biochemicznych oraz pełnionych funkcji. Za kodowanie głównej podjednostki strukturalnej fimbrii MTP odpowiada chromosomalny gen *mtp*, który wykryto u *M. tuberculosis*, *M. bovis* oraz *M. avium* spp. paratuberculosis. Do syntezy fimbrii MTP zdolne są wyłącznie patogenne gatunki *Mycobacterium* sp., co świadczy o ich udziale w wirulencji prątków [2]. Co więcej, w surowicy chorych na gruźlicę wykrywa się przeciwciała anti-MTP. Badania przeprowadzone przez Naidoo i wsp. [58] wykazały, że oznaczanie obecności genu *mtb* metodą PCR jest czułą i swoistą metodą, która w przyszłości mogłaby znaleźć zastosowanie w diagnostyce gruźlicy.

Fimbrie MTP zbudowane są z amyloidu i tworzą cienkie (2–3 nm szerokości), elastyczne włókna. Główną funkcją tych adhezyn jest udział w pierwszym etapie zakażenia. Efektywna kolonizacja organizmu gospodarza jest możliwa dzięki zdolności wiązania przez fimbrie MTP lamininy, ale w przeciwieństwie do fimbrii spiralnych, adhezyny MTP nie wykazują powinowactwa do fibronektyny i kolagenu typu IV. Ponadto, badania *in vitro* wykazały, że szczep pozbawiony fimbrii MTP wykazuje znacznie zmniejszoną adhezję (o 69%) i inwazję (o 56%) do komórek nabłonka płuc w porównaniu do szczepu dzikiego [74]. Fimbrie MTP podobnie jak inne amyloidy funkcjonalne biorą również udział w tworzeniu biofilmu [73]. Badania nad immunomodulującym wpływem fimbrii MTP wykazały, że pomimo aktywnego udziału tych adhezyn podczas pierwszej fazy zakażenia, nie są one immunogenne [74].

Głównym gatunkiem zaangażowanym w powstawanie płytki nazębnej jest *Streptococcus mutans*, który tworzy biofilm bakteryjny na powierzchni zębów. Badania *in vitro* przeprowadzone przez Oli i wsp. [63] wykazały, że macierz zewnątrzkomórkowa pokrywająca biofilm złożony z *S. mutans* zawiera funkcjonalny amyloid, tj. adhezyny P1. Są to struktury zaliczane do lektyn, które przyczyniają się do rozwoju próchnicy, ponieważ wiążą m.in. fibronektynę, fibrynogen, kolagen oraz składniki obecne w ślinie. Adhezyny P1 są produkowane zarówno przez szczepy laboratoryjne, jak i izolaty z płytki nazębnej. Szczepy, które nie posiadają genu *spaP*, kodującego adhezyny P1 wytwarzają biofilm oraz wiążą barwniki służące do wykrywania amyloidów, co świadczy o obecności na powierzchni *S. mutans* dodatkowych, innych niż adhezyny P1 amyloidów funkcjonalnych, które nie zostały dotychczas zidentyfikowane [63].

Biosynteza funkcjonalnych amyloidów zachodzi również u niektórych gatunków gronkowców, m.in. *Staphylococcus aureus* oraz *Staphylococcus epidermidis*. Moduliny rozpuszczalne w fenolu (PSM, *phenol soluble modulins*) są istotnym czynnikiem wirulencji szczepów MRSA (MRSA, *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*). Do najważniejszych funkcji monomerów PSM należą: a) chemoatrakcja i liza neutrofilów gospodarza; b) działanie prozapalne; c) właściwości przeciwbakteryjne, które zapewniają przewagę nad konkurującymi gatunkami bakterii oraz d) udział w dyspersji i migracji bakterii z biofilmu. Autoagregacja cząsteczek PSM prowadzi do powstania fimbrii o właściwościach amyloidu, tzn. zdolnych do wiązania barwników służących do wykrywania struktury  $\beta$  oraz tworzących stabilne spolimeryzowane włókna odporne na proteolizę. Fimbrie złożone z PSM pełnią odmienne role w porównaniu do monomerów PSM, przede wszystkim biorąc udział w tworzeniu biofilmu i utrzymaniu jego prawidłowej struktury. Macierz zewnątrzkomórkowa zawierająca amyloidowe fimbrie produkowane przez *S. aureus* zapobiega rozproszeniu bakterii budujących biofilm. Ponadto, amyloidowe fimbrie gronkowców zwiększają odporność biofilmu na stres mechaniczny i enzymy degradujące. Przeciwnie funkcje fimbrii w stosunku do wolnych cząsteczek PSM świadczą o modulacji właściwości monomerów PSM na skutek ich polimeryzacji [82]. Obecność spolimeryzowanych włókien złożonych z PSM jest zależna od zdolności szczepu do częściowej autolizy i uwolnienia zewnątrzkomórkowego DNA (eDNA, *extracellular DNA*), które sprzyja polimeryzacji monomerów PSM. Co więcej, eDNA tworzy przejściowe kompleksy z białkami PSM, zmniejszając tym samym ich toksyczność [81].

Zależność pomiędzy powstawaniem włókien amyloidu, a redukcją właściwości toksycznych została również potwierdzona w przypadku mikrocyyny E492 (MccE492), która jest syntezowana przez *Klebsiella*

Tabela I  
Bakteryjne i grzybicze amyloidy funkcjonalne

	Organizm	Białka amyloidowe	Funkcja	Piśmien- nictwo
Bakterie	<i>Escherichia coli</i> (i inne gat. <i>Enterobacteriaceae</i> )	CsgA (fimbrie spiralne)	Adhezja, inwazja, tworzenie biofilmu, aktywacja układu immunologicznego gospodarza	[66, 5]
	<i>Pseudomonas</i> spp.	FapC	Tworzenie biofilmu	[19, 20, 34]
	<i>Bacillus subtilis</i>	TasA	Tworzenie biofilmu, toksyczność podczas sporulacji	[76, 77, 89]
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	MTP	Wiązanie białek gospodarza, tworzenie biofilmu	[2]
	<i>Streptococcus mutans</i>	Adhezyna P1	Współtworzenie płytki nazębnej	[63]
	<i>Staphylococcus aureus</i> (i inne gat. <i>Staphylococcus</i> )	Moduliny rozpuszczalne w fenolu	Utrzymywanie struktury biofilmu	[82]
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	mikrocyna E492	Bakteriocyna inaktywowana w trakcie amyloidogenezy	[54, 83]
	<i>Streptomyces coelicolor</i>	czapliny	Adhezja do powierzchni hydrofilowych	[16, 21, 23]
	<i>Xhantomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	HpaG	Wzbudzanie nadwrażliwości u roślin	[62]
	<i>Erwinia amylovora</i>	HrpN		
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringa</i>	HrpZ		
Grzyby	<i>Candida</i> spp.	Adhezyny Als	Adhezja, tworzenie biofilmu, modulacja układu immunologicznego gospodarza	[3, 84]
	Grzyby strzępkowe (m.in. <i>Cladosporium</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Alternaria</i> spp. oraz <i>Aspergillus</i> spp.)	Hydrofobiny	Nadanie właściwości hydrofobowych strukturom powietrznym, unikanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza	[1, 52, 57]

*pneumoniae* [83]. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa MccE492 ogranicza się do rodziny *Enterobacteriaceae* i bakterii, które walczą o zajęcie tej samej niszy ekologicznej. Toksyczność MccE492 polega na tworzeniu kanałów jonowych w podwójnej warstwie fosfolipidów konkurencyjnych bakterii, co prowadzi do depolaryzacji i wzrostu przepuszczalności ich błony cytoplazmatycznej [47]. Ponadto, MccE492 wykazuje *in vitro* właściwości cytotoksyczne wobec komórek eukariotycznych, indukując ich apoptozę lub nekrozę [36]. Do biogenezy toksycznych cząsteczek MccE492 dochodzi podczas fazy logarytmicznego wzrostu *K. pneumoniae*. Syntezowane cząsteczki mogą być wydzielane do środowiska w formie niezmienionej lub potranslacyjnie modyfikowanej, uruchamianej pod wpływem kowalencyjnego związania sideroforów do domeny C-końcowej cząsteczki MccE492. Tym nie mniej, obie formy mikrocyny wykazują właściwości amyloidogenne, choć forma niemodyfikowana efektywniej tworzy amyloid [54]. Proces amyloidogenezy zachodzi w fazie stacjonarnej wzrostu *K. pneumoniae* i wiąże się ze znacznym zmniejszeniem toksyczności MccE492. Proces agregacji mikrocyn jest odwracalny i umożliwia uwalnianie pojedynczych cząsteczek w momencie istotnych zmian warunków środowiska. Dzięki tej unikalnej właściwości włókna złożone z cząsteczek MccE492 są określane jako rezerwuar mikrocyn, które po uwolnieniu odzyskują cechy toksyczne [83].

Biosynteza amyloidów u występujących w glebie bakterii *Streptomyces coelicolor*, przyczynia się do modyfikacji właściwości powierzchniowych tych bakterii.

Czapliny (*chaplins*) to grupa ośmiu białek (ChpA-H) o właściwościach amyloidogennych, których sekrecja wiąże się z tworzeniem włókien amyloidu na powierzchni strzępek powietrznych oraz zarodników *S. coelicolor* [21, 23]. Sieć fimbrii zbudowanych z czaplin zapewnia hydrofobowość struktur powietrznych i chroni je przed wysychaniem. Ponadto, hydrofobowe fimbrie biorą udział w adhezji strzępek powietrznych do powierzchni hydrofilowych [16].

Amyloidy funkcjonalne są również produkowane przez Gram-ujemne patogeny roślin, ale ich rola jest słabo poznana. Harpiny są ciepłostalymi białkami, które są wydzielane jako bakteryjne czynniki wirulencji poprzez system sekrecji typu III. Do ich funkcji należy wzbudzanie nadwrażliwości rośliny i pośredniczenie w rozprzestrzenianiu się bakterii wewnątrz apoplastu. Najlepiej poznana harpiną syntezowaną przez *Xhantomonas axonopodis* pv. *glycines* jest białko HpaG, które polimeryzuje w włókna o cechach amyloidu. Tworzenie amyloidu przez harpiny koreluje z wirulencją bakterii, gdyż szczepy pozbawione genu *hpaG* kodującego HpaG są niezdolne do wzbudzenia nadwrażliwości roślin. W przypadku białka HpaG formy przejściowe oraz włókna amyloidu wykazują jednakową toksyczność wobec komórek roślinnych. Właściwości amyloidogenne posiadają również inne harpiny, m.in. HrpN wydzielane przez *Erwinia amylovora* oraz HrpZ, kluczowe w wirulencji *Pseudomonas syringae* pv. *syringa* [62]. Przykłady poznanych dotychczas białek amyloidowych wytwarzanych przez różne drobnoustroje przedstawia Tabela I.

### 2.3. Amyloidy grzybicze

Do grzybiczych amyloidów funkcjonalnych należą adhezyny Als (*Agglutinin-like sequence*), które są glikoproteinami kodowanymi przez osiem loci. Wszystkie glikoproteiny z rodziny Als posiadają strukturę złożoną z czterech charakterystycznych regionów, z pośród których domena T wykazuje właściwości amyloidu [70]. Adhezyny Als są istotnym czynnikiem wirulencji grzybów drożdżopodobnych, gdyż pośredniczą w adhezji, a następnie kolonizacji tkanek gospodarza. Podczas procesu biogenezy biofilmu adhezyny Als są odpowiedzialne za agregację komórek grzybiczych oraz wiązanie innych mikroorganizmów, co przyczynia się do utworzenia wielogatunkowego biofilmu [3, 84]. Ponadto, grzybicze amyloidy funkcjonalne odgrywają istotną rolę podczas rozwoju kandydoz inwazyjnych. Dzięki zdolności wiązania surowiczego amyloidu P (SAP) w organizmie gospodarza dochodzi do zahamowania odpowiedzi immunologicznej i ograniczenia nacieku złożonego z neutrofilów w miejscu wniknięcia do tkanki grzybów drożdżopodobnych. Powłoka zbudowana z amyloidu SAP, która powstaje na powierzchni grzybów uniemożliwia komórkom immunokompetentnym rozpoznanie obcych antygenów. Badania przeprowadzone przez Garcia-Sherman i wsp. [25, 26] wykazały, że proces tłumienia odpowiedzi immunologicznej zależy od kompleksów grzybiczych amyloidów z SAP jest również charakterystyczny dla innych zakażeń grzybiczych, tj. aspergilozy, mukormykozy oraz kokcydioidomykozy.

Hydrofobiny to grupa białek produkowanych wyłącznie przez grzyby strzępkowe. Agregacja w włókna amyloidowe jest charakterystyczna dla hydrofobin klasy II, które po spolimeryzowaniu pokrywają powierzchnię grzybni powietrznej, zapewniając jej wodoodporność. Co więcej, amyloidy zbudowane z monomerów hydrofobin umożliwiają rozprzestrzenianie zarodników w powietrzu oraz ich adhezję do powierzchni liści [52, 57]. Rola hydrofobin w chorobotwórczości człowieka jest słabo poznana. Aimanianda i wsp. [1] wykazali, że zarodniki grzybów z rodzajów *Cladosporium*, *Penicillium*, *Alternaria* oraz *Aspergillus* nie pobudzają układu odpornościowego po dostaniu się do dróg oddechowych gospodarza dzięki powłoce złożonej z hydrofobin. Wpływ amyloidu na proces tłumienia odpowiedzi immunologicznej został dodatkowo potwierdzony w badaniach *in vitro* oraz *in vivo*, które wykazały, że zarodniki *Aspergillus fumigatus*, które nie posiadają hydrofobowej warstwy hydrofobin indukują masywną odpowiedź ze strony układu odpornościowego gospodarza [1].

### 3. Podsumowanie

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie badaczy amyloidami funkcjonalnymi, tj. białkami, które formują włókna amyloidu na powierzchni drobnoustrojów.

Amyloidy wytwarzane przez bakterie i grzyby, podobnie jak toksyczne amyloidy ludzkie, powstają na drodze autoagregacji monomerów (podjednostek białkowych), ale w przeciwieństwie do nieprawidłowo połałdowanych, toksycznych włókien amyloidów ludzkich, wiele różnych grup drobnoustrojów wytwarza te białka w ściśle określonym celu, np. jako składnik macierzy zewnątrzkomórkowej biofilmu.

Jak dotychczas, rola poszczególnych amyloidów funkcjonalnych w patogenezie zakażeń człowieka jest słabo zbadana. Wnikliwe poznanie odpowiedzi immunologicznej organizmu człowieka na amyloidy syntezowane przez drobnoustroje mogłoby w przyszłości przyczynić się do opracowania nowych metod leczenia licznych zakażeń bakteryjnych i grzybiczych.

### Piśmiennictwo

1. Aimanianda V., Bayry J., Bozza S., Knemeyer O., Perruccio K., Elluru S.R., Clavaud C., Paris S., Brakhage A.A., Kaveri S.V., Romani L., Latgé J.P.: Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature*, **460**, 1117–1121 (2009)
2. Alteri Ch.J., Xicohténcatl-Cortes J., Hess S., Caballero-Olín G., Girón J.A., Friedman R.L.: *Mycobacterium tuberculosis* produces pili during human infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 5145–5150 (2007)
3. Aoki W., Kitahara N., Miura N., Morisaka H., Kuroda K., Ueda M.: Profiling of adhesive properties of the agglutinin-like sequence (ALS) protein family, a virulent attribute of *Candida albicans*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **65**, 121–124 (2012)
4. Barak J.D., Gorski L., Naraghi-Aran P., Charkowski A.O.: *Salmonella enterica* virulence genes are required for bacterial attachment to plant tissue. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 5685–5691 (2005)
5. Barnhart M.M., Chapman M.R.: Curli biogenesis and function. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**, 131–147 (2006)
6. Bian Z., Brauner A., Li Y., Normark S.: Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis. *J. Infect. Dis.* **181**, 602–612 (2000)
7. Bokranz W., Wang X., Tschäpe H., Römling U.: Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. *J. Med. Microbiol.* **54**, 1171–1182 (2005)
8. Bordeau V., Felden B.: Curli synthesis and biofilm formation in enteric bacteria are controlled by a dynamic small RNA module made up of a pseudoknot assisted by an RNA chaperone. *Nucleic Acids Res.* **42**, 4682–4696 (2014)
9. Branda S.S., Chu F., Kearns D.B., Losick R., Kolter R.: A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Mol. Microbiol.* **59**, 1229–1238 (2006)
10. Cegelski L., Pinkner J.S., Hammer N.D., Cusumano C.K., Hung C.S., Chorell E., Åberg V., Walker J.N., Seed P.C., Almqvist F., Chapman M.R., Hultgren S.J.: Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation. *Nature Chem. Biology*, **5**, 913–919 (2009)
11. Cheng N., He R., Tian J., Ye P.P., Ye R.D.: Cutting edge: TLR2 is a functional receptor for acute-phase serum amyloid A. *J. Immunol.* **181**, 22–26 (2008)
12. Chirwa N.T., Herrington M.B.: CsgD, a regulator of curli and cellulose synthesis, also regulates serine hydroxymethyltrans-

- ferase synthesis in *Escherichia coli* K-12. *Microbiology*, **149**, 525–535 (2003)
13. Chiti F, Dobson C.M.: Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 333–366 (2006)
  14. Cohen A.S., Calkins E.: Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins. *Nature*, **183**, 1202–1203 (1959)
  15. Collinson S.K., Emödy L., Trust T.J., Kay W.W.: Thin aggregative fimbriae from diarrheagenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**, 4490–4495 (1992)
  16. de Jong W., Wösten H.A., Dijkhuizen L., Claessen D.: Attachment of *Streptomyces coelicolor* is mediated by amyloid fimbriae that are anchored to the cell surface via cellulose. *Mol. Microbiol.* **73**, 1128–1140 (2009)
  17. DeMarco M.L., Daggett V.: From conversion to aggregation: protofibril formation of the prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 2293–2298 (2004)
  18. Dobson C.M.: Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 329–332 (1999)
  19. Dueholm M.S., Petersen S.V., Sønderkær M., Larsen P., Christiansen G., Hein K.L., Enghild J.J., Nielsen J.L., Nielsen K.L., Nielsen P.H., Otzen D.E.: Functional amyloid in *Pseudomonas*. *Mol. Microbiol.* **77**, 1009–1020 (2010)
  20. Dueholm M.S., Søndergaard M.T., Nilsson M., Christiansen G., Stensballe A., Overgaard M.T., Givskov M., Tolker-Nielsen T., Otzen D.E., Nielsen P.H.: Expression of Fap amyloids in *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* and *P. putida* results in aggregation and increased biofilm formation. *Microbiology*, **2**, 365–382 (2013)
  21. Ekkers D.M., Claessen D., Galli F., Stamhuis E.: Surface modification using interfacial assembly of the *Streptomyces* chaplin proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 4491–4501 (2014)
  22. Evans M.L., Chorell E., Taylor J.D., Åden J., Götheson A., Li F., Koch M., Sefer L., Matthews S.J., Wittung-Stafshede P., Almqvist F., Chapman M.R.: The bacterial curli system possesses a potent and selective inhibitor of amyloid formation. *Mol. Cell.* **57**, 445–455 (2015)
  23. Flårdh K., Buttner M.J.: *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 36–49 (2009)
  24. Fowler D.M., Koulov A.V., Alory-Jost C., Marks M.S., Balch W.E., Kelly J.W.: Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS Biol.* **4**, e6 (2006)
  25. Garcia-Sherman M.C., Lundberg T., Sobonya R.E., Lipke P.N., Klotz S.A.: A unique biofilm in human deep mycoses: fungal amyloid is bound by host serum amyloid P component. *NPJ Biofilms Microbiomes*, **1**, pii, 15009 (2015)
  26. Garcia-Sherman M.C., Lysak N., Filonenko A., Richards H., Sobonya R.E., Klotz S.A., Lipke P.N.: Peptide detection of fungal functional amyloids in infected tissue. *PLoS One*, **21**, e86067 (2014)
  27. Gebbink M.F., Claessen D., Bouma B., Dijkhuizen L., Wosten H.A.: Amyloids—a functional coat for microorganisms. *Nat. Rev.* **3**, 333–341 (2005)
  28. Gerstel U., Römling U.: Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate agfD promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella Typhimurium*. *Environ. Microbiol.* **3**, 638–648 (2001)
  29. Glabe C.G.: Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease. *Neurobiol. Aging*, **27**, 570–575 (2006)
  30. Go N.: The consistency principle in protein structure and pathways of folding. *Adv. Biophys.* **18**, 149–164 (1984)
  31. Goldwater P.N., Bettelheim K.A.: Curliated *Escherichia coli*, soluble curlin and the sudden infant death syndrome (SIDS). *J. Med. Microbiol.* **51**, 1009–1012 (2002)
  32. Gophna U., Barlev M., Seiffers R., Oelschläger T.A., Hacker J., Ron E.Z.: Curli fibers mediate internalization of *Escherichia coli* by eukaryotic cells. *Infect. Immun.* **69**, 2659–2665 (2001)
  33. Hammar M., Bian Z., Normark S.: Nucleator-dependent intercellular assembly of adhesive curli organelles in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6562–6566 (1996)
  34. Herbst F.A., Søndergaard M.T., Kjeldal H., Stensballe A., Nielsen P.H., Dueholm M.S.: Major proteomic changes associated with amyloid-induced biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Proteome. Res.* **14**, 720–781 (2015).
  35. Herczenik E., Gebbink M.F.: Molecular and cellular aspects of protein misfolding and disease. *FASEB J.* **22**, 2115–2133 (2008)
  36. Hetz C., Bono M.R., Barros L.F., Lagos R.: Microcin E492, a channel-forming bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae*, induces apoptosis in some human cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 2696–2701 (2002)
  37. Hinson G., Knutton S., Lam-Po-Tang M.K., McNeish A.S., Williams P.H.: Adherence to human colonocytes of an *Escherichia coli* strain isolated from severe infantile enteritis: molecular and ultrastructural studies of a fibrillar adhesin. *Infect. Immun.* **55**, 393–402 (1987)
  38. Hufnagel D.A., Tükel C., Chapman M.R.: Disease to dirt: the biology of microbial amyloids. *PLoS Pathog.* **9**, e1003740 (2013)
  39. Hung C., Marschall J., Burnham C.A., Byun A.S., Henderson J.P.: The bacterial amyloid curli is associated with urinary source bloodstream infection. *PLoS One*, **9**, e86009 (2014)
  40. Johansson C., Nilsson T., Olsén A., Wick M.J.: The influence of curli, a MHC-I-binding bacterial surface structure, on macrophage-T cell interactions. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **30**, 21–29 (2001)
  41. Kai-Larsen Y., Lühje P., Chromek M., Peters V., Wang X., Holm A., Kádas L., Hedlund K.O., Johansson J., Chapman M.R., Jacobson S.H., Römling U., Agerberth B., Brauner A.: Uropathogenic *Escherichia coli* modulates immune responses and its curli fimbriae interact with the antimicrobial peptide LL-37. *PLoS Pathog.* **6**, e1001010 (2010)
  42. Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L.: Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 12–40 (2004)
  43. Kikuchi T., Mizunoe Y., Takade A., Naito S., Yoshida S.: Curli fibers are required for development of biofilm architecture in *Escherichia coli* K-12 and enhance bacterial adherence to human uroepithelial cells. *Microbiol. Immunol.* **49**, 875–884 (2005)
  44. Klein R.D., Hultgren S.J.: Chaos controlled: discovery of a powerful amyloid inhibitor. *Mol. Cell.* **57**, 391–393 (2015)
  45. Klunk W.E., Jacob R.F., Mason R.P.: Quantifying amyloid by congo red spectral shift assay. *Methods Enzymol.* **309**, 285–305 (1999)
  46. Kudinha T., Johnson J.R., Andrew S.D., Kong F., Anderson P., Gilbert G.L.: Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from children with urinary tract infection and from healthy carriers. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **32**, 543–548 (2013)
  47. Lagos R., Wilkens M., Vergara C., Cecchi X., Monasterio O.: Microcin E492 forms ion channels in phospholipid bilayer membrane. *FEMS Lett.* **321**, 145–148 (1993)
  48. Larsen P., Nielsen J.L., Dueholm M.S., Wetzel R., Otzen D., Nielsen P.H.: Amyloid adhesins are abundant in natural biofilms. *Environ. Microbiol.* **9**, 3077–3090 (2007)
  49. Levine H.R.: Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Methods Enzymol.* **309**, 274–284 (1999)
  50. Liu S., Liu Y., Hao W., Wolf L., Kiliaan A.J., Penke B., Rübke C.E., Walter J., Heneka M.T., Hartmann T., Menger M.D., Fassbender K.: TLR2 is a primary receptor for Alzheimer's amyloid  $\beta$  peptide to trigger neuroinflammatory activation. *J. Immunol.* **188**, 1098–1107 (2012)

51. Liu Z., Niu H., Wu S., Huang R.: CsgD regulatory network in a bacterial trait-altering biofilm formation. *Emerg. Microbes Infect.* DOI: 10.1038/emi.2014
52. Macindoe I., Kwan A.H., Ren Q., Morris V.K., Yang W., Mackay J.P., Sunde M.: Self-assembly of functional, amphipathic amyloid monolayers by the fungal hydrophobin EAS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 804–811 (2012)
53. Mansan-Almeida R., Pereira A.L., Giugliano L.G.: Diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from children and adults constitute two different populations. *BMC Microbiol.* **13**, 22 (2013)
54. Marcoleta A., Marín M., Mercado G., Valpuesta J.M., Monasterio O., Lagos R.: Microcin e492 amyloid formation is retarded by posttranslational modification. *J. Bacteriol.* **195**, 3995–4004 (2013)
55. McCrate O.A., Zhou X., Cegelski L., Curcumin as an Amyloid-indicator Dye in *E. coli*. *Chem. Commun. (Camb)*. **49**, 4193–4195 (2013)
56. Moore R.A., Hayes S.F., Fischer E.R., Priola S.A.: Amyloid formation via supramolecular peptide assemblies. *Biochemistry*, **46**, 7079–7087 (2007)
57. Morris V.K., Ren Q., Macindoe I., Kwan A.H., Byrne N., Sunde M.: Recruitment of class I hydrophobins to the air:water interface initiates a multi-step process of functional amyloid formation. *J. Biol. Chem.* **286**, 15955–15963 (2011)
58. Naidoo N., Ramsugit S., Pillay M.: Mycobacterium tuberculosis pili (MTP), a putative biomarker for a tuberculosis diagnostic test. *Tuberculosis*, **94**, 338–345 (2014)
59. Nishimori J.H., Newman T.N., Oppong G.O., Rapsinski G.J., Yen J.H., Biesecker S.G., Wilson R.P., Butler B.P., Winter M.G., Tsois R.M., Ganea D., Tükel Ç.: Microbial amyloids induce interleukin 17A (IL-17A) and IL-22 responses via Toll-like receptor 2 activation in the intestinal mucosa. *Infect. Immun.* **80**, 4398–4408 (2012)
60. Nordstedt C., Näslund J., Tjernberg L.O., Karlström A.R., Thyberg J., Terenius L.: The Alzheimer A beta peptide develops protease resistance in association with its polymerization into fibrils. *J. Biol. Chem.* **269**, 30773–30776 (1994)
61. Norinder B.S., Köves B., Yadav M., Brauner A., Svanborg C.: Do *Escherichia coli* strains causing acute cystitis have a distinct virulence repertoire? *Microb. Pathog.* **52**, 10–16 (2012)
62. Oh J., Kim J.G., Jeon E., Yoo C.H., Moon J.S., Rhee S., Hwang I.: Amyloidogenesis of type III-dependent harpins from plant pathogenic bacteria. *J. Biol. Chem.* **282**, 13601–13609 (2007)
63. Oli M.W., Otoo H.N., Crowley P.J., Heim K.P., Nascimento M.M., Ramsook C.B., Lipke P.N., Brady L.J.: Functional amyloid formation by *Streptococcus mutans*. *Microbiology*, **158**, 2903–2916 (2012)
64. Olsén A., Herwald H., Wikström M., Persson K., Mattsson E., Björck L.: Identification of two protein-binding and functional regions of curli, a surface organelle and virulence determinant of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **277**, 34568–34572 (2002)
65. Olsén A., Herwald H., Wikström M., Persson K., Mattsson E., Björck L.: Identification of two protein-binding and functional regions of curli, a surface organelle and virulence determinant of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **277**, 34568–34572 (2002).
66. Olsén A., Jonsson A., Normark S.: Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature*, **338**, 652–655 (1989)
67. Olsén A., Wick M.J., Mörgelin M., Björck L.: Curli, fibrous surface proteins of *Escherichia coli*, interact with major histocompatibility complex class I molecules. *Infect. Immun.* **66**, 944–949 (1998)
68. Oppong G.O., Rapsinski G.J., Tursi S.A., Biesecker S.G., Klein-Szanto A.J.P., Goulian M., McCauley C., Healy C., Wilson R.P., Tükel C.: Biofilm-associated bacterial amyloids dampen inflammation in the gut: oral treatment with curli fibres reduces the severity of hapten-induced colitis in mice. *npj Biofilms and Microbiomes*, DOI:10.1038/npjbiofilms.2015.19
69. Osheroovich L.Z., Weissman J.S.: Multiple Gln/Asn-rich prion domains confer susceptibility to induction of the yeast [PSI(+)] prion. *Cell*, **106**, 183–194 (2001)
70. Otoo H.N., Lee K.G., Qiu W., Lipke P.N.: *Candida albicans* Als adhesins have conserved amyloid-forming sequences. *Eukaryot. Cell*. **7**, 776–782 (2008)
71. Pawar D.M., Rossman M.L., Chen J.L.: Role of curli fimbriae in mediating the cells of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to attach to abiotic surfaces. *J. Appl. Microbiol.* **99**, 418–425 (2005)
72. Perutz M.F., Finch J.T., Berriman J., Lesk A.: Amyloid fibers are water-filled nanotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 5591–5595 (2002)
73. Ramsugit S., Guma S., Pillay B., Jain P., Larsen M.H., Danaviah S., Pillay M.: Pili contribute to biofilm formation *in vitro* in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **104**, 725–735 (2013)
74. Ramsugit S., Pillay B., Pillay M.: Evaluation of the role of *Mycobacterium tuberculosis* pili (MTP) as an adhesin, invasin, and cytokine inducer of epithelial cells. *Braz. J. Infect. Dis.* **20**, 160–165 (2016)
75. Rapsinski G.J., Wynosky-Dolfi M.A., Oppong G.O., Tursi S.A., Wilson R.P., Brodsky I.E., Tükel Ç.: Toll-like receptor 2 and NLRP3 cooperate to recognize a functional bacterial amyloid, curli. *Infect. Immun.* **83**, 693–701 (2015)
76. Romero D., Aguilar C., Losick R., Kolter R.: Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 2230–2234 (2010)
77. Romero D., Vlamakis H., Losick R., Kolter R.: An accessory protein required for anchoring and assembly of amyloid fibers in *B. subtilis* biofilms. *Mol. Microbiol.* **80**, 1155–1168 (2011)
78. Romero D., Vlamakis H., Losick R., Kolter R.: Functional analysis of the accessory protein TapA in *Bacillus subtilis* amyloid fiber assembly. *J. Bacteriol.* **196**, 1505–1513 (2014)
79. Römling U., Rohde M., Olsén A., Normark S., Reinköster J.: AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella Typhimurium* regulates at least two independent pathways. *Mol. Microbiol.* **36**, 10–23 (2000)
80. Ryu J.H., Kim H., Frank J.F., Beuchat L.R.: Attachment and biofilm formation on stainless steel by *Escherichia coli* O157:H7 as affected by curli production. *Lett. Appl. Microbiol.* **39**, 359–362 (2004)
81. Schwartz K., Ganesan M., Payne D.E., Solomon M.J., Boles B.R.: Extracellular DNA facilitates the formation of functional amyloids in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Mol. Microbiol.* **99**, 123–134 (2016)
82. Schwartz K., Syed A.K., Stephenson R.E., Rickard A.H., Boles B.R.: Functional amyloids composed of phenol soluble modulus stabilize *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS Pathog.* **8**(6):e1002744 (2012)
83. Shahnawaz M., Soto C.: Microcin amyloid fibrils A are reservoir of toxic oligomeric species. *J. Biol. Chem.* **287**, 11665–11676 (2012)
84. Sheppard D.C., Yeaman M.R., Welch W.H., Phan Q.T., Fu Y., Ibrahim A.S., Filler S.G., Zhang M., Waring A.J., Edwards J.E. Jr.: Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **279**, 30480–30489 (2004)
85. Sipe J.D., Cohen A.S.: Review: history of the amyloid fibril. *J. Struct. Biol.* **130**, 88–98 (2000)
86. Sitaras C., Naghavi M., Herrington M.B.: Sodium dodecyl sulfate-agarose gel electrophoresis for the detection and isolation of amyloid curli fibers. *Anal. Biochem.* **408**, 328–331 (2011)

87. Smith J.F., Knowles T.P., Dobson C.M., Macphee C.E., Welland M.E.: Characterization of the nanoscale properties of individual amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 15806–15811 (2006)
88. Sobieszkańska B.M., Dobrowolska M.: Synteza fimbrii curli przez szczepy *Escherichia coli* izolowane z przypadków biegunek dziecięcych. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **56**, 239–244 (2005)
89. Stöver A.G., Driks A.: Secretion, localization, and antibacterial activity of TasA, a *Bacillus subtilis* spore-associated protein. *J. Bacteriol.* **181**, 1664–1672 (1999)
90. Syed A.K., Boles B.R.: Fold modulating function: bacterial toxins to functional amyloids. *Front. Microbiol.* **5**, 401 (2014)
91. Tükel C., Nishimori J.H., Wilson R.P., Winter M.G., Keestra A.M., van Putten J.P., Bäumlner A.J.: Toll-like receptors 1 and 2 cooperatively mediate immune responses to curli, a common amyloid from enterobacterial biofilms. *Cell. Microbiol.* **12**, 1495–1505 (2010)
92. Tükel C., Raffatellu M., Humphries A.D., Wilson R.P., Andrews-Polymeris H.L., Gull T., Figueiredo F., Wong M.H., Michelsen K.S., Akçelik M., Adams L.G., Bäumlner A.J.: CsgA is a pathogen-associated molecular pattern of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium that is recognized by Toll-like receptor 2. *Mol. Microbiol.* **58**, 289–304 (2005)
93. Uhlich G.A., Keen J.E., Elder R.O.: Mutations in the csgD promoter associated with variations in curli expression in certain strains of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2367–2370 (2001)
94. Vidal O., Longin R., Prigent-Combaret C., Dorel C., Hooreman M., Lejeune P.: Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new ompR allele that increases curli expression. *J. Bacteriol.* **180**, 2442–2449 (1998)
95. Wang X., Rochon M., Lamprokostopoulou A., Lünsdorf H., Nitz M., Römling U.: Impact of biofilm matrix components on interaction of commensal *Escherichia coli* with the gastrointestinal cell line HT-29. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2352–2363 (2006)
96. Westwell-Roper C., Ehses J.A., Verchere B.C.: Activation of Toll-like receptor 2 by islet amyloid polypeptide: a trigger for islet inflammation in type 2 diabetes? *Can. J. Diabetes*, **36**, S18 (2012)
97. Zhou Y., Smith D.R., Hufnagel D.A., Chapman M.R.: Experimental manipulation of the microbial functional amyloid called curli. *Methods Mol. Biol.* **966**, 53–75 (2013)
98. Zogaj X., Bokranz W., Nitz M., Römling U.: Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family *Enterobacteriaceae* isolated from the human gastrointestinal tract. *Infect Immun.* **71**, 4151–4158 (2003)

Seweryn Mucha<sup>1,2</sup>, Mateusz Berezowski<sup>1,2</sup>, Katarzyna Markowska<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Zakład Genetyki i Fizjologii Komórki, Instytut Biologii Eksperymentalnej,  
Uniwersytet Wrocławski

<sup>2</sup>Wkład tych autorów jest równorzędny

Wpłynęło w lipcu 2016 r.

Zaakceptowano we wrześniu 2016 r.

1. Wstęp. 2. Właściwości chemiczne i występowanie arsenu w środowisku. 3. Sposoby wnikania arsenu do komórek. 4. Mechanizmy toksycznego działania arsenu trójwartościowego. 4.1. Stres oksydacyjny. 4.2. Wiązanie z białkami. 4.3. Agregacja białek. 5. Toksyczność pięciowartościowego arsenu. 6. Mechanizmy detoksykacji komórek ze związków arsenu. 6.1. Operony *ars*. 6.2. Geny *ACR*. 6.3. Usuwanie koniugatów arsenu przez pierwotne transportery ABC. 6.4. Dwukierunkowy transport arsenu. 7. Podsumowanie

### Mechanisms of arsenic toxicity and transport in microorganisms

**Abstract:** Arsenic is an ubiquitous element present in the environment either through geological or anthropogenic activities. Millions of people all over the world are exposed to arsenic mainly via air, drinking water and food sources, which results in higher incidence of cancer. Several mechanisms by which arsenic compounds induce tumorigenesis have been proposed. Arsenic mediates its toxicity by generating oxidative stress, inducing protein misfolding, promoting genotoxicity, hampering DNA repair and disrupting signal transduction. Thus, all organisms have developed multiple pathways for arsenic detoxification. In this article, we review recent advances in the understanding of arsenic toxicity and its transport routes in prokaryotes and eukaryotes, including a dual role of aquaglyceroporins in the uptake and efflux, active transport out of the cell via secondary ion pumps and sequestration of metalloid-thiol conjugates into vacuoles by primary ABC transporters. We believe that such studies are of high importance due to the increasing usage of arsenic-based drugs in the treatment of certain types of cancer and diseases caused by protozoan parasites as well as for the development of bio- and phytoremediation strategies for metalloid-polluted areas.

1. Introduction. 2. The chemical properties and the presence of arsenic in the environment. 3. Pathways for arsenic uptake. 4. Mechanism of trivalent arsenic toxicity. 4.1. Oxidative stress. 4.2. Arsenic binding to proteins. 4.3. Protein aggregation. 5. Pentavalent arsenic toxicity. 6. Cellular detoxification mechanisms of arsenic compounds. 6.1. *ars* operons. 6.2. *ACR* genes. 6.3. Removal of arsenic conjugates by the ABC transporters. 6.4. Bi-directional transport of arsenic. 7. Summary

**Słowa kluczowe:** arsen, toksyczność, transport, wnikanie

**Key words:** arsenic, toxicity, transport, uptake

## 1. Wstęp

Arsen, którego związki są szeroko rozpowszechnione w środowisku naturalnym, działa silnie toksycznie na organizmy żywe, a Międzynarodowa Agencja Badań nad Nowotworami (IARC – International Agency for Research on Cancer) klasyfikuje ten metaloid w pierwszej grupie czynników rakotwórczych [40]. Zanieczyszczenie wody, gleby i powietrza związkami arsenu pochodzenia naturalnego i antropogenicznego stanowi poważny problem w wielu rejonach świata, zwłaszcza Azji Południowej i Południowo-Wschodniej, Ameryce Południowej, Stanach Zjednoczonych, Kanadzie, a także kilku krajach europejskich [13, 36, 63]. Według szacunków Światowej Organizacji Zdrowia (WHO – World Health Organization) ponad 100 mln ludzi każdego dnia może przyjmować pożywienie i wodę zawierającą arsen w ilości większej niż uznawana za bezpieczną normę 10 µg/l [86]. Skutki przewlekłej

ekspozycji na arsen, przy dużym, genetycznym zróżnicowaniu tolerancji osobniczej, zależą od wielu czynników, choć głównie od dawki, czasu, źródła, postaci i drogi w jakiej pierwiastek ten został przyswojony [8, 24]. Mogą one mieć charakter przemijających schorzeń lub trwałych uszkodzeń (arsenikozy) i występują zwykle po kilku latach. Sam długotrwały kontakt z pyłem arsenowym może wywołać kilkanaście odmian raka skóry i płuc, natomiast spożywanie skontaminowanej żywności może przyczyniać się do rozwoju nowotworów różnych narządów, głównie jednak wątroby, nerek i pęcherza moczowego [14, 86].

Pomimo wysoce toksycznych i karcinogennych właściwości związki arsenu wykorzystywane były w lecznictwie od wieków. Także współcześnie preparaty zawierające ten pierwiastek są ważnym elementem nowoczesnej chemioterapii przeciwnowotworowej. Dobrym przykładem jest trójtlenek arsenu, będący aktywnym składnikiem środka o handlowej nazwie Trisenox

\* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki i Fizjologii Komórki, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Uniwersytet Wrocławski, ul. Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław, tel.: 71 3754102, e-mail: katarzyna.markowska@uwr.edu.pl



(Cephalon) stosowanego w leczeniu ostrej białaczki promielocytowej (APL – Acute Promyelocytic Leukemia) [3, 27]. Aktualnie prowadzonych jest lub zakończono szereg badań klinicznych nad użytecznością arseniku w leczeniu innych nowotworów krwi, jak również guzów litych [1, 74]. Z kolei chemioterapeutyki oparte na pokrewnym metaloidzie – antymonie (Pentostam, GlaxoSmithKline i Glucantim, Sanofi-Aventis) są nadal podstawą w terapii leiszmaniozy (czarna febra) [31], a lek zawierający w swym składzie melarsoprol (Arsobal, Mel B, Melarsen Oxide-BAL), przed zastosowaniem eflornityny, był jedynym lekiem podawanym w drugim, neurologicznym stadium trypanosomatozy (śpiączka afrykańska) [5].

Niestety pomimo niewątpliwych sukcesów w przypadku leczenia APL, terapia arsenem bywa nieskuteczna w innych rodzajach nowotworów. Wywołanie efektu indukowanej apoptozy wymaga zastosowania wyższych dawek leku, które są już toksyczne dla pacjentów. Prawdopodobnie związane jest to z uaktywnieniem się w komórkach nowotworowych specyficznej, choć dotąd niewyjaśnionej oporności na arsen. Zjawisko oporności na związki antymonu powszechnie występuje także u pierwotniaków, co stanowi poważny problem medyczny, gdyż nie ma alternatywnych metod leczenia tych często śmiertelnych chorób. Zrozumienie molekularnych mechanizmów oporności komórek eukariotycznych na arsen i antymon jest zatem niezbędne do opracowania skuteczniejszych metod terapeutycznych. Z drugiej strony, z powodu znacznej szkodliwości związków arsenu dla zdrowia ludzkiego, bardzo istotne staje się także dokładne poznanie podstaw toksycznego działania tego metaloidu, co obecnie stanowi cel badań wielu ośrodków naukowych na całym świecie.

## 2. Właściwości chemiczne i występowanie arsenu w środowisku

Arsen jest pierwiastkiem chemicznym o właściwościach metaloidu / półmetal, który w związkach może występować na czterech stopniach utlenienia:  $-3$ ,  $0$ ,  $+3$  i  $+5$ , przy czym dwie ostatnie jego formy są najczęściej spotykane w środowisku i obecne w organizmach żywych. Arsen nieorganiczny w postaci arsenków i arsenianów zarówno metali jak i niemetalów wchodzi w skład licznych minerałów (np. lelingit ( $\text{FeAs}_2$ )). Często towarzyszy także siarczkom i złożom siarczkowym innych metali (np. realgar ( $\text{AsS}$ ), kobaltyn ( $\text{CoAsS}$ )). Trójtlenek diarsenu ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ), znany jako arsenik, w formie stałej występuje pod postacią minerałów: arsenolitu i kładetytu. W wodzie i glebie, w zależności od pH i potencjału redukcyjnego, dominują obojętne lub zdysocjowane jony kwasu arsenawego ( $\text{H}_3\text{AsO}_3$ ,  $\text{As}(\text{OH})_3$ ) i arsenowego ( $\text{H}_3\text{AsO}_4$ ,  $\text{AsO}(\text{OH})_3$ ). Trójwartościowe

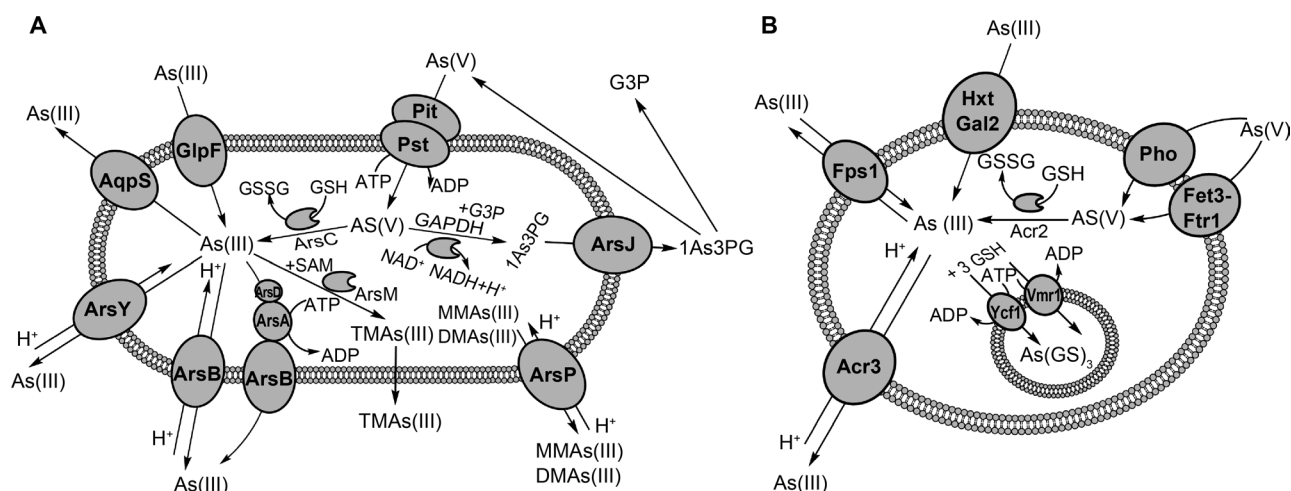
związki arsenu przeważają w warunkach beztlenowych, redukujących (np. skały, muły rzeczne), natomiast pięciowartościowe w warunkach tlenowych (np. gleba, wody powierzchniowe) [71].

Głównym rezerwuarem arsenu jest litosfera, skąd uwalniany jest do biosfery przede wszystkim podczas erupcji wulkanów, aktywności geotermalnej i ługowania przez wodę ze skał osadowych i magmowych. Również działalność antropogeniczna znacząco przyczynia się do zanieczyszczenia środowiska naturalnego związkami arsenu. Do ich emisji dochodzi głównie w wyniku procesów wydobywania i hutnictwa rud metali nieżelaznych, spalania paliw kopalnianych oraz stosowania w rolnictwie i hodowli zwierząt gospodarskich nawozów, pestycydów i środków wspomagających wzrost zawierających ten pierwiastek [43, 70, 71].

W komórkach organizmów żywych nieorganiczne związki arsenu mogą ulegać biotransformacji (np. metylacji, kompleksowaniu z glutationem) do form organicznych, będących ubocznymi produktami przemiany materii (np. metylowane formy kwasów nieorganicznych, trimetyloarsyna) lub tworzyć arsenowe analogi biocząsteczek (np. arsenobetaina, arsenocholina, arsenolipidy, arsenocukry), które następnie wbudowywane są w różne struktury komórkowe lub włączane w różnorodne szlaki metaboliczne [98, 104].

## 3. Sposoby wnikania arsenu do komórek

Związki arsenu wykazują podobieństwo strukturalne do kilku niezbędnych komórce substancji, dlatego na zasadzie mimikry molekularnej mają zdolność pokonywania bariery błony komórkowej i akumulacji we wnętrzu komórki. W roztworze wodnym o pH zbliżonym do obojętnej arsen nieorganiczny na  $+3$  stopniu utlenienia ( $\text{As}(\text{III})$ ) występuje głównie w postaci pozbawionej ładunku cząsteczki kwasu arsenawego ( $\text{As}(\text{OH})_3$ ) o silnie amfipatycznym charakterze, w którym część zawierająca atom As jest silnie hydrofobowa, natomiast ta z grupami hydroksylowymi ( $-\text{OH}$ ) hydrofilowa. Związek ten posiada konformację podobną do glicerolu, dlatego też u wszystkich organizmów wnika do wnętrza komórki zgodnie z gradientem stężeń przez akwagliceroporyny. U bakterii *Escherichia coli* kanałem glicerolowym umożliwiającym przenikanie  $\text{As}(\text{OH})_3$  (i  $\text{Sb}(\text{OH})_3$ ) jest GlpF (Rys. 1A). U drożdży *Saccharomyces cerevisiae* za pobór do komórki metaloidów w tej formie odpowiada głównie akwagliceroporyna Fps1 (Rys. 1B). Z kolei u pasożytniczych pierwotniaków *Leishmania major* i *L. tarentolae* oraz ludzi są to odpowiednio białka AQP1 oraz AQP7. W warunkach niedoboru glukozy  $\text{As}(\text{III})$  może być także pobierany do komórek drożdży poprzez permeazy heksozowe Hxt1-Hxt17 i Gal2 (Rys. 1B). Arsen nieorganiczny



Rys. 1. Mechanizmy akumulacji i detoksykacji komórek ze związków arsenu

Zarówno u bakterii *E. coli* (A), jak i drożdży *S. cerevisiae* (B) As(III) wnika do komórek zgodnie z gradientem stężeń poprzez akwagliceroporyny. Jeżeli wewnątrzkomórkowe stężenie As(III) jest większe niż w środowisku zewnętrznym, akwagliceroporyny mogą pełnić także funkcje detoksykacyjne transportując nieorganiczny arsen na zewnątrz komórki. U drożdży (B), w warunkach niedoboru glukozy, As(III) może być także pobierany przez transportery heksozowe. U obu organizmów As(V) jest transportowany do komórek przez permeazy fosforanowe, a u drożdży (B) także przez żelazowe, po czym w cytoplazmie ulega enzymatycznej redukcji do As(III) w reakcji katalizowanej przez reduktazy arsenianowe. U bakterii (A) As(V) może również być modyfikowany przez dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego do 1-arseno 3-fosfoglicerynianu (1As3PGA) i w tej formie usuwany na zewnątrz komórki przez białko ArsJ. Po redukcji As(III) może utworzyć u drożdży (B) kompleks z glutationem i zostać przeniesiony do wakuoli dzięki aktywności niespecyficznego transportera typu ABC. U bakterii (A) i drożdży (B) As(III) usuwany jest jednak z komórki wbrew gradientowi stężeń głównie dzięki aktywności zlokalizowanego w błonie komórkowej specyficznego antyportera ArsY/Acr3. U bakterii (A) występuje także pompa arsenowa ArsAB, aktywnie wyrzucająca As(III) z cytoplazmy dzięki hydrolizie ATP, której składnik ArsB może funkcjonować samodzielnie jako transporter wtórny. W komórkach bakterii (A) As(III) często ulega metylacji przez metylotransferazę arsenową przy udziale S-adenozylometioniny. Bakterie (A) posiadają specyficzny dla trójwartościowych, metylowanych form arsenu transporter ArsP. Poza tym lotna trimetyloarsyna może u nich dyfundować bezpośrednio przez błonę komórkową. Komórki przedstawiono schematycznie [56, zmod.].

na +5 stopniu utlenienia (As(V)) występuje w środowisku wodnym o neutralnym pH głównie w postaci oksyanionu  $H_2AsO_4^-$ , który swoimi właściwościami chemicznymi przypomina jon fosforanowy  $H_2PO_4^-$  i u wszystkich organizmów może być substratem dla transporterów fosforanowych. U bakterii *E. coli* występują dwa rodzaje takich transporterów, Pit i Pst, i oba mogą katalizować pobieranie As(V). U drożdży wnikanie jonu  $H_2AsO_4^-$  do komórki umożliwiają białka Pho84 i Pho87, będące składowymi transportera fosforanowego (Rys. 1), natomiast u kręgowców permeaza NaPiIIb [56, 95]. Badania wskazują również, że za akumulację kwasu arsenowego w komórkach *S. cerevisiae* może być także odpowiedzialny białkowy kompleks Fet3-Ftr1, umożliwiający transport żelaza [6].

#### 4. Mechanizmy toksycznego działania arsenu trójwartościowego

W komórkach związku arsenu trójwartościowego odznaczają się toksycznością o rozległym spektrum działania. Sprowadza się ona m.in. do zaburzenia procesu fałdowania białek, co może skutkować nieprawidłowym działaniem wrzeczona podziałowego. Prowadzi to w efekcie do wadliwej segregacji chromatyd, co z kolei indukuje powstawanie komórek z aberracjami

chromosomowymi. Poza tym szeroko opisana jest zdolność metaloidu do generowania w komórkach stresu oksydacyjnego, który może prowadzić do modyfikacji zasad azotowych. Znamienny jest również potencjał arsenu do hamowania aktywności białek mających znaczenie w naprawie DNA. Może to w efekcie wywoływać poważne uszkodzenia DNA, skutkujące anomaliami takimi jak fuzje końców chromosomów. Dodatkowo, wpływając na epigenetyczne mechanizmy kontroli ekspresji genów, oddziałując na długość telomerów, rozregulowując punkty kontrolne cyklu komórkowego, arsen może wzmagać w komórkach narastającą niestabilność genomową i w rezultacie przekierowywać je na drogę transformacji nowotworowej [8, 14].

##### 4.1. Stres oksydacyjny

Toksyczność trójwartościowych związków arsenu w dużej mierze wynika z ich zdolności do indukowania stresu oksydacyjnego. Wykazano, że w komórkach ludzkich generują one powstawanie dużych ilości reaktywnych form tlenu (ROS – Reactive Oxygen Species) [30], do czego dochodzi m. in. dzięki ich potencjałowi do przerywania ciągłości zewnętrznej błony mitochondrialnej, co w konsekwencji skutkuje „ucieczką” wolnych rodników [35]. Uszkodzone w ten sposób

organelle są, w warunkach fizjologicznych, eliminowane na drodze autofagocytozy, aby chronić komórki przed toksycznymi efektami stresu oksydacyjnego. Ponieważ jednak As(III) ma zdolność do hamowania samego procesu autofagocytozy, prawdopodobnie przez blokowanie fuzji autofagosomów z lizosomami, nasila w konsekwencji negatywne skutki powodowane akumulacją ROS [46, 66]. Kolejnym mechanizmem, prowadzącym do wzrastania w komórkach poziomu ROS, jest stymulowanie przez As(III) oksydazy NAD(P)H, generującej wolne rodniki [23], a hamowanie katalazy i dysmutazy nadtlenkowej, czyli enzymów o funkcjach antyoksydacyjnych [30]. Poza tym metaloid ten jest zdolny do tworzenia koniugatów z dużymi ilościami wolnego glutationu, które usuwane są następnie do wakuoli lub poza obręb komórki. Proces ten prowadzi do „neutralizacji” toksycznego pierwiastka, ale skutkuje jednocześnie obniżeniem puli dostępnego antyoksydantu, powodując w efekcie zmniejszenie tolerancji komórek na stres oksydacyjny [29].

Generowane działaniem związków arsenu ROS ulegają w komórce akumulacji, co skutkuje powstawaniem szeregu uszkodzeń. W takich warunkach dochodzi może do naruszania struktury DNA, m.in. poprzez wywoływanie chemicznych modyfikacji zasad azotowych (np. formowanie 8-hydroksy-2’deoksyguanozyny (8-OHdG)), które w efekcie prowadzić mogą do podstawień nukleotydów. Oprócz tego ROS przyczyniają się do powstawania miejsc apurynowych i apirymidynowych, mogących skutkować delecjami nukleotydów, a także kowalencyjnych wiązań między białkami i DNA, czy też jednoniciowych pęknięć DNA [41]. Należy również zaznaczyć, że u drożdży *S. cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe* nieorganiczny As(III) nie zwiększa istotnie produkcji ROS i powoduje niski poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Wykazano natomiast, że arsen może, prawdopodobnie w sposób bezpośredni, a nie tylko pośredni w wyniku wywoływania stresu oksydacyjnego, niezależnie także od replikacji i transkrypcji, indukować dwuniciowe złamania DNA we wszystkich fazach cyklu komórkowego [49].

Podczas powodowanego arsenem stresu oksydacyjnego uszkodzeniu ulegają również białka, zwłaszcza te bogate w cysteinę. Dzieje się tak, ponieważ obecna w reszcie tego aminokwasu grupa tiolowa (-SH) stanowi główne miejsce, które może być kowalencyjnie modyfikowane przez ROS. Utlenienie reszt cysteiny może powodować modyfikację centrum aktywnego i zmiany konformacyjne enzymów, co prowadzi do zaburzeń, a nawet utraty ich funkcji, zakłócając prawidłowy przebieg wielu procesów fizjologicznych [83]. Szczególnie wrażliwe na zmiany potencjału redoks są białka, w których strukturze występuje motyw palca cynkowego. Pełnią one zasadniczą rolę w komórce, zwłaszcza w procesach transkrypcji i naprawy DNA.

Podczas oksydacyjnych modyfikacji grup tiolowych cystein, tworzących miejsce wiązania cynku, dochodzi do jego uwolnienia i w rezultacie całkowitej dezaktywacji enzymów [44].

#### 4.2. Wiązanie z białkami

Kolejną przyczyną toksyczności związków arsenu jest ich silne powinowactwo do obecnej w reszcie cysteiny grupy tiolowej, która stanowi potencjalne miejsce wiązania arsenu w białkach. Badania wskazują, że As(III) silnie wiąże się z białkami zawierającymi w centrach aktywnych więcej niż jedną grupę tiolową, a jedna cząsteczka As(OH)<sub>3</sub> może formować trójkątne, stożkowe koordynaty białkowe, angażując w wiązanie aż trzy cysteiny jednocześnie [100]. Powstające wiązania As-S odpowiadają za zmiany konformacji, aktywności i/lub interakcji z innymi cząsteczkami różnych enzymów czy transporterów jonowych. Szczególnie niebezpieczne są interakcje arsenu z białkami biorącymi udział w naprawie DNA. Wykazano, że podczas ekspozycji na ten pierwiastek inhibicji ulegają białka kluczowe dla naprawy przez wycinanie zasad (np. ligaza DNA I) oraz naprawy przez wycinanie nukleotydów (np. XPA), jak również uczestnicząca w wielu innych procesach komórkowych polimeraza poli(ADP-rybozy) (PARP-1) [73]. W przypadku białek z motywem palca cynkowego zaproponowano, że As(III) selektywnie wiąże się tylko z tymi, które w miejscu wiązania cynku zawierają trzy lub cztery reszty cysteiny. Wyparcie atomu cynku i zastąpienie go atomem arsenu w specyficzny sposób narusza i uwrażliwia te białka na uszkodzenia powodowane oksydacją przez reaktywne formy tlenu. Dzieje się tak dlatego, że pozbawione ochrony ze strony cynku reszty cysteiny stają się wrażliwe na działanie ROS, podczas którego dochodzi również do uwolnienia metaloidu. Odtworzona w ten sposób cząsteczka As(III) może wchodzić w reakcje z kolejnymi białkami rozpoczynając cykl od nowa [100, 103]. Arsen działa szkodliwie także poprzez interakcje z wieloma białkami nieuczestniczącymi w naprawie DNA. Na przykład, wiązanie się As(III) do dehydrogenazy pirogronianowej znacząco zmniejsza wewnątrzkomórkowe stężenie ATP [7], do reduktazy tioredoksynowej zaburza równowagę redoks w komórce [84], natomiast do syntazy NO obniża ilość bioaktywnego tlenu azotu [75].

#### 4.3. Agregacja białek

Do indukowanych działaniem arsenu zaburzeń w trakcie fałdowania białek dochodzi na drodze dwóch mechanizmów. Po pierwsze, metaloid zakłóca osiągnięcie prawidłowej konformacji nowo syntezowanych białek już w trakcie ich translacji poprzez oddziaływanie na jeszcze niesfałdowane segmenty łańcucha

polipeptydowego. Po drugie, bezpośrednio hamuje aktywność białek chaperonowych, prawdopodobnie przez wywoływanie ich agregacji, bezpośrednie wiązanie się, bądź modyfikowanie ich reszt cysteinowych. Oba te mechanizmy prowadzą do zaburzeń w przyjmowaniu przez nowopowstające białka natywnej struktury przestrzennej. Z kolei nieprawidłowo sfałdowane białka ulegają skupieniu tworząc agregaty zdolne do indukowania takiego samego procesu u kolejnych podatnych na to protein, wpływając w ten sposób negatywnie na żywotność komórek [76]. U drożdży piekarniczych znaleziono 143 białka agregujące w wyniku ekspozycji na As(III). Zidentyfikowano także kilka ludzkich homologów białek drożdżowych, które u tego organizmu modelowego najczęściej tworzą agregaty podczas stresu arsenowego. Białka te u ludzi powiązane są z chorobami neurodegeneracyjnymi, np. chorobą Alzheimera czy chorobą Parkinsona, u podłoża których również leżą zaburzenia prawidłowej konformacji, agregacja i ko-agregacja z innymi białkami „niechorobotwórczymi”. Sugeruje to istnienie podobnego mechanizmu agregacji białek u drożdży i ludzi [38]. Ponadto badania wykonane na komórkach *S. cerevisiae* pokazują, że As(III) może dezintegrować cytoszkielet poprzez hamowanie aktywności kompleksu białek opiekuńczych TRiC (TCP1-Ring Complex), który zapewnia prawidłowe fałdowanie nowopowstałych cząsteczek aktyny i tubuliny. Wykazano, że As(III) inhibuje aktywność tego kompleksu, co powoduje, że w komórce pojawiają się niefunkcjonalne, toksyczne białka o nieprawidłowej konformacji. Wynikiem tych zaburzeń jest m.in. źle wykształcone wrzeciono podziałowe, mogące być przyczyną nierównocennego podziału chromosomów [65]. Jednakże, jak wykazano w badaniach na komórkach ludzkich, As(III) ma także zdolność do inhibicji tworzenia wrzeciona podziałowego poprzez bezpośrednie wiązanie się do  $\beta$ -tubuliny, co uniemożliwia polimeryzację pojedynczych cząsteczek tego białka we włókna tubulinowe [8, 101].

## 5. Toksyczność pięciowartościowego arsenu

Toksyczność arsenu pięciowartościowego związana jest z chemicznym podobieństwem jonów arsenianowych ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ) do jonów fosforanowych ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), z którymi współzawodniczą w reakcjach energetycznych. Arsenian może podczas glikolizy łączyć się wiązaniem estrowym z cząsteczką glukozy tworząc wysoce niestabilny i ulegający szybkiej hydrolizie glukozo-6-arsenian. Z kolei w mitochondriach, podczas cyklu Krebsa i fosforylacji oksydacyjnej, z części ADP syntetyzowany może być arsenian adenozy-5-difosforanu. Hamowane są także enzymy uczestniczące w procesie oddychania (np. dehydrogenaza glukozo-6-fosfo-

ranu). Wszystko to powoduje rozprzęgnięcie produkcji ATP, a w konsekwencji wyczerpanie komórkowych zasobów energii [37].

## 6. Mechanizmy detoksykacji komórek ze związków arsenu

Obecność arsenu w toksycznym stężeniu towarzyszy życiu na Ziemi od jego początków. Spowodowało to wystąpienie silnej presji selekcyjnej sprzyjającej wytworzeniu mechanizmów detoksykacji komórek, bez których organizmy żywe nie mogłyby przetrwać [104]. Generalnie detoksykacja komórek ze związków arsenu polega na ograniczeniu ich wnikania lub na zwiększeniu ich usuwania z cytoplazmy, bądź też na biotransformacji do mniej toksycznych form. Najwyższy poziom oporności, zarówno komórki prokariotyczne jak i eukariotyczne, osiągają dzięki aktywnemu transportowi arsenu do wakuoli lub wyrzutowi na zewnątrz błony komórkowej przez specyficzne dla tego metaloidu transportery [68] (Rys. 1). U prokariotów wyewoluowały trzy niezależne od siebie drogi usuwania trójwartościowych związków arsenu: ArsB i Acr3/ArsY dla form nieorganicznych oraz ArsP dla form organicznych. Koegzystencja trzech rodzajów transporterów arsenowych o różnej specyficzności substratowej mogła wytworzyć się z powodu wzrostu złożoności związków arsenu w środowisku [97]. Zmiana charakteru środowiska na utleniający doprowadziła natomiast do powstania mechanizmów oporności na As(V), opierających się głównie na redukcji do As(III) dzięki aktywności reduktazy arsenianowej ArsC, ale również polegających na jego bezpośrednim usuwaniu z komórek przez białko ArsJ [22] (Rys. 1A).

### 6.1. Operony *ars*

Geny oporności na arsen znaleziono w niemal wszystkich zsekwencjonowanych genomach bakterijskich. Występowanie tych genów u współcześnie żyjących mikroorganizmów świadczy o tym, iż presja wywołana powszechnością arsenu w środowisku jest nadal silna [96]. Wysoki poziom oporności na arsen komórek prokariotycznych warunkowany jest obecnością operonu arsenowego *ars*, zlokalizowanego na plazmidach lub chromosomach bakterii gram-dodatnich i gram-ujemnych. Zidentyfikowany jako pierwszy operon *ars* na plazmidzie R773 [19] i R46 [12] z *E. coli* składa się z pięciu genów: *arsR*, *arsD*, *arsA*, *arsB* i *arsC*, natomiast chromosomowa wersja operonu *ars* z *E. coli* zawiera tylko trzy geny: *arsR*, *arsB* i *arsC*, które warunkują oporność na znacznie niższe stężenia arsenu w porównaniu z wersją plazmidową [16]. Podobnie plazmidy pI258 i pSX267 z gram-dodatnich bak-

terii *Staphylococcus aureus* [42] i *Staphylococcus xylosum* [69] zawierają operon *ars* złożony tylko z trzech genów: *arsR*, *arsB* i *arsC*.

Produkty podstawowych genów operonu *arsRDABC*: *arsA* i *arsB* tworzą pompę arsenową zależną od ATP [25, 26]. Oporność na arsen pięciowartościowy wymaga głównie obecności produktu genu *arsC*, w celu redukcji arsenianu do arseninu, który następnie usuwany jest z komórki przez pompę ArsAB [34]. Gen *arsR* koduje represor transkrypcji operonu *ars* [88], a białko ArsD pełni funkcję „metalochaperonu” odpowiedzialnego za wychwytywanie i dostarczanie As(III) do pompy ArsAB [48] (Rys. 1A).

Główną podjednostką pompy ArsAB stanowi należąca do nadrodziny MFS (Major Facilitator Superfamily) białko ArsB, które posiada 12 regionów transbłonowych i zlokalizowane jest w błonie komórkowej, gdzie tworzy kanał dla usuwania arsenu i antymonu z komórki, a także jest miejscem przyłączenia do błony homodimeru podjednostki katalitycznej ArsA, zawierającej konserwatywne sekwencje wiązania ATP i wykazującej aktywność ATPazową indukowaną arseninem i antymoninem [67, 81, 89]. Komórki posiadające funkcjonalny kompleks ArsAB wymagają do usuwania metaloidu energii chemicznej z hydrolizy ATP [25, 26]. Przy braku podjednostki ArsA, jak ma to miejsce w przypadku chromosomowej kopii operonu *ars* u *E. coli* oraz trójgenowego operonu *ars* na plazmidzie u *S. aureus*, białko ArsB katalizuje transport arseninu i antymoninu z użyciem energii elektrochemicznej potencjału błonowego na zasadzie antyportu  $\text{As}(\text{OH})_3/\text{H}^+$  i  $\text{Sb}(\text{OH})_3/\text{H}^+$ , wykazując większe powinowactwo do Sb(III) [45, 59] (Rys. 1A).

Inną permeazą warunkującą oporność na nieorganiczny As(III) jest ArsY/Acr3. Gen kodujący ten transporter, będący składową operonu *ars* złożonego z czterech genów: *arsR*, ORF2 o nieznannej funkcji, *arsY*/*acr3* oraz *arsC*, wykryto po raz pierwszy w obrębie elementu *skin* (for *sigK* intervening) u *Bacillus subtilis* [72]. Białko ArsY/Acr3 posiada 10 segmentów transmembranowych. Jest wtórnym antyporterem metaloidów o dużym powinowactwie do arsenu. Do działania wykorzystuje siłę protomotoryczną pochodzącą z utleniania NADH [82]. Wersje operonu *ars* z genem kodującym białko ArsY/Acr3 są znacznie bardziej rozpowszechnione w genomach bakterii niż operony zawierające *arsB*. Znamienne jest również, że geny *arsY/acr3* i *arsB* nigdy nie występują razem w jednym operonie [97]. Transporter ArsY, podobnie jak ArsB, może łączyć się z białkiem ArsA tworząc kompleks ArsAY, który zwiększa wydajność usuwania arsenu [17, 33, 102]. W komórkach eukariotycznych homologiem białka ArsY jest Acr3, który pełni analogiczną funkcję transportera nieorganicznych form trójwartościowego arsenu [56].

Chociaż permeazy ArsB i ArsY/Acr3 są najczęściej spotykanymi transporterami arsenowymi u bakterii, jakiś czas temu pojawiły się doniesienia o szczepach *Campylobacter jejuni* posiadających chromosomową wersję operonu *arsPRCY*. W skład tego operonu wchodzi między innymi gen kodujący nowy rodzaj błonowego transportera ArsP specyficznego względem związków arsenoorganicznych na +3 stopniu utlenienia i warunkującego oporność na kwas monometyloarsonawy (MMAs(III)), który wydaje się być preferowanym, fizjologicznym substratem dla tej permeazy, oraz w mniejszym stopniu na syntetyczne, aromatyczne związki arsenu [21]. Od tamtej pory obecność wysoce konserwatywnych pod względem topologii homologów ArsP stwierdzono u wielu gatunków bakterii i archeonów, przy czym często współwystępują one z transporterami ArsB lub ArsY [97]. ArsP jest antyporterem transportującym MMAs(III) w sprzężeniu z elektrochemicznym gradientem protonów pochodzącym z utleniania NADH [21]. Zaznaczyć należy, że obecność ArsP jest wystarczająca do nadawania komórkom oporności na trójwartościowe formy arsenu organicznego o czym świadczy także fakt, że gen *arsP* może występować niezależnie od *arsC* i *acr3/arsY* oraz *arsB* [64] (Rys. 1A).

Najnowsze badania operonów *ars* u różnych gatunków bakterii dostarczyły informacji o genach kodujących białka pełniące istotne role w nadawaniu oporności na arsen. Jednym z nowo opisanych genów jest *arsH* kodujący oksydazę ArsH utleniającą trójwartościowe, metylowane i aromatyczne związki arsenu do mniej toksycznych form pięciowartościowych [20]. Innym ważnym elementem operonów *ars* jest gen *arsI*, który koduje liazę ArsI odpowiedzialną za demetylację m.in. wysoce toksycznego kwasu monometyloarsonawego (MMAs(III)) do As(III), ale także degradację aromatycznych związków arsenoorganicznych dzięki zdolności do przecinania wiązań C-As [99]. Opisano również metylotransferazę arsenową ArsM, która nadaje komórkom bakteryjnym oporność na As(III) poprzez jego metylację do mniej szkodliwego kwasu dimetyloarsynowego (DMAs(V)) oraz lotnej trimetyloarsyny (TMAs(III)) [2]. Natomiast produkt aktywności genu *arsN*, N-acetylotransferaza ArsN warunkuje zwiększoną oporność na As(V) poprzez przyczynianie się do zwiększenia stężenia w komórce zredukowanego koenzymu A (CoASH) przez co może pomagać w utrzymaniu równowagi redoks podczas redukcji arsenianu, gdy zmniejszeniu ulegają zasoby glutationu (GSH) [18].

Dotychczas opisane mechanizmy detoksykacji z arsenianu polegają głównie na jego redukcji przez ArsC do około dziesięć razy bardziej toksycznego dla komórek arseninu. Taka strategia wydaje się nielogiczna, jednak należy wziąć pod uwagę fakt występowania

w biosferze głównie zredukowanego As(III) w czasie kształtowania się, w drodze ewolucji, mechanizmów oporności na arsen. Gdy środowisko zmieniało swój charakter na utleniający przeważać zaczął As(V), pojawiła się presja, w wyniku działania której komórki nabyły zdolność do redukcji arsenianu i usuwania arseninu ukształtowanymi już drogami. Jednak system bezpośredniego usuwania As(V) mógłby nieść ważne korzyści dla komórek, pozwalając zaoszczędzić energię wydatkowaną na redukcję i biotransformację arsenianu, nie skutkując pojawieniem się w komórce znacznie bardziej toksycznych form arsenu na trzecim stopniu utlenienia [22].

Analizy operonu *arsRCYH-dsp-gapdh-J* u *Pseudomonas aeruginosa* DK2 wykazały obecność dwóch sąsiadujących genów: *gapdh* kodującego dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego oraz *arsJ* kodującego 410-aminokwasowy, potencjalny transporter MSF, zlokalizowany w błonie komórkowej i posiadający prawdopodobnie 10 regionów transbłonowych. Taki układ genów występuje również w operonach *ars* innych gatunków bakterii takich jak: *Shewanella putrefaciens* 200, *Aeromonas media*, *Marinimicrobium agarilyticum*, *Bermanella marisrubri*, *Oceanimonas* sp. GK1, *Marinobacter daepoensis*. Badania aktywności genów *gapdh* i *arsJ* wykazały, że zwiększają one oporność komórek na As(V), nie zmniejszając wrażliwości na As(III). Komórki bakteryjne ekspresujące *arsJ* są zdolne do usuwania As(V) tylko w obecności dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH). Wyniki te pozwoliły zaproponować model, w którym GAPDH katalizuje reakcję arsenylacji aldehydu 3-fosfoglicerynowego (G3P), co doprowadza do powstania 1-arseno 3-fosfoglicerynianu (1As3PGA), który jest usuwany z cytoplazmy przez permeazę ArsJ [22] (Rys. 1A). To pierwszy i jak na razie jedyny zaproponowany mechanizm detoksykacji zakładający bezpośrednie usuwanie As(V) na zewnątrz komórki.

## 6.2. Geny ACR

W połowie lat 90-tych z drożdżowego banku genów wyizolowano fragment DNA, który w wielu kopiach nadawał fenotyp bardzo wysokiego poziomu oporności drożdży *S. cerevisiae* na arsenin sodowy [11]. Analiza sekwencji nukleotydowej wykazała, że zawiera on trzy sprzężone ze sobą geny o nieznanym dotąd funkcji. Zidentyfikowane geny nazwano kolejno *ACR1* (Arsenical Compounds Resistance), *ACR2* i *ACR3*, a kodowały one odpowiednio czynnik transkrypcyjny Acr1/Yap8 (YAP – Yeast Activator Protein) należący do rodziny bZIP (basic leucine ZIPper Family), pozytywnie regulujący transkrypcję genów *ACR2* i *ACR3* ze wspólnego promotora [10, 92], reduktazę arsenianową Acr2, niezbędną do redukcji As(V) do As(III) [60],

oraz błonowy transporter arsenu trójwartościowego Acr3 [90] (Rys. 1B). Wkrótce okazało się, że homologi białka Acr3 występują licznie u archeonów, bakterii i grzybów, zidentyfikowano je także u pierwotniaków, glonów, mchów, widłaków, paproci oraz roślin nagonasiennych [62]. Należy w tym miejscu zaznaczyć, że komórki roślin okrytonasiennych i zwierząt nie posiadają funkcjonalnego homologa Acr3, co przekłada się na ich o wiele większą wrażliwość na arsen [56]. Niemniej jednak opisany po raz pierwszy u drożdży *S. cerevisiae* system detoksykacji komórek z nieorganicznych, trójwartościowych związków arsenu oparty na homologach białka Acr3 okazał się być najpowszechniej występującym systemem zarówno u prokariotów jak i eukariotów.

Białko Acr3 u drożdży *S. cerevisiae* jest jak dotąd najlepiej poznanym członkiem-założycielem rodziny permeaz arsenowych Acr3 (Arsenical Resistance-3 Family), zaliczanej wraz z sześcioma innymi rodzinami do nadrodziny BART (Bile/Arsenite/Riboflavin Transporter Superfamily) [57]. Zbudowane jest ono z 404 aminokwasów i, podobnie jak u wielu innych organizmów, lokalizuje się w błonie komórkowej [55]. U paproci *Pteris vittata* zostało ono jednak zidentyfikowane w błonie wakuolarnej, co może świadczyć o tym, że białko to u tej rośliny bierze udział w sekwestracji As(III) do wnętrza wakuoli, a tym samym tłumaczy rolę hiperakumulatora arsenu jaką pełni ta paproć w środowisku [39]. Acr3 w procesie transportu As(III) zużywa energię pochodzącą z gradientu elektrochemicznego protonów generowanego przez błonową H<sup>+</sup>-ATPazę Pma1, a zatem funkcjonuje jako wtórny antyporter, którego zadaniem jest aktywne usuwanie As(III) z cytoplazmy na zewnątrz komórki wbrew gradientowi stężeń [54]. Wykazano, że na podobnej zasadzie działa wspomniane już wcześniej białko ArsY/Acr3 również u *Corynebacterium glutamicum* wykorzystując do tego celu siłę protomotoryczną, której źródłem jest utlenianie NADH, co wyraźnie sugeruje, że mechanizm transportu As(III) jest konserwatywny wśród członków rodziny Acr3 [82]. U bakterii *B. subtilis*, *C. glutamicum* i *Alkaliphilus metalliredigens* białko Acr3 uczestniczy tylko w transporcie As(III) [32, 72, 82]. Chociaż drożdżowe białko Acr3 ma takie samo powinowactwo zarówno do As(III) jak i Sb(III), to jednak transport antymonu zachodzi znacznie wolniej w porównaniu do arseninu, co wyjaśnia, dlaczego nadaje ono komórkom drożdży stosunkowo niską oporność na antymon [54, 55]. U sinic *Synechocystis* sp. białko Acr3 warunkuje taki sam poziom oporności na oba metaloidy [50], za to u bakterii *Shewanella oneidensis* Acr3 wydaje się być specyficzne tylko względem jonów arsenianowych [93]. Taka rozbieżność pod względem specyficzności substratowej może wynikać z różnicy w składzie aminokwasowym regio-

nów transbłonowych (TM), w tym również najistotniejszych dla antyportu  $\text{As(III)/H}^+$  u drożdży – TM4 i TM9, w obrębie których znajdują się reszty najprawdopodobniej bezpośrednio zaangażowane w wiązanie substratów [53, 58]. Ciekawym faktem jest obecność dwóch kopii genu *ACR3* u drożdży *Saccharomyces douglasii* przez co są one bardziej odporne na  $\text{As(III)}$  niż *S. cerevisiae*, które posiadają tylko jedną kopię [51]. Podobną sytuację zaobserwowano u wspomnianej już paproci *P. vittata*, co dodatkowo determinuje jej hiperakumulatorowy charakter [39].

### 6.3. Usuwanie koniugatów arsenu przez pierwotne transportery ABC

U wielu organizmów, zwłaszcza wyższych eukariotów, brak jest swoistych mechanizmów oporności komórek na metaloidy. U tych organizmów w usuwanie  $\text{As(III)}$  i  $\text{Sb(III)}$  z cytoplazmy do wakuoli lub na zewnątrz komórki wbrew gradientowi stężeń mogą być zaangażowane niespecyficzne, pierwotne transportery typu ABC, których działanie zależy od energii pochodzącej z hydrolizy ATP. Często wymaga to wcześniejszego kompleksowania nieorganicznych związków arsenu i antymonu przez glutation (GSH) [56]. U ssaków, w tym u ludzi, najczęstszą drogą komórkowej biotransformacji nieorganicznych związków arsenu, po redukcji  $\text{As(V)}$  do  $\text{As(III)}$ , jest enzymatyczna metylacja [61]. Również u bakterii metylacja stanowi ważny szlak przekształcenia arsenu [104] (Rys. 1A). Reakcje metylacji przeprowadzane są przez metylotransferazy arsenowe:  $\text{As3MT}$  u ssaków i  $\text{ArsM}$  u bakterii w obecności *S*-adenozylometioniny (SAM) będącej dawcą grupy metylowej ( $-\text{CH}_3$ ) [2, 78]. Ich produktami są kwas monometyloarsonowy ( $\text{MMAs(V)}$ ), monometyloarsonawy ( $\text{MMAs(III)}$ ), dimetyloarsynowy ( $\text{DMAs(V)}$ ) i dimetyloarsynawy ( $\text{DMAs(III)}$ ), a u bakterii także tlenek trimetyloarsyny ( $\text{TMAOs(V)}$ ) i trimetyloarsyna ( $\text{TMAOs(III)}$ ). U niektórych bakterii wysoce toksyczny  $\text{MMAs(III)}$  jest usuwany przez opisany wcześniej transporter  $\text{ArsP}$ , u innych lotna trimetyloarsyna może dyfundować bezpośrednio przez dwuwarstwą fosfolipidową (Rys. 1A). Z kolei u ssaków  $\text{MMAs(III)}$  i  $\text{DMAs(III)}$ , podobnie jak  $\text{As(III)}$ , mogą tworzyć kompleksy z GSH. Powstałe koniugaty glutationowe arsenu nieorganicznego ( $\text{As(GS)}_3\text{(III)}$ ) i organicznego ( $\text{MMAs(GS)}_2\text{(III)}$ ,  $\text{DMAs(GS)}_2\text{(III)}$ ), w tym także w postaci jonu  $(\text{GS})_2\text{AsSe}^-$ , u ludzi usuwane są m.in. z hepatocytów do żółci przez transportery *ABCA1* oraz *MRP1/ABCC1*, *MRP2/ABCC2* i *MRP4/ABCC4* [4, 15, 47, 77]. U drożdży *S. cerevisiae* system usuwania metaloidów z komórki na zewnątrz przy pomocy transportera *Acr3* wspomagany jest przez pompy *Ycf1* i *Vmr1*, które transportują koniugaty  $\text{As(GS)}_3\text{(III)}$  i  $\text{Sb(GS)}_3\text{(III)}$  do wakuoli [85, 91] (Rys. 1A).

### 6.4. Dwukierunkowy transport arsenu

Wyniki heterologicznej ekspresji roślinnych akwagliceroporyn w komórkach drożdży, ukazujące wzrost oporności tych komórek na  $\text{As(V)}$  oraz badania akwagliceroporyn u bakterii i ludzi dostarczyły informacji, iż białka te mogą funkcjonować jako dwukierunkowe kanały i usuwać  $\text{As(III)}$  na zewnątrz komórki zgodnie z gradientem stężeń [9, 94]. Dzieje się tak wówczas gdy wewnątrzkomórkowe stężenie  $\text{As(III)}$  jest wyższe niż na zewnątrz, a ma to miejsce, gdy dominujący w środowisku zewnętrznym  $\text{As(V)}$ , przy udziale reduktazy arsenianowej ulega w komórce redukcji do  $\text{As(III)}$ , co powoduje wzrost stężenia tej formy arsenu w cytoplazmie, wywołując powstanie znaczącej różnicy po obu stronach błony komórkowej. Taka różnica stężeń może również powstać podczas długotrwałej ekspozycji na arsen trójwartościowy, gdy stężenie „wolnego”  $\text{As(III)}$  na zewnątrz komórki spada dzięki kompleksowaniu z eksportowanym do środowiska glutationem [80]. Wykazano, że w takich warunkach także drożdżowa akwagliceroporyna *Fps1*, obok *Acr3*, bierze udział w transporcie  $\text{As(III)}$  na zewnątrz komórki [52] (Rys. 1B). Zarówno poziom transkrypcji, jak i aktywność tego kanału, jest w komórce precyzyjnie regulowana. Podczas początkowych etapów adaptacji do stresu arsenowego ilość transkryptu genu *FPS1* wykazuje gwałtowny spadek, a białko *Fps1* ulega fosforylacji przez kinazę *Hog1*, co powoduje zamknięcie kanału i ograniczenie akumulacji arsenu [52, 79]. Z czasem jednak ekspresja genu *FPS1* wzrasta, a kanał *Fps1* w błonie komórkowej jest w formie otwartej, co przyczynia się do wyrzutu  $\text{As(III)}$  z cytosolu na zewnątrz komórki [52]. Kolejnym przykładem jest akwagliceroporyna *AqpS* kodowana przez gen wchodzący w skład chromosomowej wersji operonu *ars* o specyficznym składzie *arsRSCH* występującego u symbionta roślin strączkowych *Sinorhizobium meliloti*. *AqpS* wraz z reduktazą arsenianową *ArsC* warunkują u tych bakterii oporność jedynie na  $\text{As(V)}$ , który po redukcji do  $\text{As(III)}$  usuwany jest na zewnątrz komórek zgodnie z gradientem stężeń [94]. U innych bakterii, mianowicie *Frankia alni* i *Salinispora tropica* doszło nawet do fuzji genów kodujących akwagliceroporynę i reduktazę arsenianową w jeden gen, którego ekspresja nadaje dużą oporność na arsenian, ponieważ zredukowany do arseninu jest natychmiast usuwany z komórki przez to samo białko, co zapobiega jego akumulacji w cytoplazmie w oszczędny pod względem zużycia energii sposób [87].

## 7. Podsumowanie

Skażenie wód i gleby wysoce toksycznymi związkami arsenu pochodzenia naturalnego jak i antropogenicznego stanowi poważny problem rolniczy i medyczny

w wielu rejonach świata. Szacuje się, że wiele milionów ludzi jest chronicznie ekspozowanych na niebezpieczne dawki arsenu, co prowadzi u nich do poważnych problemów zdrowotnych, w tym rozwoju różnych nowotworów. Z drugiej strony toksyczne właściwości związków arsenu wykorzystywane są w nowoczesnych chemioterapiach przeciwnowotworowych oraz w leczeniu niektórych tropikalnych chorób pasożytniczych. Niestety terapia z użyciem arsenu często bywa nieskuteczna ze względu na nabywanie przez komórki oporności na ten metaloid. Badania nad molekularnymi mechanizmami działania arsenu (i antymonu), a także drogami wnikania oraz usuwania jego związków obejmujące identyfikację białek zaangażowanych w transport, regulację ich ekspresji i stabilności w błonie, określenie specyficzności substratowej oraz ustalenie mechanizmów translokacji metaloidów są zatem niezbędne i kluczowe nie tylko do zrozumienia molekularnych podstaw tolerancji komórek na metaloidy, ale również do praktycznego wykorzystania tej wiedzy w celu wdrożenia skuteczniejszych metod leczenia. Taka wiedza mogłaby bowiem przyczynić się do opracowania strategii kontrolowania transportu arsenu przez błony umożliwiając, w zależności od potrzeby, zwiększenie lub obniżenie jego stężenia wewnątrzkomórkowego, znalezienia inhibitorów tego transportu, a także sposobów uwrażliwiania docelowych komórek na leki oparte na bazie arsenu.

Jednym z podstawowych i najbardziej wydajnych mechanizmów detoksykacji, zarówno u organizmów prokariotycznych, jak i eukariotycznych, jest usuwanie trójwartościowych form arsenu na zewnątrz komórki przez specyficzne transportery. Do dziś najlepiej scharakteryzowanym transporterem arsenowym u organizmów eukariotycznych pozostaje białko Acr3, które po raz pierwszy opisano u drożdży *S. cerevisiae*, chociaż białka z rodziny Acr3 występują nie tylko u grzybów, ale także u archeonów, bakterii, glonów, mchów i paproci. Chociaż homologi Acr3 nie zostały zidentyfikowane u wyższych roślin, drożdżowy gen *ACR3* może być z powodzeniem wprowadzony i eksprymowany w komórkach tych organizmów, co wykazano już np. u ryżu [28]. Potencjalnie możliwe jest więc uzyskanie form transgenicznych także innych roślin uprawnych, które mogłyby być uprawiane na glebach zanieczyszczonych arsenem bez ryzyka akumulacji tego metaloidu w tkankach. Z kolei umiejętność kierowania białek Acr3 do błony wakuolaryjnej, zmniejszenia stopnia ich ekspresji i regulacji samego mechanizmu transportu arsenu mogłaby przyczynić się do zastosowania takich hiperakumulatorowych roślin czy genetycznie modyfikowanych mikroorganizmów w fito- i bioremediacji skażonych terenów w wielu regionach świata.

## Podziękowania

Praca ta powstała dzięki wsparciu Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu Opus nr 2012/07/B/NZ1/02804.

## Piśmiennictwo

- Ahn R.W., O'Halloran T.V. i wsp.: A novel nanoparticulate formulation of arsenic trioxide with enhanced therapeutic efficacy in a murine model of breast cancer. *Clin. Cancer. Res.* **16**, 3607–3617 (2010)
- Ajees A.A., Rosen B.P.: As(III) S-adenosylmethionine methyltransferases and other arsenic binding proteins. *Geomicrobiol. J.* **32**, 570–576 (2015)
- Aznab M., Rezaei M.: Induction, consolidation, and maintenance therapies with arsenic as a single agent for acute promyelocytic leukaemia in a 11-year follow-up. *Hematol. Oncol.* doi: 10.1002/hon.2253. (2015)
- Banerjee M., Carew M.W., Roggenbeck B.A., Whitlock B.D., Naranmandura H., Le X.C., Leslie E.M.: A novel pathway for arsenic elimination: human multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) mediates cellular export of dimethylarsinic acid (DMAV) and the diglutathione conjugate of monomethylarsonous acid (MMAIII). *Mol. Pharmacol.* **86**, 168–179 (2014)
- Barrett M.P., Croft S.L.: Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Brit. Med. Bull.* **104**, 175–196 (2012)
- Batista-Nascimento L., Toledano M.B., Thiele D.J., Rodrigues-Pousada C.: Yeast protective response to arsenate involves the repression of the high affinity iron uptake system. *Biochim. Biophys. Acta*, **1833**, 997–1005 (2013)
- Bergquist E.R., Fischer R.J., Sugden K.D., Martin B.D.: Inhibition by methylated organo-arsenicals of the respiratory 2-oxo-acid dehydrogenases. *J. Organomet. Chem.* **694**, 973–980 (2009)
- Bhattacharjee P., Banerjee M., Giri A.K.: Role of genomic instability in arsenic-induced carcinogenicity. A review. *Environ. Int.* **53**, 29–40 (2013)
- Bienert G.P., Thorsen M., Schüssler M.D., Nilsson H.R., Wagner A., Tamás M.J., Jahn T.P.: A subgroup of plant aquaporins facilitate the bi-directional diffusion of As(OH)<sub>3</sub> and Sb(OH)<sub>3</sub> across membranes. *BMC Biol.* **6**, 10.1186/1741-7007-6-26 (2008)
- Bobrowicz P., Ulaszewski S.: Arsenical-induced transcriptional activation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* *ACR2* and *ACR3* genes requires the presence of the *ACR1* gene product. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **3**, 13–20 (1998)
- Bobrowicz P., Wysocki R., Owsianik G., Goffeau A., Ulaszewski S.: Isolation of three contiguous genes, *ACR1*, *ACR2* and *ACR3*, involved in resistance to arsenic compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **13**, 819–828 (1997)
- Bruhn D.F., Li J., Silver S., Roberto F., Rosen B.P.: The arsenical resistance operon of IncN plasmid R46. *FEMS Microbiol. Lett.* **139**, 149–153 (1996)
- Bundschuh J., Toujaque R. i wsp.: One century of arsenic exposure in Latin America: a review of history and occurrence from 14 countries. *Sci. Total Environ.* **429**, 2–35 (2012)
- Bustaffa E., Stoccoro A., Bianchi F., Migliore L.: Genotoxic and epigenetic mechanism in arsenic carcinogenicity. *Arch. Toxicol.* **88**, 1043–1067 (2014)
- Carew M.W., Leslie E.M.: Selenium-dependent and -independent transport of arsenic by the human multidrug resistance protein 2 (MRP2/ABCC2): implications for the mutual detoxification of arsenic and selenium. *Carcinogenesis*, **31**, 1450–1455 (2010)



16. Carlin A., Shi W., Dey S., Rosen B.P.: The *ars* operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimonial resistance. *J. Bacteriol.* **177**, 981–986 (1995)
17. Castillo R., Saier M.H.: Functional Promiscuity of Homologues of the Bacterial ArsA ATPases. *FEBS Lett.* **584**, 3089–3094 (2010)
18. Chauhan N.S., Ranjan R., Purohit H.J., Kalia V.C., Sharma R.: Identification of genes conferring arsenic resistance to *Escherichia coli* from an effluent treatment plant sludgemetagenomic library. *FEMS Microbiol. Ecol.* **67**, 130–139 (2009)
19. Chen C.M., Misra T.K., Silver S., Rosen B.P.: Nucleotide sequence of the structural genes for an anion pump. The plasmid-encoded arsenical resistance operon. *J. Biol. Chem.* **261**, 15030–15038 (1986)
20. Chen J., Bhattacharjee H., Rosen B.P.: ArsH is an organoarsenical oxidase that confers resistance to trivalent forms of the herbicide monosodium methylarsenate and the poultry growth promoter roxarsone. *Mol. Microbiol.* **96**, 1042–1052 (2015)
21. Chen J., Madegowda M., Bhattacharjee H., Rosen B.P.: ArsP: a methylarsenite efflux permease. *Mol. Microbiol.* **98**, 625–635 (2015)
22. Chen J., Yoshinaga M., Garbinski L.D., Rosen B.P.: Synergistic interaction of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase and ArsJ, a novel organoarsenical efflux permease, confers arsenate resistance. *Molecular Microbiology*, **100**, 945–953 (2016)
23. Chou W.C., Jie C., Kenedy A.A., Jones R.J., Trush M.A., Dang C.V.: Role of NADPH oxidase in arsenic-induced reactive oxygen species formation and cytotoxicity in myeloid leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 4578–4583 (2004)
24. Deb D., Biswas A., Ghose A., Das A., Majumdar K.K., Mazumder D.N.G.: Nutritional deficiency and arsenical manifestations: a perspective study in an arsenic-endemic region of West Bengal. *Public Health. Nutr.* **16**, 1644–1655 (2013)
25. Dey S., Dou D., Tisa L.S., Rosen B.P.: Interaction of the catalytic and the membrane subunits of an oxyanion-translocating ATPase. *Biochem. Biophys.* **311**, 418–424 (1994)
26. Dey S., Rosen B.P.: Dual mode of energy coupling by the oxyanion-translocating ArsB protein. *J. Bacteriol.* **177**, 385–389 (1995)
27. Dilda P.J., Hogg P.J.: Arsenical-based cancer drugs. *Cancer Treat. Rev.* **33**, 542–564 (2007)
28. Duan G., Kamiya T., Ishikawa S., Arai T., Fujiwara T.: Expressing *ScACR3* in rice enhanced arsenite efflux and reduced arsenic accumulation in rice grains. *Plant Cell Physiol.* **53**, 154–163 (2012)
29. Flora S.J., Singh N.: Arsenic induced oxidative stress and the role of antioxidant supplementation during chelation: a review. *J. Environ. Biol.* **28**, 333–347 (2007)
30. Flora S.J.: Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 257–281 (2011)
31. Frézard F., Demicheli C.: New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. *Expert. Opin. Drug Deliv.* **7**, 1343–1358 (2010)
32. Fu H.L., Meng Y., Ordóñez E., Villadangos A.F., Bhattacharjee H., Gil J.A., Mateos L.M., Rosen B.P.: Properties of arsenite efflux permeases (*Acr3*) from *Alkaliphilus metalliredigens* and *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* **284**, 19887–19895 (2009)
33. Fu H.L., Rosen B.P., Bhattacharjee H.: Biochemical characterization of a novel ArsA ATPase complex from *Alkaliphilus metalliredigens* QYMF. *FEBS Lett.* **584**, 3089–3094 (2010)
34. Gladysheva T.B., Oden K.L., Rosen B.P.: Properties of the arsenate reductase of plasmid R773. *Biochemistry*, **33**, 7288–7293 (1994)
35. Hossein M.J., Shaki F., Ghazi-Khansari M., Pourhmad J.: Toxicity of arsenic (III) on isolated liver mitochondria: a new mechanistic approach. *Iranian J. Pharm. Res.* **12**, 121–138 (2013)
36. Huang L., Wu H., van der Kuijp T.J.: The health effects of exposure to arsenic-contaminated drinking water: a review by global geographical distribution. *Int. J. Environ. Health Res.* **25**, 432–452 (2015)
37. Hughes M.F.: Arsenic toxicity and potential mechanism of action. *Toxicol. Lett.* **133**, 1–16 (2002)
38. Istedt S., Sideri T.C., Grant C.M., Tamás M.J.: Global analysis of protein aggregation in yeast during physiological conditions and arsenite stress. *Biology Open*, **3**, 913–923 (2014)
39. Indriolo E., Na G., Ellis D., Salt D.E., Banks J.A.: A vacuolar arsenite transporter necessary for arsenic tolerance in the arsenic hyperaccumulating fern *Pteris vittata* is missing in flowering plants. *Plant Cell*, **22**, 2045–2057 (2010)
40. International Agency for Research on Cancer: Arsenic, metals, fibres, and dusts. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* **100C**, 1–526 (2012)
41. Jena N.R.: DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *J. Biosci.* **37**, 503–517 (2012)
42. Ji G., Silver S.: Regulation and expression of the arsenic resistance operon from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *J. Bacteriol.* **174**, 3684–3694 (1992)
43. Jiao W.T., Chen W.P., Chang A.C., Page A.L.: Environmental risks of trace elements associated with long-term phosphate fertilizers applications: a review. *Environ. Pollut.* **168**, 44–53 (2012)
44. Kröncke K.D., Klotz L.O. Zinc fingers as biologic redox switches? *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 1015–1027 (2009)
45. Kuroda M., Dey S., Sanders O.I., Rosen B.P.: Alternate energy coupling of ArsB, the membrane subunit of the Ars anion-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* **272**, 326–331 (1997)
46. Lau A., Zheng Y., Tao S., Wang H., Whitman S.A., White E., Zhang D.D.: Arsenic inhibits autophagic flux activating the Nrf2-Keap1 pathway in a p62-dependent manner. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 2436–2446 (2013)
47. Leslie E.M., Haimeur A., Waalkes M.P.: Arsenic transport by the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). Evidence that a tri-glutathione conjugate is required. *J. Biol. Chem.* **279**, 32700–32708 (2004)
48. Lin Y.F., Walmsley A.R., Rosen B.P.: An arsenic metallochaperone for an arsenic detoxification pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 15617–15622 (2006)
49. Litwin I., Bocer T., Dziadkowiec D., Wysocki R.: Oxidative stress and replication-independent DNA breakage induced by arsenic in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* **9**, e1003640 (2013)
50. López-Maury L., Florencio F.J., Reyes J.C.: Arsenic sensing and resistance system in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **185**, 5363–5371 (2003)
51. Maciaszczyk E., Wysocki R., Golik P., Lazowska J., Ulaszewski S.: Arsenical resistance genes in *Saccharomyces douglasii* and other yeast species undergo rapid evolution involving genomic rearrangements and duplications. *FEMS Yeast Res.* **4**, 821–832 (2004)
52. Maciaszczyk-Dziubinska E., Migdal I., Migocka M., Bocer T., Wysocki R.: The yeast aquaglyceroporin Fps1p is a bidirectional arsenite channel. *FEBS Lett.* **584**, 726–732 (2010)
53. Maciaszczyk-Dziubinska E., Migocka M., Wawrzycka D., Markowska K., Wysocki R.: Multiple cysteine residues are necessary for sorting and transport activity of the arsenite permease *Acr3p* from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1838**, 747–755 (2014)

54. Maciaszczyk-Dziubinska E., Migocka M., Wysocki R.: Acr3p is a plasma membrane antiporter that catalyzes As(III)/H<sup>+</sup> and Sb(III)/H<sup>+</sup> exchange in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1808**, 1855–1859 (2011)
55. Maciaszczyk-Dziubinska E., Wawrzycka D., Sloma E., Migocka M., Wysocki R.: The yeast permease Acr3p is a dual arsenite and antimonite plasma membrane transporter. *Biochim. Biophys. Acta*, **1798**, 2170–2175 (2010)
56. Maciaszczyk-Dziubinska E., Wawrzycka D., Wysocki R.: Arsenic and antimony transporters in eukaryotes. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 3527–3548 (2012)
57. Mansour N.M., Sawhney M., Tamang D.G., Vogl C., Saier M.H.: The bile/arsenite/riboflavin transporter (BART) superfamily. *FEBS J.* **274**, 612–629 (2007)
58. Markowska K., Maciaszczyk-Dziubinska E., Migocka M., Wawrzycka D., Wysocki R.: Identification of critical residues for transport activity of Acr3p, the *Saccharomyces cerevisiae* As(III)/H<sup>+</sup> antiporter. *Mol. Microbiol.* **98**, 162–174 (2015)
59. Meng Y.L., Liu Z., Rosen B.P.: As(III) and Sb(III) uptake by GlpF and efflux by ArsB in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **279**, 18334–18341 (2004)
60. Mukhopadhyay R., Rosen B.P.: *Saccharomyces cerevisiae* ACR2 gene encodes an arsenate reductase. *FEMS Microbiol. Lett.* **168**, 127–136 (1998)
61. Naranmandura H., Suzuki N., Suzuki K.T.: Trivalent arsenicals are bound to proteins during reductive methylation. *Chem. Res. Toxicol.* **19**, 1010–1018 (2006)
62. National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (19.07.2016)
63. Naujokas M.F., Anderson B., Ahsan H., Aposhian H.V., Graziano J.H., Thompspon C., Suk W.A.: The broad scope of health effects from chronic arsenic exposure: update on a worldwide public health problem. *Environ. Health Persp.* **121**, 295–302 (2013)
64. Noormohamed A., Fakhr M.K.: Arsenic resistance and prevalence of arsenic resistance genes in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from retail meats. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **10**, 3453–3464 (2013)
65. Pan X., Reissman S., Douglas N.R., Huang Z., Yuan D.S., Wang X., McCaffery J.M., Frydman J., Boeke J.D.: Trivalent arsenic inhibits the functions of chaperonin complex. *Genetics*, **186**, 725–734 (2010)
66. Qi Y., Li H., Zhang M., Zhang T., Frank J., Chen G.: Autophagy in arsenic carcinogenesis. *Exp. Toxicol. Pathol.* **66**, 163–168 (2014)
67. Rosen B.P., Weigel U., Karkaria C., Gangola P.: Molecular characterization of an anion pump. The *arsA* gene product is an arsenite (antimonate)-stimulated ATPase. *J. Biol. Chem.* **263**, 3067–3070 (1988)
68. Rosen B.P.: Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Letters*, **529**, 86–92 (2002)
69. Rosenstein R., Peschel A., Wieland B., Götz F.: Expression and regulation of the antimoonite, arsenite, and arsenate resistance operon of *Staphylococcus xylosum* plasmid pSX267. *J. Bacteriol.* **174**, 3676–3683 (1992)
70. Sahoo P.K., Kim K.: A review of the arsenic concentration in paddy rice from the perspective of geoscience. *Geosci. J.* **17**, 107–122 (2013)
71. Sarkar A., Paul B.: The global menace of arsenic and its conventional remediation – A critical review. *Chemosphere*, **158**, 37–49 (2016)
72. Sato T., Kobayashi Y.: The *ars* operon in the *skin* element of *Bacillus subtilis* confers resistance to arsenate and arsenite. *J. Bacteriol.* **180**, 1655–1661 (1998)
73. Shen S., Li X.F., Cullen W.R., Weinfeld M., Le X.C.: Arsenic binding to proteins. *Chem. Rev.* **113**, 7769–7792 (2013)
74. Subbarayan P.R., Ardalán B.: In the war against solid tumors arsenic trioxide needs partners. *J. Gastrointest. Cancer.* **45**, 363–371 (2014)
75. Sumi D., Taguchi K., Sun Y., Shinkai Y., Kumagai Y.: Monomethylarsonous acid inhibits endothelial nitric oxide synthase activity. *J. Health Sci.* **51**, 728–730 (2005)
76. Tamás M.J., Sharma S.K., Ibstedt S., Jacobson T., Christen P.: Heavy metals and metalloids as a cause for protein misfolding and aggregation. *Biomolecules*, **4**, 252–267 (2014)
77. Tan X., Yang L., Xian L., Huang J., Di C., Gu W., Guo S., Yang L.: ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) promotes arsenic tolerance in human cells by reducing cellular arsenic accumulation. *Clin Exp. Pharmacol. Physiol.* **41**, 287–294 (2014)
78. Thomas D.J., Li J., Waters S.B., Xing W., Adair B.M., Drobná Z., Devesa V., Styblo M.: Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and methylation of arsenicals. *Exp. Biol. Med.* **232**, 3–11 (2007)
79. Thorsen M., Di Y., Tangemo C., Morillas M., Ahmadpour D., Van der Does C., Wagner A., Johansson E., Posas F., Wysocki R., Tamás M.J.: The MAPK Hog1p modulates Fps1p-dependent arsenite uptake and tolerance in budding yeast. *Mol. Biol. Cell*, **17**, 4400–4410 (2006)
80. Thorsen M., Jacobson T., Vooijs R., Navarrete C., Bliet T., Schat H., Tamás M.J.: Glutathione serves an extracellular defence function to decrease arsenite accumulation and toxicity in yeast. *Mol. Microbiol.* **84**, 1177–1188 (2012)
81. Tisa L.S., Rosen B.P.: Molecular characterization of an anion pump. The ArsB protein is the membrane anchor for the ArsA protein. *J. Biol. Chem.* **265**, 190–194 (1990)
82. Villadangos A.F., Fu H.L., Gil J.A., Messens J., Rosen B.P., Mateos L.M.: Efflux permease CgAcr3-1 of *Corynebacterium glutamicum* is an arsenite-specific antiporter. *J. Biol. Chem.* **287**, 723–735 (2012)
83. Wang Y., Yang J., Yi J.: Redox sensing by proteins: oxidative modifications on cysteines and the consequent events. *Antioxid. Redox Signal.* **16**, 649–657 (2012)
84. Wang Z., Zhang H., Li X.F., Le X.C.: Study of interactions between arsenicals and thioredoxins (human and *E. coli*) using mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* **21**, 3658–3666 (2007)
85. Wawrzycka D., Sobczak I., Bartosz G., Bocér T., Ulaszewski S., Goffeau A.: Vmr1p is a novel vacuolar multidrug resistance ABC transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **10**, 828–838 (2010)
86. WHO: Guidelines for Drinking-water Quality. World Health Organisation **4**, 315–318 (2011)
87. Wu B., Song J., Beitz E.: Novel channel-enzyme fusion proteins confer arsenate resistance. *J. Biol. Chem.* **285**, 40081–40087 (2010)
88. Wu J., Rosen B.P.: The ArsR protein is a trans-acting regulatory protein. *Mol. Microbiol.* **5**, 1331–1336 (1991)
89. Wu J., Tisa L.S., Rosen B.P.: Membrane topology of the ArsB protein, the membrane subunit of an anion-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* **267**, 12570–12576 (1992)
90. Wysocki R., Bobrowicz P., Ulaszewski S.: The *Saccharomyces cerevisiae* ACR3 gene encodes a putative membrane protein involved in arsenite transport. *J. Biol. Chem.* **272**, 30061–30066 (1997)
91. Wysocki R., Clemens S., Augustyniak D., Golik P., Maciaszczyk E., Tamás M.J., Dziadkowiec D.: Metalloid tolerance based on phytochelatin is not functionally equivalent to the arsenite transporter Acr3p. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 293–300 (2003)
92. Wysocki R., Fortier P.K., Maciaszczyk E., Thorsen M., Leduc A., Odhagen A., Owsianik G., Ulaszewski S., Ramotar D., Tamás M.J.:

- Transcriptional activation of metalloid tolerance genes in *Saccharomyces cerevisiae* requires the AP-1-like proteins Yap1p and Yap8p. *Mol. Biol. Cell*, **15**, 2049–2060 (2004)
93. Xia X., Baldwin S.A. i wsp.: Investigation of the structure and function of a *Shewanella oneidensis* arsenical-resistance family transporter. *Mol. Membr. Biol.* **25**, 691–705 (2008)
94. Yang H.C., Cheng J., Finan T.M., Rosen B.P., Bhattacharjee H.: Novel pathway for arsenic detoxification in the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **187**, 6991–6997 (2005)
95. Yang H.C., Fu H.L., Lin Y.F., Rosen B.P.: Pathways of arsenic uptake and efflux. *Curr. Top. Membr.* **69**, 325–358 (2012)
96. Yang H.C., Rosen B.P.: New mechanisms of bacterial arsenic resistance. *Biomedical Journal*, **39**, 5–13 (2016)
97. Yang Y., Wu S., Lilley R.M., Zhang R.: The diversity of membrane transporters encoded in bacterial arsenic-resistance operons. *PeerJ* **3**:e943 (2015)
98. Ye J., Rensing C., Rosen B.P., Zhu Y.G.: Arsenic biomethylation by photosynthetic organisms. *Trends Plant Sci.* **17**, 155–162 (2012)
99. Yoshinaga M., Rosen B.P.: A C-As lyase for degradation of environmental organoarsenical herbicides and animal husbandry growth promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 7701–7706 (2014)
100. Zhao L., Chen S., Jia L., Shu S., Zhu P., Liu Y.: Selectivity of arsenite interaction with zinc finger proteins. *Metallomics*, **4**, 988–994 (2012)
101. Zhao Y., Toselli P., Li W.: Microtubules as a critical target for arsenic toxicity in lung cells *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **9**, 474–495 (2012)
102. Zheng W., Scifleet J., Yu X., Jiang T., Zhang R.: Function of arsATorf7orf8 of *Bacillus* sp. CDB3 in arsenic resistance. *J. Environ. Sci.* **25**, 1386–1392 (2013)
103. Zhou X., Cooper K.L., Sun X., Liu K.J., Hudson L.G.: Selective Sensitization of Zinc Finger Protein Oxidation by ROS Through Arsenic Binding. *J. Biol. Chem.* **290**, 18361–18369 (2015)
104. Zhu Y.G., Yoshinaga M., Zhao F.J., Rosen B.P.: Earth abides arsenic biotransformations. *Annu. Rev. Earth and Planet Sci.* **42**, 443–467 (2014)

Tomasz Chmielewski<sup>1\*</sup>, Stanisława Tylewska-Wierzbanowska<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Samodzielna Pracownia Riketsji, Chlamydii i Krętków Odzwierzęcych,  
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny

Wpłynęło w sierpniu 2016 r.  
Zaakceptowano we wrześniu 2016 r.

1. Wstęp. 2. *Lyme carditis* – objawy, rozpoznanie i leczenie. 3. Patomechanizm zapalenia serca. 3.1. Ruch krętków. 3.2. Chemotaksja i adhezja. 3.3. Reakcje autoimmunologiczne. 4. Podsumowanie

#### Factors responsible for the development of *Lyme carditis*

**Abstract:** *Borrelia burgdorferi* sensu lato spirochetes are unique in many aspects. They are the etiological agents of Lyme borreliosis, meta-zoonotic, tick-borne disease of mammals, including humans. *Ixodes* spp. ticks are the vector. With the exception of erythema chronicum migrans (EM), manifestations of the disease may vary depending on the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. One of the symptoms is *Lyme carditis*. To date, the causative factors and the mechanisms of pathogenesis have not been well-described.

*Borrelia burgdorferi* spirochetes are considered as one of the most invasive mammalian pathogen. They are able to move through the skin, as well as break into and out of blood vessels, easily crossing the blood-brain barrier. Genes encoding various motility forms are bound with chemotaxis signaling system which leads and coordinates motion functions. The attachment of bacteria to host cells or extracellular matrix may promote colonization and disease development. Lyme disease spirochetes encode several surface proteins including decorin binding adhesion (DbpA), which varies among strains contributing to strain-specific differences in tissue tropism. The strains demonstrating the greatest decorin-binding activity promote the greatest colonization of heart and cause the most severe carditis. Moreover, the manifestation of Lyme carditis in certain hosts may be a result of an autoimmunological reaction due to molecular mimicry between *B. burgdorferi* and host self-components. In mammals, infection with *B. burgdorferi* induces the development of antibodies which may cross-react with myosin and neural tissue.

1. Introduction. 2. *Lyme carditis* – symptoms, recognition and treatment. 3. Patho-mechanism of *Lyme carditis*. 3.1. Spirochetes motility. 3.2. Chemotaxis and adhesion. 3.3. Autoimmunological reactions. 4. Summary

**Słowa kluczowe:** *Borrelia burgdorferi*, *Lyme carditis*, patomechanizm

**Key words:** *Borrelia burgdorferi*, *Lyme carditis*, patho-mechanism

## 1. Wstęp

Krętki *Borrelia burgdorferi* sensu lato należące do rzędu *Spirochaetales*, rodziny *Spirochaetaeaceae*, są pod wieloma względami wyjątkowe (Rys. 1). Gatunek jest zróżnicowany pod względem genetycznym. W skład jego wchodzi kilkanaście genogatunków, występujących na różnych kontynentach półkuli północnej (Rys. 2). Jako pierwsze opisane zostały w latach 80. XX wieku i najlepiej są scharakteryzowane chorobotwórcze dla człowieka genogatunki: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garini* i *B. afzeli*. W Europie występują wszystkie trzy wyżej wymienione genogatunki, natomiast w Ameryce Północnej tylko *B. burgdorferi* sensu stricto [21, 24].

Rys. 1. Systematyka krętków

- **Gromada:** *Spirochaetes*
- **Klasa:** *Spirochaetes*
- **Rząd:** *Spirochaetales*
- **Rodzina:** *Spirochaetaeaceae*  
    **Rodzaj:** *Borrelia*  
          *Treponema*

Rys. 2. Genogatunki *Borrelia burgdorferi* sensu lato

*Borrelia burgdorferi* sensu stricto  
*B. garini*  
*B. afzeli*  
*B. bisetti*  
*B. spielmani*  
*B. valaesiana*  
*B. lusitaniae*  
*B. andersoni*  
*B. californiensis*  
*B. japonia*  
*B. sinica*  
*B. turdi*

Są to bakterie o bardzo dużych wymaganiach odżywczych i w warunkach laboratoryjnych nie rosną na żadnych standardowych podłożach bakteriologicznych. W laboratorium można je hodować tylko na podłożu BSK II wzbogaconym surowicą króliczą. Mimo, że jest to bardzo bogate podłoże, zawierające między innymi mieszaninę aminokwasów, witamin, soli nieorganicznych, albuminy oraz surowicę królika,

\* Autor korespondencyjny: Samodzielna Pracownia Riketsji, Chlamydii i Krętków Odzwierzęcych, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa; tel. 22 5421261; e-mail: tchmielewski@pzh.gov.pl

wzrost ich jest bardzo wolny, średnio czas podziału komórki wynosi 16 godzin. Wynik hodowli na BSK II otrzymuje się zwykle po 3 miesiącach. Wynik ujemny hodowli uzyskany po tym czasie nie jest jednak jednoznaczny, można jedynie stwierdzić – „wzrostu krętków nie stwierdzono” [24].

Wywoływana przez krętki *B. burgdorferi* sensu lato borelioza z Lyme, jest meta-zoonozą, która przenoszona jest wśród zwierząt kręgowych, a także ludzi, przez przenosiela (wektor), którym są kleszcze rodzaju *Ixodes*. W zależności od rejonu geograficznego są to różne gatunki tego kleszcza – w Europie to przede wszystkim *I. ricinus*, w Azji *I. persulcatus*, natomiast w Ameryce głównie *I. scapularis*.

Objawy choroby, oprócz rumienia wędrującego, mogą dotyczyć różnych układów i narządów zależnie od genogatunku, który wywołał zakażenie. *B. burgdorferi* sensu stricto jest związany z zajęciem narządu ruchu, uszkodzeniem stawów i chrząstki stawowej, *B. garini* wywołuje neuroboreliozę, z zakażeniem ośrodkowego układu nerwowego i nerwów obwodowych, natomiast szczepy *B. afzeli* izolowano z późnych zmian skórnych (przewlekłe zanikowe zapalenie skóry, *acrodermatitis chronica atrophicans* – ACA). *Lyme carditis* może wystąpić jednocześnie z innymi postaciami boreliozy z Lyme [21].

## 2. Lyme carditis – objawy, rozpoznanie i leczenie

Kryteria rozpoznania zapalenia serca w przebiegu boreliozy z Lyme ustalone zostały kilka lat temu [18, 21].

Objawy kliniczne to przede wszystkim nagłe wystąpienie zaburzeń przewodzenia (zwłaszcza u młodych pacjentów) lub innych zaburzeń rytmu serca i objawy zapalenia osierdzia (*perimyocarditis*). W wywiadzie stwierdza się obecny lub występujący niedawno rumień wędrujący lub ukłucia przez kleszcza.

Do postawienia rozpoznania wymagana jest diagnostyka różnicowa i wykluczenie innych przyczyn oraz przeprowadzenie badań laboratoryjnych w kierunku boreliozy z Lyme. W badaniach tych wykrywa się swoiste przeciwciała dla *Borrelia burgdorferi* s.l. w surowicy krwi chorego. Cennym badaniem dodatkowym jest biopsja mięśnia serca i wykrycie w pobranym materiale DNA krętków w reakcji PCR.

Diagnostyka kardiologiczna obejmuje 12-odprowadzeniowe EKG i 24-godzinne badanie Holtera EKG (analiza rytmu serca, odstępy PQ, szerokość QRS), a także badanie echokardiograficzne (wymiary, frakcja wyrzutowa, ocena kurczliwości mięśnia serca, wysięk w osierdziu) i RTG klatki piersiowej (ocena wielkości sylwetki serca, objawy niewydolności serca).

Badania pomocnicze, takie jak rezonans magnetyczny, biopsja mięśnia serca, badanie elektrofizjolo-

giczne (EPS) mogą dostarczyć także cennych informacji w indywidualnych przypadkach i pomóc w potwierdzeniu diagnozy i ustaleniu rokowania [18].

Objawy kardiologiczne w przebiegu boreliozy z Lyme pojawiają się stosunkowo rzadko. W latach 2001–2010 odsetek osób zgłaszanych z objawami ze strony układu krążenia wyniósł 1,1% wśród wszystkich chorych na boreliozę z Lyme. W Europie ocenia się, że jest to od 1% do 2% wszystkich przypadków. Objawy najczęściej można zaobserwować równolegle z rumieniem wędrującym, niedługo po jego wystąpieniu lub częściej towarzyszą objawom ze strony układu nerwowego lub kostno-stawowego we wczesnej fazie zakażenia (średnio po 21 dniach od pojawienia się rumienia). Typowymi objawami są zaburzenia przewodzenia przedsionkowo-komorowego różnego stopnia [12, 21]. W szczególności zapalenie serca należy podejrzewać u osób młodych zgłaszających uczucie kołatania serca, wykazujących zaburzenia przewodzenia, u których wykluczono inne czynniki ryzyka, a którzy w wywiadzie zgłaszają fakt przebywania na terenach występowania kleszczy.

Inne objawy *Lyme carditis* to, bradykardia, blok odnogi pęczka Hisa, zapalenie osierdzia i *endomyocarditis*. Postawienie tego rozpoznania wymaga jednak wykluczenia innych przyczyn. Wynik dodatni badania serologicznego nie jest wystarczający, a ostateczna diagnoza powinna uwzględniać wywiad kliniczny i wcześniejsze wystąpienie innych objawów charakterystycznych dla boreliozy z Lyme (rumień wędrujący) [20, 25].

W latach 80., jeszcze przed odkryciem czynnika etiologicznego, Steere i wsp. analizowali grupę 20 chorych (w większości młodych dorosłych mężczyzn), u których stwierdzono objawy ze strony układu krążenia. Chorzy zgłaszali duszność wysiłkową, ból w klatce piersiowej, uczucie kołatania serca, omdlenia. Najczęstszą nieprawidłowością (u 18 pacjentów) był blok przedsionkowo-komorowy różnego stopnia; u ośmiu z tych pacjentów wystąpił całkowity blok serca. U 11 chorych nieprawidłowości w zapisie elektrokardiograficznym sugerowały ostre zapalenie osierdzia. Ponadto u pięciu pacjentów stwierdzono dysfunkcję mięśnia lewej komory, a u jednego chorego powiększenie sylwetki serca. Obraz kliniczny u tych pacjentów wykazywał podobieństwa do ostrej gorączki reumatycznej, ale w chorobie z Lyme, całkowity blok serca występuje częściej, a objawy zapalenia osierdzia wydają się być łagodniejsze, bez uszkodzenia zastawek. Czas trwania zajęcia serca był zazwyczaj krótki od 3 dni do 6 tygodni [20].

Późniejsza analiza 105 północnoamerykańskich i europejskich przypadków *Lyme carditis* wykazała, że częściej chorują mężczyźni (stosunek wynosił 3:1), a przemijający blok przedsionkowo-komorowy jest najczęstszym objawem zapalenia serca, przy czym blok przedsionkowo-komorowy trzeciego stopnia

obserwowano u 49% chorych, drugiego stopnia u 16% i pierwszego stopnia u 12%. Dane badań elektrofizjologicznych wskazują, że bloki układu przewodzącego serca mogą być zlokalizowane w wielu miejscach. Inne objawy, takie jak zaburzenia rytmu serca zapalenie osierdzia i niewydolności serca były rzadkie i miały podobną częstość występowania na obu kontynentach. Rokowanie w *Lyme carditis* jest dobre, chociaż u części chorych opisano przedłużone utrzymywanie się objawów [25].

Związek przewlekłych chorób serca, takich jak kardiomiopatia rozstrzeniowa z boreliozą z Lyme i nie został w pełni udowodniony, mimo że w pojedynczych przypadkach w biopsji serca wykrywano DNA *Borrelia burgdorferi* s.l. [19]. Wykazano także zwiększoną częstość występowania przeciwciał przeciwko *B. burgdorferi* u tych chorych. Zależność taka nie została jednakże potwierdzona w innych badaniach [12]. Nowsze badania [16] wykonane metodą PCR, wykazały zamiennie częstsze występowanie fragmentów genomu *B. burgdorferi* w biopsjach mięśnia sercowego pacjentów z niedawno zdiagnozowaną kardiomiopatią przerostową (24%), w porównaniu z grupą kontrolną (0%) [10].

Biopsja jest uważana za złoty standard w rozpoznaniu zapalenia mięśnia sercowego i nadal odgrywa ważną rolę, zwłaszcza w trudnych przypadkach np. przy niewydolności serca, przeroście lewej komory lub arytmiiach różnego stopnia [8, 11]. W badaniach histopatologicznych w *Lyme carditis* wykazano limfocytarne nacieki w mięśniu serca w postaci pasm z włóknieniem w warstwie podwsierdziowej. W zmianach tych lub pomiędzy włóknami mięśniowymi można sporadycznie zidentyfikować komórki bakteryjne. Przypuszczalnie, zapalna reakcja indukowana przez krętki oraz oddziaływanie samych komórek bakteryjnych są przyczynami uszkodzenia tkanek tego narządu. Ponadto mała liczba krętków wykrywanych w uszkodzonej tkance przemawia także za immunologicznym komponentem zapalenia wsierdzia [6, 10, 17]. W tej grupie chorych znacznie częściej są wykrywane przeciwciała dla komórek endotelialnych (AECA).

*Lyme carditis* ma dobre rokowanie. Pacjenci z tym podejrzeniem, u których wystąpiły epizody omdleń, bloki przedsionkowo-komorowe drugiego lub trzeciego stopnia lub u których odcinek PQ > 300 ms powinni być hospitalizowani w celu ciągłego monitorowania rytmu serca, przy czym szpital powinien być wyposażony w sprzęt umożliwiający czasowe wszczęcie stymulatora. Zazwyczaj bloki przedsionkowo-komorowe ustępują po około 7 dniach, dlatego wszczęcie stałego stymulatora nie jest zalecane. Wg rekomendacji Europejskiej Federacji Towarzystw Neurologicznych (European Federation of Neurological Societies – EFNS), lekiem z wyboru jest ceftriaksone (alternatywnie: cefotaksym), podawany przez okres dwóch tygodni

w dawce 2,0 g/dobę u pacjentów hospitalizowanych. Alternatywą jest podawanie doksycyliny w dawce 2 × 100 mg/dobę lub amoksycyliny 1,5–2,0 g/dobę. Wcześniej rozpoczęta antybiotykoterapia pozwala na szybką eliminację krętków i ustąpienie objawów [21].

### 3. Patomechanizm zapalenia serca

Na rozwój zapalenia serca ma wpływ wiele czynników pochodzących zarówno od krętka wywołującego zakażenie jak i pewnych cech gospodarza.

#### 3.1. Ruch krętków

Są to bakterie ruchliwe dzięki rzęskom znajdującym się w peryplazmie. Dzięki niej mają zdolność poruszania się w bardzo zróżnicowanym środowisku, co umożliwia krętkom nie tylko wniknięcie do organizmu gospodarza, zarówno rezerwuaru jak i wektora, ale również dotarcie do różnych układów i narządów, a następnie osiedlenie się i bytowanie w nich [7].

Wiele chorobotwórczych bakterii może aktywnie poruszać się, pływając w płynach ustrojowych, jak również wykonując ruchy ślizgowe, drgające przy pomocy rzęsek, przemieszczać się po powierzchniach półpłynnych i stałych. W miarę jednak wzrostu stężenia polimerów i zestalenia podłoża, ruch z udziałem większości bakterii ulega zahamowaniu. Krętki są pod tym względem wyjątkiem. Rzęski krętków nie są ulokowane zewnętrznie, jak to jest u większości bakterii Gram-ujemnych, ale znajduje się, jak wcześniej wspomniano, w przestrzeni peryplazmatycznej, pomiędzy błoną zewnętrzną i peptydoglikanem. Zaobserwowano, że zarówno *B. burgdorferi* jak i blisko spokrewniona *Treponema pallidum*, są wyjątkowe i w przeciwieństwie do innych ruchliwych bakterii są wyposażone w organelle ruchu, zdolne do poruszania się w każdym środowisku o zróżnicowanej strukturze – w wielu tkankach o różnej budowie [26]. Dzięki tym właściwościom, krętki *B. burgdorferi* z łatwością przechodzą przez skórę, wnikają do wnętrza naczyń krwionośnych jak i wychodzą z nich, a także przekraczają barierę krew-mózg. Są one w tym względzie wyjątkowe – potrafią sprawnie poruszać się i wnikać do bardzo różnorodnych tkanek wielu gatunków ssaków, kręgowców i bezkręgowców [22, 23].

Pierwsze badania ruchu komórek bakteryjnych, koncentrowały się na zdolności poruszania się krętków w środowisku płynnym, obecnie coraz częściej zwraca się uwagę na ich ruch w substancji znajdującej się w przestrzeniach międzykomórkowych zarówno ssaków jak i kleszczy [3]. Stwierdzono, że krętki poruszają się z większą szybkością po podłożach stałych niż w środowisku płynnym.

Ruch krętków jest złożony, składający się z występujących jednocześnie kilku jego rodzajów. Harman i wsp. [7] badając ruch krętków w macierzy międzykomórkowej skóry myszy, opisali dwa różne stany – fazę stacjonarną ruchliwych krętków, w której komórki są w ruchu określanym jako falujący (*wriggling*) ale nie zmieniają położenia i drugi stan, w którym krętki wykonują ruchy skokowe (*lunging*). W jednym i w drugim przypadku, jeden koniec komórki jest związany z podłożem, określanym jako swego rodzaju adhezja. Inna populacja krętków, w tych samych warunkach może przemieszczać się wykonując ruchy wyginające (*flexing*), w sposób podobny do ruchów w środowisku płynnym. Krętki mogą przechodzić z jednego stanu w drugi, z tym że trzy opisane formy ruchu występują tylko na podłożach stałych. Natomiast w środowisku płynnym komórki poruszają się wykonując jedynie ruchy wyginające się.

Badając wyjątkową ruchliwość krętków i jej mechanizm zwrócono uwagę, że patogenezą wywoływanych przez te bakterie chorób jest ściśle związana z ich ruchem. Brak ruchu krętków jest jednoznaczny z utratą przez nie żywotności [15]. Stwierdzono, że podane myszom śródskórnie, pozbawione zdolności ruchu mutanty *B. burgdorferi* nie były w stanie uciec z naczyń krwionośnych i były eliminowane z ustroju w ciągu 24–48 godzin [14].

Na podstawie badań fragmentów genomu krętków stwierdzono, że poznane sekwencje zawierają zespoły genów kodujących organelle umożliwiające komórkom różnego typu poruszanie się. Przypuszcza się ponadto, że są one ściśle powiązane z genami zawierającymi układ sygnalizujący chemotaksję, który kieruje ruchem rzęsek, prowadząc w ten sposób do skoordynowanych i ukierunkowanych ruchów.

### 3.2. Chemotaksja i adhezja

Krętki wywołujące boreliozę z Lyme wykazują swoisty tropizm do różnych tkanek, który może być szczepowo bądź gatunkowo swoisty, np. *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* i *B. afzelii*, trzy główne chorobotwórcze genogatunki krętków odpowiedzialne za boreliozę z Lyme, wywołują tylko częściowo takie same objawy kliniczne. Stwierdzono, że genogatunek *Borrelia burgdorferi* sensu stricto jest ściśle związany z rozwojem boreliozy stawowej (*Lyme arthritis*), *B. garinii* wywołuje neuroboreliozę, *B. afzelii* była izolowana przede wszystkim z późnych zmian skórnych (ACA) [2, 21].

Przyczyna różnego powinowactwa do określonych tkanek (tropizm) i ciężkość przebiegu choroby nie jest w pełni poznany i zrozumiały. Występowanie określonych czynników zjadliwości u badanych szczepów *B. burgdorferi* s.s. jest różne, wskazując na swoistość szczepowo-zależną [9].

Krętki, aby móc skolonizować wiele różnych tkanek wytwarzają struktury mające zdolność rozpoznawania charakterystycznych cząsteczek i ich ugrupowań – miejsc receptorowych na powierzchni tkanek docelowych gospodarza. Krętki *Borrelia burgdorferi* s.l. wytwarzają na swojej powierzchni liczne białka-adhezyny: DbpA, DbpB, Bgp, BBK32, P66, które łączą się z odpowiednimi receptorami, umożliwiające im rozpoznanie różnych składników macierzy i adhezję do różnych komórek ssaków [2, 4, 5].

W macierzy pozakomórkowej, zawierającej kolagen, występuje powszechnie proteoglikan (36 kDa), zaliczany do grupy SLRP (small leucine-rich proteoglycan, małe proteoglikany zasobne w leucynę), uczestniczący w tworzeniu architektury macierzy; hamuje tworzenie włókien kolagenu oraz proliferację komórek, reguluje ich migrację. N-koniec rdzenia białkowego dekoryny wiąże łańcuch kwasu hialuronowego lub siarczanu dermatanu (GAG), centralna część składa się z dziewięciu powtórzeń sekwencji bogatej w leucynę i asparaginian, w części C-końcowej znajdują się dwie reszty cysteiny. Dekoryna tworzy połączenia z kolagenem, głównie typu II, z fibronektyną, trombospondyną i z TGF- $\beta$ . Kompleks z kolagenem służy jako miejsce adhezji krętków, wywołujących boreliozę z Lyme.

Adhezja bakteryjnych patogenów do komórek lub macierzy zewnątrzkomórkowej tkanek docelowych gospodarza następuje przez powierzchniowe adhezyjne białkowe i jest uważana za ważny początkowy etap kolonizacji tkanek. Krętki *Borrelia* spp. mają geny kodujące wytwarzanie wielu adhezyn, które jak stwierdzono rozpoznają różne elementy macierzy i w ten sposób mogą powodować wiązanie się do różnych rodzajów komórek ssaków. Dwa spokrewnione ze sobą białka – białko A i B wiążące dekorynę (DbpA i DbpB, Decorin-binding protein A, B) łączą się zarówno z dekoryną jak i siarczanem dermatynu. Sekwencja DbpB jest wysoce konserwatywna w różnych szczepach podczas gdy DbpA jest wysoce polimorficzna, z podobieństwem pomiędzy badanymi szczepami nie przekraczającym 58%. Krętki *B. burgdorferi*, które nie wytwarzają DbpA i DbpB, wykazują ograniczoną zdolność rozprzestrzeniania się w ustroju myszy i kolonizacji ich tkanek, a także 3–4-krotny wzrost ID<sub>50</sub> co wskazuje, że adhezyny te mają znaczenie w rozwoju zakażenia [13].

Białko wiążące dekorynę (DbpA) jest adhezyną, której struktura może być różna u poszczególnych szczepów. Uważa się, że determinuje ona szczepowo swoiste powinowactwo do różnych tkanek [13].

Badając tropizm szczepów *B. burgdorferi* zawierających różne allele *dbpA* porównywano właściwości alleli *dbpA* szczepu VS461 *B. afzelii*, szczepu N40-D10/E9 *B. burgdorferi* s.s. i szczepu PBr *B. garinii*.

Zaobserwowano, że DpbA szczepu N40-D10/E9 *B. burgdorferi* s.s., wykazujący najslabszą aktywność

wiązania dekoryny i GAG jednocześnie powoduje masyną kolonizację chrząstki stawowej i w konsekwencji zapalenie stawów. Wydaje się, że allel *dpbA* występujący w szczepie N40-D10/E9 jest jedynym, który determinuje występowanie objawów stawowych. Stwierdzono istnienie zależności – im większa aktywność wiązania DbpA z dekoryną i sierczanem dermatanu tym silniejsza kolonizacja mięśnia serca i najcięższy *carditis* [13].

Z badań tych wynika, że allele *dpbA* wpływają na kolonizację i wystąpienie allelo-zależnych objawów boreliozy z Lyme oraz etiologię różnych objawów klinicznych związanych z różnymi szczepami *B. burgdorferi* s.l.

### 3.3. Reakcje autoimmunologiczne

Obserwowane zaburzenia rytmu serca oraz bloki układu przewodzącego serca mogą być związane z przewlekłym zakażeniem, a także z reakcjami autoimmunologicznymi indukowanymi przez antygeny krętków. Objawy boreliozy z Lyme, takie jak *Lyme arthritis* czy *Lyme carditis* mogą być u niektórych chorych związane z reakcjami autoimmunologicznymi wywołanymi mimikrą molekularną pomiędzy krętkiem *B. burgdorferi* a własnymi składnikami tkanek i narządów. Białko powierzchniowe OspA jest lipoproteiną wykazującą znaczną zmienność antygenową. Odpowiedź immunologiczna na zakażenie *B. burgdorferi* prowadzi do wytworzenia odpowiedzi przeciw OspA, która może być zarówno korzystna jak i szkodliwa. Wykazano bowiem, że surowice myszy zakażonych tymi krętkami reagują zarówno z białkami bakterii oraz miozyną [17].

W reakcjach tych ma znaczenie zarówno podobieństwo sekwencji aminokwasów jak struktura drugorzędowa białka. Zależnie od genogatunku wyróżnia się osiem typów OspA. W szczepach należących do genogatunku *B. burgdorferi* s.s. występuje 1 typ (typ 1), *B. afzeli* – również 1 (typ 2) i *B. garini* – 6 typów (typ 3–8) [21].

Jak stwierdzono istnieją także krzyżowo reagujące epitopy ludzkich neuronów, mające wspólne sekwencje aminokwasów z białkiem OspA *B. burgdorferi*. Analiza baz danych DNA uzyskanych poprzez odwrotną transkrypcję matrycy mRNA umożliwiła znalezienie trzech identycznych sekwencji w białku OspA [1]. Przeciwciała dla dwóch z tych peptydów reagowały również z neuronami ludzkiego mózgu, rdzenia kręgowego i zwojami korzeni grzbietowych.

## 4. Podsumowanie

Mechanizm oddziaływania krętków *B. burgdorferi* sensu lato na organizm gospodarza i powstawanie określonych objawów ze strony różnych narządów zarówno człowieka oraz innych ssaków, nie jest w pełni wyjaśniony. Konieczne są dalsze badania obejmujące

zarówno charakterystykę szczepów wywołujących zakażenie, tak aby można było poznać przyczyny i mechanizm zajęcia określonych układów i narządów, jak i odpowiedź immunologiczną na zakażenie *B. burgdorferi* sensu lato, w tym procesy korzystne w zwalczaniu zakażenia oraz szkodliwe, autoimmunologiczne prowadzące do uszkodzenia zakażonych narządów.

## Piśmiennictwo

- Alaedini A., Latov N.: Antibodies against OspA epitopes of *Borrelia burgdorferi* cross-react with neural tissue. *J. Neuroimmunol.* **159**, 192–195 (2005)
- Antonara S., Ristow L., Coburn J.: Adhesion mechanisms of *Borrelia burgdorferi*. *Adv. Exp. Med. Biol.* **715**, 35–49 (2011)
- Chmielewski T., Tylewska-Wierzbanowska S.: Interactions between *Borrelia burgdorferi* and mouse fibroblasts. *Pol. J. Microbiol.* **59**, 157–160 (2010)
- Coburn J., Cugini C.: Targeted mutation of the outer membrane protein P66 disrupts attachment of the Lyme disease agent, *Borrelia burgdorferi*, to integrin alphavbeta3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 7301–7306 (2003)
- Coburn J., Leong J., Chaconas G.: Illuminating the roles of the *Borrelia burgdorferi* adhesins. *Trends. Microbiol.* **21**, 372–379 (2013)
- Cox J., Krajden M.: Cardiovascular manifestations of Lyme disease. *Am. Heart J.* **122**, 1449–1455 (1991)
- Harman M. W., Dunham-Ems S.M., Caimano M.J., Belperon A.A., Bockenstedt L.K., Fu H.C., Radolf J.D., Wolgenmuth C.W.: The heterogeneous motility of the Lyme disease spirochete in gelatin mimics dissemination through tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 3059–3064 (2009)
- Kandolf R.: Myokarditis-Diagnostik. *Dtsch. Med. Wschr.* **136**, 829–835 (2011)
- Kraiczy P., Skerka C., Brade V., Zipfel P.F.: Further characterization of complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **69**, 7800–7809 (2001)
- Kubánek M., Šramko M., Berenová D., Hulínská D., Hrbáčková H., Malušková J., Lodererová A., Málek I., Kautzner J.: Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in endomyocardial biopsy specimens in individuals with recent-onset dilated cardiomyopathy. *Eur. J. Heart. Fail.* **14**, 588–596 (2012)
- Kühl U., Schultheiss H.P.: Myocarditis: early biopsy allows for tailored regenerative treatment. *Dtsch. Arztebl. Int.* **109**, 361–368 (2012)
- Lelovas P., Dontas I., Bassiakou E., Xanthos T.: Cardiac implications of Lyme disease, diagnosis and therapeutic approach. *Int. J. Kardiol.* **129**, 15–21 (2008)
- Lin Y.-P., Benoit V., Yang X., Martinez-Herranz R., Pal U., Leong J.M.: Strain-specific variation of the decorin-binding adhesion DbpA influence the tissue tropism of the Lyme disease spirochetes. *PLOS Pathogens*, **10**, 1–14 (2014)
- Moriarty T.J., Norman M.U., Colarusso P., Bankhead T., Kubes P., Chaconas G.: Real-time high resolution 3D imaging of the Lyme disease spirochete adhering to and escaping from the vasculature of a living host. *PLOS Pathogens*, **4**, 1–13 (2008)
- Motalabed M. A., Liu J., Wooten R.M.: Spirochetal motility and chemotaxis in the natural enzootic cycle and development of Lyme disease. *Curr. Opin. Microbiol.* **28**, 106–113 (2015)
- Palecek T., Kuchynka P., Hulinska D., Schramlova J., Hrbáčková H., Vitkova I., Simek S., Horak J., Louch W.E., Linhart A.: Presence of *Borrelia burgdorferi* in endomyocardial biopsies in



- patients with new-onset unexplained dilated cardiomyopathy. *Med. Microbiol. Immunol.* **199**, 139–143 (2010)
17. Raveche E.S., Schutzer S.E., Fernandes H., Bateman H., McCarthy B.A., Nickell S.P., Cunningham M.W.: Evidence of *Borrelia* autoimmunity-induced component of Lyme carditis and arthritis. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 850–856 (2005)
  18. Scheffold N., Hercommer B., Kandolf R., May A.E.: Lyme carditis—diagnosis, treatment and prognosis. *Dtsch. Arztebl. Int.* **12**, 202–208 (2015)
  19. Stanek G., Klein J., Bittner R., Glogar D.: Isolation of *Borrelia burgdorferi* from the myocardium of a patient with longstanding cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* **322**, 249–252 (1990)
  20. Steere, A.C., Batsford W.P., Weinberg M., Alexander J., Berger H.J., Wolfson S., Malawista S.E.: Lyme carditis: cardiac abnormalities of Lyme disease. *Ann. Intern. Med.* **93**, 8–16 (1980)
  21. Strle F., Stanek G.: Clinical manifestations and diagnosis of Lyme borreliosis. *Curr. Probl. Dermatol.* **37**, 51–110 (2009)
  22. Sultan S.Z., Manne A., Stewart P.E., Ross P.A., Charon N.W., Motaleb M.A.: Motility is crucial for infectious life cycle of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **81**, 2012–2021 (2013)
  23. Sultan S.Z., Sekar P., Ahao X., Manne A., Liu J., Wooten M.R., Motaleb M.A.: Motor rotaton is essential for formation of the periplasmic flagellar ribbon, cellular morphology, and *Borrelia burgdorferi* persistence within *Ixodes scapularis* tick and murine hosts. *Infect. Immun.* **83**, 1765–1777 (2015)
  24. Tylewska-Wierzbanowska S., Chmielewski T.: Borelioza (choroba z Lyme) (w) Choroby zakaźne i pasożytnicze—epidemiologia i profilaktyka, red. A. Baumann-Popczyk, M. Sadkowska-Todys, A. Zieliński, α-medica press, Bielsko-Biała, 2014, s. 38–44
  25. van der Linde M.R.: Lyme carditis: clinical characteristics of 105 cases. *Scand. J. Infect. Dis.* **77** (Suppl III), 81–84 (1991)
  26. Wolgemuth C.W.: Flagellar motility of the pathogenic spirochetes. *Sem. Cell Dev. Biol.* **46**, 104–112 (2015)

Natalia Łanocha-Arendarczyk<sup>1</sup>, Danuta Kosik-Bogacka<sup>1\*</sup>, Katarzyna Galant<sup>2</sup>,  
Wojciech Zaorski<sup>1</sup>, Karolina Kot<sup>1</sup>, Aleksandra Łanocha<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Medycznej, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

<sup>2</sup>Zakład Mikrobiologii i Diagnostyki Immunologicznej, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

<sup>3</sup>Klinika Hematologii i Transplantologii, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Przysłano w sierpniu 2016 r.

Zaakceptowano we wrześniu 2016 r.

1. Wstęp. 2. Budowa morfologiczna i rozwój pasożytów. 3. Występowanie pełzaków wolno żyjących w środowisku. 4. Chorobotwórczość pełzaków z „grupy limax”. 4.1. Przewlekłe ziarniniakowe zapalenie mózgu (GAE). 4.2. Pełzakowe zapalenie rogówki oka (AK). 4.3. Pierwotne zapalenie mózgu i opon mózgowo-rdzeniowych (PAM). 5. Podstawy diagnostyki zarażeń wywołanych przez pełzaki wolno żyjące. 5.1. Badania bezpośrednie. 5.2. Badanie płynu mózgowo-rdzeniowego. 5.3. Badania wymazu lub biopsji pobranego ze zmian w narządach. 5.4. Metody hodowlane. 5.5. Diagnostyka molekularna. 6. Leczenie. 7. Pełzaki jako wektory chorobotwórczych drobnoustrojów. 8. Podsumowanie

### Pathogenic free-living amoeba

**Abstract:** Invasions caused by free-living and parasitic limax amoeba can pose a major threat to human health and life. The amoeba from the genera *Acanthamoeba* and *Naegleria* as well as the following species: *Sappina diploidea*, *S. pedata*, *Balamuthia mandrillaris*, and probably *Hartmannella vermiformis*, are the major cause of primary amoebic meningoencephalitis (PAM), granulomatous amoebic encephalitis (GAE) and amoebic keratitis (AK). Furthermore, free-living amoeba can be vectors of bacteria, including *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* and *Mycobacterium tuberculosis*. There is a need for more research on free-living amoeba invasions in humans, particularly on the methods of diagnosis and appropriate forms of pharmacological therapy. Despite the undeniable role of free-living amoeba in the transmission of pathogenic bacteria, there is still insufficient amount of research and optimal diagnostic methods to identify the mechanisms of penetration, proliferation and exocytosis of many pathogenic microorganisms.

1. Introduction. 2. Morphology and growth of parasites. 3. Presence of free-living amoeba in the environment. 4. Pathogenicity of limax amoeba. 4.1. *Granulomatous amoebic encephalitis* (GAE). 4.2. *Acanthamoeba keratitis* (AK). 4.3. *Primary amoebic meningoencephalitis* (PAM). 5. Basic diagnosis of infections caused by free-living amoeba. 5.1. Direct testing. 5.2. Cerebral spinal fluid analysis. 5.3. Smear test or biopsy of abnormal tissue. 5.4. Proliferation methods. 5.5. Molecular diagnostics. 6. Treatment. 7. Amoeba as vectors of pathogenic microorganisms. 8. Summary

**Słowa kluczowe:** *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri*, wektory bakterii

**Key words:** *Acanthamoeba* sp., *Naegleria fowleri*, vectors of bacteria

## 1. Wstęp

Zagrożeniem dla zdrowia i życia różnych żywicieli są gatunki, które mogą prowadzić zarówno wolno żyjący jak i pasożytniczy tryb życia. Do takich ewolucyjnie młodych pasożytów należą pierwotniaki z gromady Rhizopoda, określane mianem pełzaków z „grupy limax” ze względu na ślimakopodobny charakter pseudopodiów [26]. Do tej grupy zaliczane są: ameby z rodzaju *Acanthamoeba* i *Naegleria* oraz gatunki: *Sappina diploidea*, *S. pedata* oraz *Balamuthia mandrillaris*. Prawdopodobnie także gatunek *Hartmannella vermiformis* oraz inne wolno żyjące ameby o właściwościach termofilnych stanowią zagrożenie dla zdrowia człowieka [23].

## 2. Budowa morfologiczna i rozwój pasożytów

Pełzaki z „grupy limax” występują powszechnie w środowisku naturalnym prowadząc wolno żyjący tryb życia (egzoicyczny), ale w sprzyjających warun-

kach mogą stać się organizmami endoicycznymi (fakultatywnymi patogenami) [23]. Dla tego rodzaju strategii życiowej, umiejętności przeżycia zarówno wewnątrz organizmu jak i poza żywicielem, Page w 1974 roku wprowadził termin: pełzaki amfizoiczne. Zastąpił on używane wcześniej, pojęcie pasożytów „fakultatywnie endoicycznych” [15].

Pełzaki wolno żyjące występują w dwóch formach: trofozoitu i cysty. Trofozoity pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* i gatunku *Balamuthia mandrillaris* występują w formie pełzakowej o średnicy od 13 do 40 µm [28, 41]. Natomiast u przedstawicieli pierwotniaków z rodzaju *Naegleria* obserwowane są dwie postaci trofozoitów, postać pełzakowa (o średnicy 7–20 µm) i wiciowa (10–16 µm). Postaci wiciowe powstają z trofozoitów pełzakowych w niesprzyjających warunkach środowiska, przyjmując kształt gruszkowaty lub owalny. Występowanie tej wegetatywnej formy trofozoitu jest jednym z kryteriów pozwalających na różnicowanie przedstawicieli rodzaju *Acanthamoeba* i *Naegleria* [18,

\* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Medycznej, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, Al. Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin; tel. 91 466 1672, fax: 91 466 1671; e-mail: kodan@pum.edu.pl

27]. Formy dwuwiciowe trofozoitów pełzaków z rodzaju *Naegleria* posiadają właściwości aktywnego ruchu przy użyciu wici, przy czym są to postaci nie odżywiające się i nie namnażające się. Formy te przyczyniają się do rozprzestrzeniania pełzaków w środowisku. Natomiast trofozoity pełzakowe pierwotniaków wolno żyjących poruszają się za pomocą cienkich pseudopodiów, akantopodiów lub lobopodiów. Wygląd nibynózek podczas poruszania się oraz obraz mitotyczny są kryteriami klasyfikacji trofozoitów pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* i *Naegleria*. Różnią się one stosunkiem długości do szerokości pseudopodiów oraz charakterem wypustek cytoplazmatycznych [36].

Cytoplazma trofozoitów pełzaków jest ziarnista, zawiera pojedyncze jądro z dużym, centralnie ułożonym kariosomem, utworzonym z gęstego RNA. W cytoplazmie występuje również pojedyncza wodniczka tętniąca i kilka wodniczek pokarmowych [18]. W ultrastrukturze trofozoitów widoczna jest również gładka i ziarnista siateczka śródplazmatyczna, a także typowy aparat Golgiego.

Zmiana warunków środowiskowych, w tym: zubożenie podłoża w substancje pokarmowe, obniżenie pH otoczenia, zwiększenie bądź obniżenie temperatury, zmiany wilgotności bezpośrednio po fazie wzrostu prowadzi do przekształcenia (encystacji) trofozoitów wolno żyjących w formy przetrwalnikowe (cysty). Encystację poprzedza fagocytoza substancji odżywczych, a także składników budulcowych ściany cysty. Są to formy odporne na działanie wielu czynników fizycznych i chemicznych, a ich średnica zwykle nie przekracza 25 µm. Formy te mogą przetrwać w niskiej temperaturze, są odporne na zmiany wilgotności, wysychanie, promieniowanie ultrafioletowe i zmienne ciśnienie osmotyczne dzięki celulozowej budowie ścian [15]. Jak wykazały badania Kasprzaka [14] cysty *Acanthamoeba* spp. mogą zachowywać żywotność w wodzie destylowanej w temperaturze 4°C przez 25 lat, a cysty *Naegleria* spp. mogą przeżywać w zbliżonych warunkach kilka miesięcy. Cysty pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* nie tracą zdolności inwazyjnych w temperaturze od -20°C do 56°C [17, 18, 41]. Są to formy jednojądrowe, otoczone podwójną otoczką: zewnętrzną silnie pofałdowaną (ektocystą) i gładką wewnętrzną (endocystą), wyraźnie odstającą w kilku miejscach od otoczki zewnętrznej, tworzą strukturę wielościanu lub gwiazdy [40]. Kształt oraz wielkość ektocysty i endocysty stały się podstawą różnicowania pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba*.

Formami inwazyjnymi dla człowieka mogą być zarówno cysty jak i trofozoity pełzaków. Do zarażenia dochodzi najczęściej poprzez inhalację powietrza lub aspirację wody zanieczyszczonych formami inwazyjnymi pierwotniaków [17, 36, 40]. Wrotami inwazji pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba*, oprócz jamy noso-

wej, może być także błona śluzowa jamy ustnej, uszkodzona skóra, rogówka oka oraz śluzówka jelita [14, 33, 36]. Pełzaki mogą migrować wraz z krwiobiegiem do różnych narządów z ognisk pierwotnych w skórze, tkance podskórnej lub płucach. Zarażenie pełzakiem *Naegleria fowleri* następuje zwykle poprzez jamę nosowo-gardłową, następnie trofozoity i cysty dostają się poprzez kość sitową wzdłuż nerwów wzrokowych do ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Do zarażenia tymi pierwotniakami dochodzi najczęściej podczas kąpieli w naturalnych i sztucznych zbiornikach wodnych [26, 28].

### 3. Występowanie pełzaków wolno żyjących w środowisku

Pełzaki z grupy „limax” należą do organizmów kosmopolitycznych, rozprzestrzenionych na całym świecie [41]. Występują one zarówno w sztucznych jak i naturalnych zbiornikach wodnych. Ponadto pełzaki wolno żyjące stwierdzono w wodzie butelkowanej i wodociągowej, płynie do płukania soczewek kontaktowych, wodach wykorzystywanych w przemyśle (m.in. do chłodzenia reaktorów), w urządzeniach klimatyzacyjnych, unitach stomatologicznych, basenach jacuzzi, w glebie, w pożywieniu, w kurzu i piasku pustyni [17, 26]. Pełzaki z grupy „limax” izolowano również z różnych materiałów biologicznych, w tym z hodowli bakterii, komórek ssaków, popłuczyn żołądka i jelit, wydzieliny ropnej z ucha oraz nosogardzieli zdrowych osób [4, 8, 21, 32, 42, 43]. Jednak najczęściej pełzaki amfizoiczne izolowano pośmiertnie z tkanki nerwowej. Pasożyty te były również wykrywane z nabłonka węchowego, płynu mózgowo-rdzeniowego (PMR), płwociny, popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL), fragmentów tkanek zarażonych narządów, takich jak: wątroba, nerki, śledziona, płuca, zeszkrobiny z rogówki oka [8, 26].

W Polsce wirulentne szczepy pełzaków izolowano ze środowiska naturalnego w okolicach Poznania, Lublina, Gdańska i Szczecina [2, 9, 10, 15, 39]. W województwie wielkopolskim szczepy z rodzaju *Acanthamoeba*, wykazujące cechy patogenności dla myszy, wyizolowano z połowy przebadanych wód pobranych z wykorzystywanych rekreacyjnie naturalnych zbiorników wodnych [10]. Derda i Hadaś [9] stwierdzili wolno żyjące pełzaki w wodzie pochodzącej z poznańskich fontann, natomiast Górnik i Kuźna-Grygiel [10] wyizolowały potencjalnie wirulentne szczepy wolno żyjących pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* z naturalnych zbiorników rekreacyjnych Szczecina. Jak dotąd, *B. mandrillaris* i *S. pedata* nie zostały wyizolowane w Polsce, a na terenie Europy i na świecie są bardzo rzadko wykrywane w próbkach pochodzących od pacjentów i ze środowiska [24].

#### 4. Chorobotwórczość pełzaków z „grupy limax”

Pierwsze przypadki inwazji pełzaków wolno żyjących u ludzi opisano w latach 70. ubiegłego wieku w wielu krajach, również europejskich [23]. Biotopem tych pierwotniaków jest najczęściej OUN, a także płuca, wątroba, nerki, skóra oraz rogówka gałki ocznej [18, 20, 23]. Pełzaki z rodzaju *Acanthamoeba* mogą wywoływać ziarniniakowe zapalenie mózgu (*granulomatous amoebic encephalitis* – GAE), pełzakowe zapalenie rogówki oka (*Acanthamoeba keratitis* – AK) oraz zapalenie płuc (*Acanthamoeba pneumonia*). Natomiast inwazja *Naegleria fowleri* może u człowieka przebiegać w postaci pierwotnego zapalenia mózgu i opon mózgowych (*primary amoebic meningoencephalitis* – PAM) [7, 16, 37].

##### 4.1. Przewlekłe ziarniniakowe zapalenie mózgu (GAE)

Pierwszy przypadek GAE opisano w 1972 roku, u osoby dorosłej pochodzącej z Zambii. Do tej pory na świecie odnotowano około 200 przypadków inwazji do OUN.

Okres inkubacji GAE wynosi zwykle około 14 dni, jednak czasami objawy inwazji pojawiają się już po 2 dniach od wnikięcia pasożytów do organizmu żywiciela. Przebieg inwazji jest przewlekły, objawy niespecyficzne, często mylone z zakażeniami bakteryjnymi i wirusowymi, a śmiertelność wynosi 97–98%. Choroba rozpoczyna się nagłym, silnym bólem głowy i szyi, sztywnością karku, dezorientacją, ospałością [40]. U chorych opisywano także halucynacje, drażliwość, trudność mowy, wymioty, gorączkę, zmiany behawioralne oraz śpiączkę. Przewlekłe ziarniniakowe zapalenie mózgu może współtowarzyszyć cukrzycy, chorobom wątroby, nerek i płuc. McKellar [29] opisał przypadek GAE u 51-letniego mężczyzny, który zmarł 3 tygodnie po przeszczepieniu nerki. Pacjent ten przyjmował lekki immunosupresyjny, a od 24 lat chorował na cukrzycę typu 1. W pośmiertnym badaniu histopatologicznym mózgu mężczyzny stwierdzono liczne cysty i trofozoity pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* [29].

Inwazjom pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* sprzyjają: anoreksja, alkoholizm, choroby nowotworowe, chemioterapia, radioterapia, przeszczep narządów, także leczenie steroidami i cytostatykami [34]. W 103 opisanych przypadkach GAE inwazja *Acanthamoeba* spp. rozwinęła się u osób z zaburzonym mechanizmem immunologicznym, przewlekłe chorych, u osób upośledzonych umysłowo i pacjentów przyjmujących leki immunosupresyjne. Wskaźnik śmiertelności u pacjentów zarażonych wirusem HIV wynosi 1,57 zgonów/10 000 [18]. Dlatego GAE zalicza się do inwazji oportunistycznych [18, 34, 42, 45].

##### 4.2. Pełzakowe zapalenie rogówki oka (AK)

Pełzakowe zapalenie rogówki oka wywoływane przez pełzaki z rodzaju *Acanthamoeba* jest przewlekłym schorzeniem gałki ocznej. Na świecie pierwszy przypadek AK został opisany w Teksasie w 1973 roku, natomiast na terenie Europy rok później [44]. Obecnie liczba zachorowań na świecie stale wzrasta, a większość opisywanych przypadków AK dotyczyła osób stosujących soczewki kontaktowe [25]. Stwierdzono, że w Stanach Zjednoczonych AK występuje z częstością 1–2 przypadki na milion użytkowników soczewek [23]. Pełzakowe zapalenie rogówki oka opisywano u pacjentów z mechanicznym uszkodzeniem rogówki [45], w tym u pacjenta po zabiegu refrakcyjnym.

Pełzakowe zapalenie rogówki oka nie jest inwazją oportunistyczną, jednak często stwierdzane jest u pacjentów zakażonych wirusem HIV. Okres inkubacji AK trwa kilka dni. Na początku inwazji u pacjentów opisywano: zaburzenia widzenia, fotofobię oraz silny ból oka nieproporcjonalny do uszkodzenia rogówki, a także obrzęk powiek i spojówki [23]. Charakterystycznym objawem jest pierścieniowaty naciek w centralnej części rogówki połączony z zanikiem keratynocytów [25, 35]. Zmiany te występują zwykle w obrębie jednego oka.

Szybka diagnostyka i podjęcie odpowiedniej, długotrwałej terapii pozwala w pełni przywrócić prawidłowe funkcjonowanie oka, jednak leczenie zaawansowanych zmian rogówki może nie przynieść oczekiwanego rezultatu, a także prowadzić do ślepoty [1].

##### 4.3. Pierwotne zapalenie mózgu i opon mózgowo-rdzeniowych (PAM)

Pierwsze przypadki PAM opisane zostały przez Fowler i Carter w 1965 roku [41]. Następnie 16 przypadków inwazji *N. fowleri* opisali Cerva i Novak [7] u młodych pływaków po kąpielach w basenie z ogrzewaną i chlorowaną wodą w Usti nad Łabą. Kolejnych 300 opisanych przypadków PAM dotyczyło osób mających kontakt z wodą z naturalnych ciepłych źródeł Australii, Nowej Zelandii, Afryki, Indii i południowych stanów USA [36, 42]. Najnowsze doniesienia dotyczące inwazji *N. fowleri* u ludzi pochodzą z Tajlandii, Japonii i Indii [11, 23, 30]. W Europie przypadki PAM opisano na terenie Belgii, Wielkiej Brytanii, Włoch, Niemiec oraz Węgier, a do zarażenia dochodziło poprzez kontakt z wodami zrzutowymi z dużych zakładów przemysłowych oraz naturalnych ciepłych źródeł [11].

Wrotami inwazji *N. fowleri* jest nabłonek wężowy. Do zarażenia dochodzi najczęściej podczas kąpieli w ciepłych zbiornikach wodnych. Stwierdzono, że większość osób zarażonych *N. fowleri* na kilka dni przed wystąpieniem pierwszych objawów PAM pływała w jeziorach lub basenach z ciepłą wodą [23, 26]. Pasożyty te rzadko

spotyka się w słonej wodzie, jednak Żbikowska i wsp. [46] wyizolowali *N. fowleri* z wody o zasoleniu 5% [46].

Pierwotne zapalenie mózgu i opon mózgowo-rdzeniowych nie jest inwazją oportunistyczną, występuje także u potencjalnie zdrowych osób. Najczęściej PAM opisywano u dzieci i młodych mężczyzn do 20. roku życia. Okres inkubacji inwazji jest krótki, wynosi zwykle od 5 do 7 dni, po czym występują niecharakterystyczne objawy: bóle głowy, gorączka 39–40°C, senność, otępienie, dezorientacja, halucynacje, drgawki oraz śpiączka [28, 41]. Do zgonu dochodzi zazwyczaj w ciągu 1–2 tygodni od wystąpienia pierwszych objawów [35].

## 5. Podstawy diagnostyki zarażeń wywołanych przez pełzaki wolno żyjące

Gwałtowny przebieg inwazji, niespecyficzne objawy, zwłaszcza w przypadku PAM, utrudniają dobór odpowiednich badań diagnostycznych celem oceny źródła i etiologii zarażenia [35]. Do diagnostyki inwazji wywołanych przez pełzaki wolno żyjące najczęściej wykorzystuje się materiał biologiczny pochodzący od zarażonych pacjentów, w tym PMR, zeszkrobiny z rogówki oka, BAL oraz fragmenty tkanek i narządów pozyskanych pośmiertnie (Rys. 1) [25].

### 5.1. Badania bezpośrednie

Jedną z metod stosowanych w diagnostyce inwazji pełzaków z „grupy limax” jest badanie mikroskopowe, które umożliwia identyfikację pełzaków, szczególnie z rodzaju *Acanthamoeba*, na podstawie budowy i wielkości cyst. Kryteria morfologiczne cyst i trofozoitów pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* pozwoliły podzielić ameby na trzy grupy:

- 1) z dużymi trofozoitami oraz widoczną odrębnością endocysty od ektocysty, o wielkości cyst od 18 do

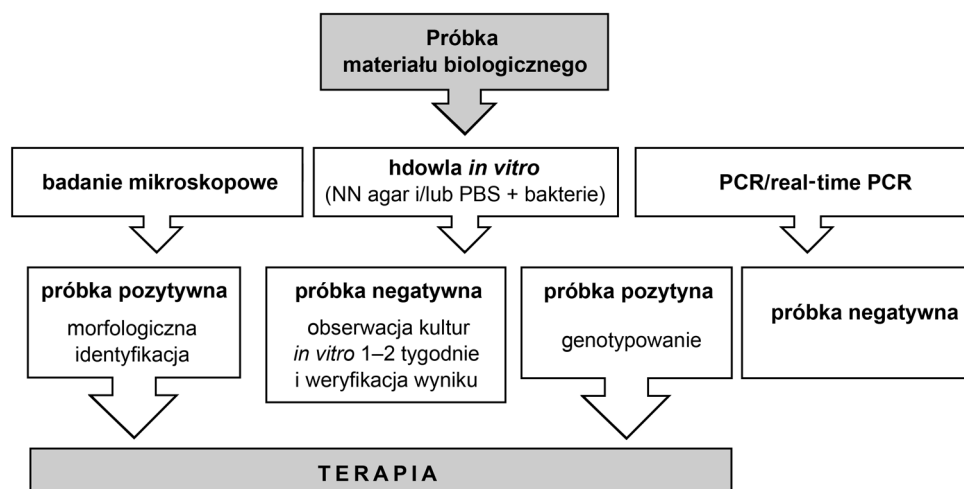
26 µm. Do tej grupy należą 4 gatunki pełzaków: *A. astronyxis*, *A. comandoni*, *A. echinulata* oraz *A. tubiashi*;

- 2) z ektocystami, zarówno grubymi jak i cienkimi, zwykle o kształcie endocyst wielobocznych, trójkątnych lub owalnych, wielkości nie przekraczającej 18 µm. Jest to najliczniejsza grupa, do której należy 11 gatunków: *A. mauritanensis*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. aquina*, *A. divionensis*, *A. triangulata*, *A. lugdunensis*, *A. griffini*, *A. rhysodes*, *A. paradivionensis* oraz *A. hatchetti*;

- 3) z cystami z okrągłą lub jajowatą endocystą oraz gładką lub chropowatą ektocystą o rozmiarach nie przekraczających 18 µm. Do grupy tej należą: *A. palestinensis*, *A. culbertsoni*, *A. royreba*, *A. lenticulata* oraz *A. pustulosa* [13, 18, 36].

### 5.2. Badanie płynu mózgowo-rdzeniowego

U osób zarażonych *N. fowleri* płyn mózgowo-rdzeniowy ma barwę szarą, przechodzącą w żółto-białą. Liczba erytrocytów początkowo jest nieznaczna, w miarę postępowania choroby wzrasta do 25000/mm<sup>3</sup>. Podobnie liczba leukocytów w początkowym okresie inwazji wynosi około 300/mm<sup>3</sup>, następnie wzrasta do 26000/mm<sup>3</sup>. W płynie mózgowo-rdzeniowym obserwowana jest pleocytoza, w przypadku PAM – leukocytów wielojądrzastych, natomiast GAE – limfocytów [11]. Poziom glukozy jest niski, podobnie jak w przypadku bakteryjnego zapalenia opon mózgowych, natomiast poziom białek jest podwyższony, zarówno w PAM jak i GAE; wynosi od 75 do 970 mg/100 mm<sup>3</sup>. U osób zarażonych pełzakami z rodzaju *Acanthamoeba* w płynie mózgowo-rdzeniowym stwierdza się podwyższony poziom gammaglobulin. Pełzaki z rodzaju *Naegleria* można stwierdzić w odwirowanym płynie mózgowo-rdzeniowym w badaniu bezpośrednim. Odwirowany płyn mózgowo-rdzeniowy ocenia się przy pomocy



Rys. 1. Algorytm postępowania diagnostycznego w inwazjach wywołanych przez pełzaki z rodzaju *Acanthamoeba* [24]

Tabela I  
Porównanie technik analizy DNA używanych w diagnostyce pełzaków z grupy „limax” [23]

Metoda	Znaczenie	Wady metody
PCR-RFLP	Wykrywanie polimorfizmu genetycznego, którego przyczyną jest zmienność mutacyjna miejsc restrykcyjnych, rozpoznawanych przez nukleazę restrykcyjną w obrębie amplifikowanej sekwencji	Ze względu na dużą liczbę genotypów analiza wymaga zastosowania wielu enzymów restrykcyjnych, co powoduje następujące zwiększenie kosztów i wydłużenie czasu badania; nie zawsze pozwala odróżnić niektóre szczepy
PCR-RAPD	Losowa amplifikacja fragmentów DNA o zróżnicowanych masach molekularnych	Wymaga jednego startera o krótkiej sekwencji, niskiej temperatury przyłączenia startera; mała powtarzalność metody; na wynik mogą wpływać czynniki środowiska, w tym temperatura otoczenia
PCR – Real Time	Wykorzystuje techniki fluorescencyjne, umożliwia monitorowanie reakcji w każdym cyklu w czasie rzeczywistym, jest metodą szybką i czułą	Mała liczba protokołów, które pozwalają na wykrycie nielicznych genotypów pełzaków z rodzaju <i>Acanthamoeba</i>

mikroskopu świetlnego z wykorzystaniem barwienia hematoksyliną żelazistą, Giemsa lub Wrighta [40]. Ilość pełzaków w płynie mózgowo-rdzeniowym waha się w granicach 10–100/mm<sup>3</sup> [11, 18, 36].

### 5.3. Badania wymazu lub bioptatu pobranego ze zmian w narządach

Badanie wymazu oraz zeskrubin pobranych z rogówki oka jest jedną z metod stosowanych w diagnozowaniu AK. Wykorzystywane są również metody wizualizacji pełzaków w rogowce oka przy zastosowaniu mikroskopu konfokalnego oraz metody immunofluorescencyjne [9, 44].

Podobnie jak w przypadku badania płynu mózgowo-rdzeniowego, stosuje się metody bezpośrednio z wykorzystaniem barwienia hematoksyliną i eozyną [11, 41, 42]. Ocenia się cechy morfologiczne widocznych trofozoitów, w tym: kształt, charakter nibynózek, obecność lub brak wodniczek tętniących oraz charakterystykę morfologiczną cyst: kształt ekto- i endocysty, pofałdowanie ściany.

### 5.4. Metody hodowlane

Podstawowym podłożem stosowanym do izolacji i hodowli pełzaków wolno żyjących jest 2% NN Agar (non-nutrient agar) pokryty zawiesiną bakterii, np. *Escherichia coli* lub *Enterobacter aerogenes*. Po nanieśieniu badanego materiału, płytki inkubuje się w temperaturze 37°C i 45°C. Zalecane jest także wirowanie materiału przed wykonaniem posiewu [9, 18, 26, 36]. Oprócz podłoża NN Agar stosuje się również podłoże z bulionem mięsny (zawiera 0,5–2% peptonu) pokryte także bakteriami *E. coli* lub *E. aerogenes*. Do hodowli *in vitro* wykorzystywane są również podłoża agarowe lub płynne cechujące się wybiórczością dla pełzaków z grupy „limax” np. podłoże Singha, Neffa, Culbertsona, Schustera, Nelsona i Červy [9]. Do izolacji gatunku *Balamuthia mandrillaris*, który nie wzrasta na podłożach agarowych, stosuje się hodowle komórkowe [35].

### 5.5. Diagnostyka molekularna

Analiza molekularna umożliwia szybkie i dokładne oznaczenie gatunku oraz genotypu szczepu pełzaków wolno żyjących oraz określenie lekooporności pasożyta. W diagnostyce wykorzystuje się wiele metod, m.in. łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) i jej modyfikacje: losową amplifikację polimorficznych fragmentów DNA (PCR-RAPD), analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych DNA (PCR-RFLP) jądrowego, mitochondrialnego oraz PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR) [1, 17, 19, 31, 40]. Charakterystykę metod molekularnych stosowanych w diagnostyce zarażeń pełzakami wolno żyjącymi przedstawiono w Tabeli I.

Początkowy podział pełzaków z grupy „limax” opierał się tylko na sekwencjonowaniu całego genu. Do tej pory opisano 20 genotypów pełzaków, którym nadano nazwy od T1 do T20 [35]. Stwierdzono, że ponad 95% pełzaków wywołujących AK, klasyfikowane jest jako genotyp T4 [18, 23]. Genotyp ten stwierdzany był w materiale pobranym od 80% pacjentów z inwazjami mózgowymi, płucnymi i skórnymi [35]. W 2009 roku na terenie Pomorza Zachodniego Łanocha i wsp. opisali genotyp T16, o nieokreślonych jak dotąd właściwościach chorobotwórczych, przy czym niewykluczone, że mógł on być związany z atypowym zapaleniem płuc u pacjentów z obniżoną odpornością [20].

### 6. Leczenie

Leczenie inwazji wywołanych przez pełzaki wolno żyjące stanowi jeden z kluczowych problemów parazytologii lekarskiej. Gwałtowność przebiegu tych inwazji oraz niedoskonałość metod diagnostycznych utrudniają dobranie odpowiednich form terapii farmakologicznej [11, 18, 40]. Stosowanie antybiotyków, w tym penicyliny, chloromycetyny, tetracyklin oraz streptomycyny w leczeniu inwazji wywołanych przez pełzaki z „grupy limax” okazało się nieskuteczne, podobnie jak chlorochiny, metronidazolu i chloroheksydyny,

stosowanych w leczeniu inwazji wywołanych przez inne pełzaki (np. pełzaka czerwonej *Entamoeba histolytica*) [18]. W oparciu o badania eksperymentalne stwierdzono, że szczepy *Naegleria* są wrażliwe na amfoterycynę B oraz chlorochinę. Ponadto stwierdzono wrażliwość niektórych izolatów *Acanthamoeba* na chlorheksydynę [6]. Nadal jednak, lekiem z wyboru pozostaje amfoterycyna B, w leczeniu GAE stosowane są pochodne azolowe (itakonazol, ketokonazol, flukonazol) z flucytozyną [12].

## 7. Pełzaki jako wektory chorobotwórczych drobnoustrojów

Wolno żyjące pełzaki posiadają zdolność transmisji drobnoustrojów powodujących zakażenia zarówno u pacjentów ambulatoryjnych jak i hospitalizowanych. Pierwotniaki te, podobnie jak „konie trojańskie”, stanowią rezerwuuar patogenów, szczególnie tych związanych ze środowiskiem wodnym. Pełzaki są wektorem bakterii dodatkowo chroniąc drobnoustroje przed niesprzyjającymi warunkami środowiskowymi i czynnikami chemicznymi, takimi jak np. biocydy [22]. Dotychczas stwierdzono, że w populacjach pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* izolowanych ze środowiska, około 25% jest wektorami bakterii.

Do gatunków uznanych za bakterie endosymbiotyczne, których gospodarzem są wolno żyjące ameby zalicza się m.in. najczęstsze czynniki etiologiczne zakażeń dróg oddechowych, zwłaszcza wśród pacjentów z obniżoną odpornością: *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Mycobacterium tuberculosis*. Innymi gatunkami o dużym potencjale chorobotwórczym są: *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* ser. Typhimurium, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, a także wirusy: Coxsackie, Adenowirusy, Echowirusy i grzyby: *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatidis*, *Sporothrix schenckii*, *Histoplasma capsulatum* [35, 38].

Przykład symbiozy występującej pomiędzy wolno żyjącymi pełzakami a bakteriami najlepiej został opisany dla gatunku *L. pneumophila*. Po wnikięciu do wnętrza komórki pierwotniaka bakterie wydzielają białka oddziałujące na struktury komórkowe pełzaka, np. retikulum endoplazmatyczne. W efekcie tworzą się wakuole (LCV – Legionella-containing vacuoles), będące miejscem namnażania się drobnoustrojów. *L. pneumophila* może wykorzystywać substancje odżywcze ameby i ulegać urzęsieniu, co zwiększa potencjał chorobotwórczy bakterii. Mechanizm uwalniania się drobnoustrojów z pełzaków nie został dokładnie poznany. Uważa się, że

zdolność do egzocytozy uwarunkowana jest obecnością dwóch białek bakteryjnych – LepA i LepB [5].

Inaczej droga wnikania patogenu wygląda w przypadku prątków, takich jak: *M. tuberculosis* i *Mycobacterium marinum*. Endocytozę umożliwia system sekrecyjny typu VII-ESX-1, występujący u wszystkich prątków. Endosymbiotyczne szczepy *M. marinum* mogą tworzyć dodatkowo ogony aktywne umożliwiające ucieczkę z fagosomu [5].

Bakterie jako endosymbionty wolno żyjących pełzaków nie są wykrywane w rutynowej diagnostyce. Metody ich detekcji pozostają słabo poznane i ograniczone. Stosuje się barwienie metodą Giemsy bądź metodę Ziehl-Neelsena w przypadku bakterii kwasoopornych. Bardzo dobre narzędzie stanowią obecnie metody molekularne, umożliwiające wykrycie zarówno DNA bakteryjnego jak i pełzaka. Zastosowanie specyficznych starterów pozwala na identyfikację gatunkową wyizolowanych patogenów [22].

## 8. Podsumowanie

Pełzaki, występujące powszechnie w różnych środowiskach mogą prowadzić zarówno wolno żyjący jak i pasożytniczy tryb życia. Na zarażenie narażone są szczególnie osoby z obniżoną odpornością, których sukcesywnie przybywa.

Dalsze badania dotyczące inwazji pełzaków wolno żyjących u ludzi wymagają opracowania/rozwinęcia metod diagnostycznych oraz form terapii farmakologicznej, a także dokładniejszego określenia mechanizmów wnikania, namnażania i egzocytozy wielu gatunków chorobotwórczych drobnoustrojów, transmitowanych przez ameby.

## Piśmiennictwo

- Alves J.M., Gusmão C.X., Teixeira M.M., Freitas D., Foronda A.S., Affonso H.T.: Random amplified polymorphic DNA profiles as a tool for the characterization of Brazilian keratitis isolates of the genus *Acanthamoeba*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **33**, 19–26 (2000)
- Befinger M., Myjak P., Pietkiewicz H.: Occurrence of amphizoic amoebae in lake Żarnowieckie. *Bull. Inst. Mar. Trop. Med.* **37**, 3–4 (1986)
- Behera H.S., Satpathy G., Tripathi M.: Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* spp. from *Acanthamoeba* meningitis/meningoencephalitis (AME) patients in India. *Parasit. Vectors*, **9**, 442 (2016)
- Berger P., Papazian L., Drancourt M., La Scola B., Auffray J.-P., Raoult D.: Ameba-associated microorganism and diagnosis of nosocomial pneumonia. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 248–255 (2006)
- Cateau E., Delafont V., Hechard Y., Rodier M.H.: Free-living amoebae: what part do they play in healthcare-associated infections? *J. Hosp. Infect.* **87**, 131–140 (2014)
- Chomicz L., Żebrowska J., Starościak B., Piekarczyk J., Fiedor P., Zawadzki P., Mazurkiewicz M., Konopka M.: Badania nad amfizoicznymi amebami pierwotnie wolnożyjącymi – biotyczne

- i abiotyczne uwarunkowania zagrożeń dla ludzkiego zdrowia. *Med. Dydak. Wychow.* **35**, 34–39 (2003)
7. Červa L.: Laboratory diagnosis of primary amoebic meningo-encephalitis and methods for the detection of „limax” amoebae in the environment. *Folia Parasitol.* **27**, 1–9 (1980)
  8. De Jonckheere J. F., Michel R.: Species identification and virulence of *Acanthamoeba* strains from human nasal mucosa. *Parasitol. Res.* **74**, 314–316 (1988)
  9. Derda M., Hadaś E., Wojtkowiak-Giera A., Wojt W.J., Cholewiński M., Skrzypczak Ł.: Występowanie pełzaków pierwotnie wolnożyjących w fontannach. *Probl. Hig. Epidemiol.* **94**, 147–150 (2013)
  10. Górnik K., Kuźna-Grygiel W.: Presence of virulent strains of amphizoic amoebae in swimming pools of the city of Szczecin. *Ann. Agric. Environ. Med.* **11**, 233–236 (2004)
  11. Grace E., Asbill S., Virga K.: *Naegleria fowleri*: pathogenesis, diagnosis, and treatment options. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 6677–6681 (2015)
  12. Gupta R., Parashar M.K., Kale A.: Primary Amoebic Meningo-encephalitis. *J. Assoc. Physicians India.* **63**, 69–71 (2015)
  13. Ithoi I., Ahmad A.-F., Mak J.W., Nissapatorn V., Lau Y.-L., Mahmud R.: Morphological characteristics of developmental stages of *Acanthamoeba* and *Naegleria* species before and after staining by various techniques. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* **6**, 1327–1338 (2011)
  14. Kasprzak W., Mazur T.: Free-living Amoebae Isolated from Waters Frequented by People in the Vicinity of Poznań, Poland. Experimental Studies in Mice on the Pathogenicity of the Isolates. *Z. Tropenmed Parasit.* **123**, 391–398 (1972)
  15. Kasprzak W., Mazur T., Rucka A.: Studies on some pathogenic strains of free-living amoebae isolated from lakes in Poland. *Ann. Soc. Belge. Méd. Trop.* **54**, 351–357 (1974)
  16. Kaushal V., Chhina D.K., Kumar R., Pannu H.S., Dhooira H.P.S., Chhina R.S.: *Acanthamoeba* Encephalitis. *Indian J. of Medical Microbiol.* **26**, 182–184 (2008)
  17. Khan N.A., Paget T.A.: Molecular tools for speciation and epidemiological studies of *Acanthamoeba*. *Curr. Microbiol.* **44**, 444–449 (2002)
  18. Khan N.A.: *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 564–595 (2006)
  19. Kong H.H.: Molecular phylogeny of *Acanthamoeba*. *Korean J. Parasitol.* **47**, Suppl: S21–S28 (2009)
  20. Lanocha N., Kosik-Bogacka D., Maciejewska A., Sawczuk M., Wilk A., Kuźna-Grygiel W.: The occurrence *Acanthamoeba* (free living amoeba) in environmental and respiratory samples in Poland. *Acta Protozool.* **48**, 271–279 (2009)
  21. Lengy J., Jakovljevič R., Talis B.: Recovery of a Hartmannelloid amoeba from a purulent ear discharge. *Harefuah*, **80**, 23–24 (1971)
  22. Leońska-Duniec A.: Free-living amoebae as vectors of pathogenic microorganisms. *Probl. Hig. Epidemiol.* **92**, 173–180 (2011)
  23. Leońska-Duniec A.: Problemy w określeniu chorobotwórczości pełzaków wolno żyjących z rodzaju *Acanthamoeba*. *Probl. Hig. Epidemiol.* **94**, 24–30 (2013)
  24. Leonska-Duniec A.: Occurrence of potentially pathogenic free-living amoebae in Poland. *Probl. Hig. Epidemiol.* **96**, 335–339 (2015)
  25. Lorenzo-Morales J., Khan N.A., Walochnik J.: An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*, **22**, 10 (2015)
  26. Łanocha N., Kosik-Bogacka D., Kuźna-Grygiel W.: Rola pełzaków wolno żyjących w wywoływaniu i transmisji chorób u ludzi i zwierząt. *Probl. Hig. Epidemiol.* **90**, 165–170 (2009)
  27. Martinez A.J., Kasprzak W.: Patogenne pełzaki wolnożyjące – przegląd. *Wiad. Parazytol.* **26**, 495–521 (1980)
  28. Martinez A.J., Visvesvara G.S.: Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol.* **7**, 583–598 (1997)
  29. McKellar M.S., Mehta L.R., Greenlee J.E., Hale D.C., Booton G.C., Kelly D.J., Fuerst P.A., Sriram R., Visvesvara G.S.: Fatal granulomatous *Acanthamoeba* encephalitis mimicking a stroke, diagnosed by correlation of results of sequential magnetic resonance imaging, biopsy, in vitro culture, immunofluorescence analysis, and molecular analysis. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 4265–4269 (2006)
  30. Morgan M.J., Halstrom S., Wylie J.T., Walsh T., Kaksonen A.H., Sutton D., Braun K., Puzon G.J.: Characterization of a Drinking Water Distribution Pipeline Terminally Colonized by *Naegleria fowleri*. *Environ. Sci. Technol.* **50**, 2890–2898 (2016)
  31. Qvarnstrom Y., Visvesvara G.S., Sriram R., da Silva A.J.: Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 3589–3595 (2006)
  32. Rivera M.A., Padhya T.A.: *Acanthamoeba*: a rare primary cause of rhinosinusitis. *Laryngoscope*, **112**, 1201–1203 (2002)
  33. Riviera F., Rosas I., Castillo M., Cházec M., Gómez R., Chío R.E., Islas J.: Pathogenic and free-living protozoa cultured from the nasopharyngeal and oral regions of dental patients: II. *Environ. Res.* **39**, 364–371 (1986)
  34. Salameh A., Bello N., Becker J., Zangeneh T.: Fatal Granulomatous Amoebic Encephalitis Caused by *Acanthamoeba* in a Patient With Kidney Transplant: A Case Report. *Open Forum Infect. Dis.* **2**, ofv104 (2015)
  35. Siddiqui R., Khan N.A.: Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*: an old enemy presenting new challenges. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, e3017 (2014)
  36. Schuster F.L., Visvesvara G.S.: Free-Living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Intern. J. Parasitol.* **34**, 1001–1027 (2004)
  37. Thamtam V.K., Uppin M.S., Pyl A., Kaul S., Rani J.Y., Sundaram C.: Fatal granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* in a newly diagnosed patient with systemic lupus erythematosus. *Neurol. India.* **64**, 101–104 (2016)
  38. Thomas V., McDonell G., Denyer S.P., Maillard J.Y.: Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 231–259 (2010)
  39. Toczolowski J., Gieryng H., Gieryng R., Wróblewska E.: Zakażenie pełzakami z rodzaju *Acanthamoeba* w pływalniach i jeziorach Lubelszczyzny u osób stosujących soczewki kontaktowe. *Klin. Ocz.* **102**, 207–208 (2000)
  40. Trabelsi H., Dendana F., Sellami A., Cheikhrouhou F., Neji S., Makni F., Ayadi A.: Pathogenic free-living amoeba: Epidemiology and clinical review. *Pathol. Biol.* **60**, 399–405 (2012)
  41. Visvesvara G.S.: Infections with free-living amoebae. *Handb. Clin. Neurol.* **114**, 153–168 (2013)
  42. Visvesvara G.S., Moura H., Schuster F.L.: Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **56**, 1–26 (2007)
  43. Walochnik J., Obwaller A., Haller-Schober E.-M., Aspöck H.: Anti-*Acanthamoeba* IgG, IgM, and IgA immunoreactivities in correlation to strain pathogenicity. *Parasitol. Res.* **87**, 651–656 (2001)
  44. Walochnik J., Scheikl U., Haller-Schober E.M.: Twenty years of *Acanthamoeba* diagnostics in Austria. *J. Eukaryot. Microbiol.* **62**, 3–11 (2015)
  45. Wesołowska M., Cisowska A., Myjak P., Marek J., Jurowska-Liput J., Jakubaszko J.: *Acanthamoeba keratitis* in Contact Lens Wearers in Poland. *Adv. Clin. Exp. Med.* **15**, 553–555 (2006)
  46. Żbikowska E., Walczak M., Krawiec A.: Distribution of *Legionella pneumophila* bacteria and *Naegleria* and *Hartmannella* amoebae in thermal saline baths used in balneotherapy. *Parasitol. Res.* **112**, 77–83 (2013)



OCENA AKTYWNOŚCI BÓJCZEJ PREPARATÓW  
PRZEZNACZONYCH DO DEZYNFEKCJI  
CHEMICZNO-TERMICZNEJ BIELIZNY SZPITALNEJ W ŚWIETLE  
NOWEJ NORMY EUROPEJSKIEJ PN-EN 16616: 2015-10.  
DEZYNFEKCJA CHEMICZNO-TERMICZNA TEKSTYLIÓW

Patryk Tarka<sup>1\*</sup>, Agnieszka Chojecka<sup>2</sup>, Olga Paduch<sup>2</sup>, Aneta Nitsch-Osuch<sup>1</sup>, Krzysztof Kanecki<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Medycyny Społecznej i Zdrowia Publicznego, Warszawski Uniwersytet Medyczny  
<sup>2</sup>Zakład Bakteriologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny

Wpłynęło w maju 2016 r.  
Zaakceptowano w październiku 2016 r.

1. Wprowadzenie. 2. Kategorie bielizny szpitalnej i wymagany zakres dekontaminacji. 3. Proces chemiczno-termicznej dezynfekcji w procesie prania. 4. Dezynfekcja chemiczno-termiczna bielizny w procesie prania – preparaty. 5. Norma Europejska PN-EN 16616: 2015-10. *Chemiczne środki dezynfekcyjne i antyseptyczne. Dezynfekcja chemiczno-termiczna tekstyliów*. Metoda badania i wymagania (faza 2, etap 2). 6. Metody oceny aktywności sporobójczej preparatów dezynfekcyjnych w procesie dezynfekcji chemiczno-termicznej – perspektywy. 7. Metody oceny aktywności wirusobójczej preparatów dezynfekcyjnych w procesie dezynfekcji chemiczno-termicznej – perspektywy. 8. Podsumowanie

**Assessing biocidal activity of agents used in chemical-thermal decontamination of hospital textiles in the light of new European Standard PN-EN 16616: 2015-10. Chemical-thermal decontamination of textiles**

*Abstract:* Appropriate decontamination of hospital textiles depends heavily on specifically defined proceedings for handling decontaminated hospital textiles (collection, segregation, packing, transportation) and appropriate disinfection in the laundry process. It is becoming increasingly common to disinfect hospital textiles in a chemical-thermal process. Disinfectants used in this process should be applied according to functional parameters defined in validated and repeatable test methods. Changes in assessing the activity of agents used in chemical-thermal disinfection of hospital textiles refer primarily to the standardization of testing methods for these agents. PN-EN 16616 Standard which regards chemical-thermal disinfection of textiles clearly regulates the rules of assessing the effectiveness of agents used in the disinfection of hospital textiles and defines a possible scope of their biocidal activity (bactericidal, tuberculocidal and fungicidal activity). It is assumed that further assessment of the activity of sporicidal agents will be developed in the future.

1. Introduction. 2. Categorisation of hospital textiles and required scope of decontamination. 3. Chemical-thermal disinfection in the laundry process. 4. Chemical-thermal disinfection of hospital textiles in the laundry process – agents. 5. European Standard PN-EN 16616: 2015-10. *Chemical Disinfectants And Antiseptics – Chemical-Thermal Textile Disinfection – Test Method And Requirements* (phase 2, step 2). 6. Assessing sporicidal activity of disinfectants in the process of chemical-thermal disinfection – perspectives. 7. Assessing virucidal activity of disinfectants in the process of chemical-thermal disinfection – perspectives. 8. Conclusions

---

**Słowa kluczowe:** bielizna szpitalna, chemiczno-termiczna dezynfekcja, PN-EN 16616

**Key words:** hospital textiles, chemical-thermal disinfection, EN 16616

---

## 1. Wprowadzenie

Postępowanie z bielizną szpitalną jest procesem, który oprócz prawidłowego zbierania, pakowania i transportu bielizny obejmuje dwa kluczowe procesy jakimi są pranie i dezynfekcja mające na celu unieszkodliwienie drobnoustrojów oraz przecinanie dróg infekcji. Dezynfekcja bielizny, z uwagi na termolabilne materiały z jakich wykonana jest bielizna, coraz częściej przebiega z zastosowaniem preparatów chemicznych i temperatury czyli dezynfekcji chemiczno-termicznej

zamiast z wykorzystaniem wysokiej temperatury czyli dezynfekcji termicznej [11]. Preparaty przeznaczone do dezynfekcji chemiczno-termicznej bielizny szpitalnej powinno cechować określone spektrum działania wobec mikroorganizmów zasiedlających bieliznę. Powinno ono obejmować aktywność bakterioobójczą, prątkobójczą, grzybobójczą i wirusobójczą. Obecnie działanie biobójcze w wymienionym zakresie może być oceniane na podstawie uznanych metod krajowych oraz Normy Europejskiej przeznaczonej do chemiczno-termicznej dezynfekcji tekstyliów PN-EN 16616: 2015-10

---

\* Autor korespondencyjny: Zakład Medycyny Społecznej i Zdrowia Publicznego, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Oczki 3, 02-007 Warszawa; tel. 22 621-52-56; e-mail: patryk.tarka@wum.edu.pl

[13, 15]. Z uwagi na pojawianie się nowych zagrożeń biologicznych rozważane jest rozszerzenie spektrum działania preparatów przeznaczonych do dezynfekcji chemiczno-termicznej o spektrum sporobójcze. Wymaga to jednak wypracowania nowych metod badawczych pozwalających na właściwą ocenę aktywności sporobójczej preparatów przeznaczonych do dezynfekcji chemiczno-termicznej bielizny szpitalnej.

## 2. Kategorie bielizny szpitalnej i wymagany zakres dekontaminacji

Podział bielizny szpitalnej na ogólnoszpitalną, zakaźną i wysoce zakaźną związany jest z podstawowym kryterium jakim jest zagrożenie zakażeniem. Bielizna ogólnoszpitalna jest to niemal cała bielizna szpitalna z wyłączeniem bielizny zakaźnej i wysoce zakaźnej. Postępowanie z tego typu bielizną wymaga zastosowania standardowych procedur [14]. Wymagany sposób dekontaminacji bielizny ogólnoszpitalnej odbywa się poprzez dezynfekcję termiczną ( $\geq 90^{\circ}\text{C}$ ) lub chemiczno-termiczną i ma na celu wyeliminowanie bakterii w tym prątków gruźlicy, grzybów i wirusów [11]. Czynniki zakaźne stanowiące szczególne zagrożenie biologiczne wywołujące choroby zakaźne lub zakażenia podlegające zgłoszeniu zgodnie z wykazem chorób zakaźnych i zakażeń oraz biologicznych czynników chorobotwórczych [21, 29] są podstawą do kwalifikowania bielizny szpitalnej do określonych kategorii. Do kategorii bielizny zakaźnej lub wysoce zakaźnej będzie również zaliczana bielizna od chorych z nieustalonym czynnikiem zakaźnym oraz bielizna zanieczyszczona krwią, płynami ustrojowymi, wydzielinami i wydaliniami. Postępowanie z bielizną zakaźną i wysoce zakaźną jest inne od postępowania z bielizną ogólnoszpitalną. Tego typu bielizna podlega osobnym procesom zbiórki, segregowania i pakowania w miejscu zużycia bielizny oraz szczególnym zasadom transportu. Bieliznę zakaźną należy pakować w worki samootwieralne i dodatkowo w opakowania transportowe, szczelne i nieprzemakalne worki foliowe. Bieliznę wysoce zakaźną należy opakować w worki z tkaniny, a następnie w dodatkowe worki foliowe i przetransportować do miejsca unieszkodliwiania (autoklawowania lub dezynfekcji). W odróżnieniu od bielizny zakaźnej bielizna wysoce zakaźna nie może być transportowana do pralni zanim nie zostanie poddana dekontaminacji w miejscu jej wytworzenia [27]. Do bielizny wysoce zakaźnej zalicza się np. bieliznę pochodzącą od pacjentów ze zgorzelą gazową, gdyż czynnikiem etiologicznym w tym przypadku jest bakteria *Clostridium perfringens*, wytwarzająca wysoce odporne formy przetrwalne jakimi są spory. Ze względu na oporność spor na czynniki dezynfekcyjne bielizna tego typu

wymaga odmiennego postępowania, a w przypadku braku właściwych sposobów dekontaminacji powinna podlegać spalaniu [26].

## 3. Proces chemiczno-termicznej dezynfekcji w procesie prania

Najbardziej polecana do dezynfekcji bielizny szpitalnej jest dezynfekcja termiczna w temperaturze powyżej  $90^{\circ}\text{C}$ . Cechuje ją duża skuteczność zwalczania licznych drobnoustrojów, oprócz spor, a także łatwość kontroli. Jednak proces przebiegający w tej temperaturze ma zasadnicze wady: jest niewskazany do wyrobów elanobawełnianych, dla których temperatura prania nie powinna przekraczać  $60^{\circ}\text{C}$ , ponadto jest to proces bardzo energochłonny. Dlatego obecnie najszerzej stosowana jest dezynfekcja chemiczno-termiczna w temperaturze  $60\text{--}65^{\circ}\text{C}$ . Na rynku są również dostępne preparaty aktywne w  $40^{\circ}\text{C}$ . Niezależnie od tego, czy pranie bielizny szpitalnej odbywa się w pralnicach bębnowych czy pralnicach tunelowych, jest konieczne ściśle stosowanie określonej temperatury, czasu trwania procesu dezynfekcji, stężenia środków piorących i dezynfekujących podczas procesu prania i dezynfekcji. Parametry te wyznaczane są na podstawie dostępnych metodyk badawczych. W Polsce jest to metoda Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego-Państwowego Zakładu Higieny PZH DF 05/03: 2003.02.07, która definiuje proces chemiczno-termicznej dezynfekcji w zakresie temperatur od  $40\text{--}70^{\circ}\text{C}$  i czasie kontaktu od 10–30 minut [11, 13] oraz niedawno wprowadzona norma PN-EN 16616: 2015-10 [15], w której zakres temperatury został określony jako  $< 60^{\circ}\text{C}$  oraz  $\geq 60^{\circ}\text{C}$ . Dokładne warunki badania w normie europejskiej takie jak temperatura, czas kontaktu, stężenie badanych preparatów powinny być stosowane zgodnie z zaleceniami wytwórcy. W obu metodach badawczych ważne jest określenie stężenia preparatów w kąpielii piorącej na podstawie stosunku masy wsadu w kg do kąpielii piorącej l tzw. modułu prania kg/l [13, 15].

## 4. Dezynfekcja chemiczno-termiczna bielizny w procesie prania – preparaty

W procesie chemiczno-termicznej dezynfekcji tkanin, jako preparaty piorąco-dezynfekujące, najczęściej, stosowane są związki na bazie substancji utleniających [28]. Najczęściej stosowany jest nadwęglan sodu, a ostatnio kwas ftaloiloamidoperoxykapronowy (PAP). Związki te są źródłem nadtlenu wodoru (tzw. addukty nadtlenu wodoru). Powstaje on podczas rozpuszczania nadtlenu wodoru w alkalicznym środowisku wodnym. Szybkość powstawania nadtlenu wodoru zależy od tempe-

ratury kąpiele piorące. Efektywne działanie dezynfekujące za pomocą nadwęglanu zachodzi w temperaturach powyżej 60°C. Dla wielu rodzajów włókna temperatury kąpiele piorących nie powinny przekraczać 60°C, a zatem chcąc stosować dezynfektant nadwęglanowy należy wprowadzić do proszku bądź bezpośrednio do kąpiele piorącej aktywator powodujący efektywne działanie dezynfektanta w temperaturach <60°C [12, 23]. Jako nieorganiczne aktywatory można stosować: N,N,N',N'-tetraacetyloetylenodiaminę (TAED), nonaioiloksybenzenosulfonian sodowy (SNOBS), benzoiloksybenzenosulfonian sodowy (SBOBS) [12, 23]. Najczęściej stosowanym aktywatorem jest TAED. Reaguje on z nadtlenkiem wodoru uwalnianym z nadtlenków tworząc *in situ* kwas nadoctowy – peracetic acid (PAA). Powstający kwas nadoctowy jest efektywnym dezynfektantem, wybielaczem i odplamiaczem w temperaturach poniżej 60°C. W Europie aktywator TAED jest stosowany od 1977 roku [23].

Na rynku znajdują się także preparaty na bazie tzw. równowagowego kwasu nadoctowego w postaci płynnej, gdzie obok kwasu występuje także nadtlenuk wodoru [24]. Preparaty na bazie kwasu nadoctowego, różnią się wrażliwością na substancje organiczne. W zależności od tego czy substancją czynną jest kwas nadoctowy generowany *in situ* z nadwęglanu sodu i TAED, czy równowagowy kwas nadoctowy. Preparat z nadwęglanem sodu wykazywał znacznie większy błąd proteinowy niż preparat z równowagowym kwasem nadoctowym w koncentracji płynnym [11]. Preparaty na bazie kwasu nadoctowego nie reagują z antyseptykami na bazie chlorheksydyny. Jest to istotne ze względu na możliwą obecność resztek antyseptyku na bieliźnie szpitalnej. Natomiast w przypadku preparatów na bazie aktywnego chloru resztki preparatów antyseptycznych zawierających chlorheksydynę powodują powstanie na bieliźnie trudno usuwalnych brunatnych plam. PAA jest kompatybilny z enzymami zawartymi w proszkach do prania [28].

Znane są nieliczne przykłady zastosowania preparatów piorąco-dezynfekujących na bazie aktywnego chloru. Najczęściej stosowana jest sól sodowa kwasu dichloroizocyjanurowego w postaci NaDCC – dichloroizocyjanuranu sodu [28]. W przypadku stosowania preparatów na bazie aktywnego chloru problemem mogą być ścieki pralnicze zawierające znaczne ilości AOX (*adsorbable organicznie związane chlorowce* – adsorbable organohalogeny).

Należy również pamiętać, że substancje aktywne zaliczane do związków utleniających, wchodzące w skład preparatów przeznaczonych do dezynfekcji chemiczno-termicznej mogą być stosowane do bielizny ogólnoszpitalnej nieznanie zanieczyszczonej krwią, gdyż obecność krwi może znacząco zmniejszać aktywność tych substancji, a tym samym ograniczać aktywność prepa-

ratów, szczególnie w przypadku prątków gruźlicy, które są mało wrażliwe na działanie tego rodzaju substancji aktywnych [11, 26].

## 5. Norma Europejska PN-EN 16616: 2015-10. Chemiczne środki dezynfekcyjne i antyseptyczne. Dezynfekcja chemiczno-termiczna tekstyliów. Metoda badania i wymagania (faza 2, etap 2)

Norma Europejska PN-EN 16616 [15] jest przeznaczona do dezynfekcji chemiczno-termicznej bielizny w obszarze medycznym czyli w sytuacjach gdy dezynfekcja jest wskazana w czasie opieki nad pacjentem oraz w placówkach, gdzie przebywają chorzy cierpiący na choroby zakaźne, jak również w obszarach gdzie wskazana jest higieniczna obróbka tekstyliów np. w hotelach lub innych obszarach użyteczności publicznej. Metoda badania przebiega w warunkach laboratoryjnych z zastosowaniem maszyny piorącej o ściśle określonych parametrach technicznych jako urządzenia badawczego. Jest ona przeznaczona do oceny działania biobójczego preparatów dezynfekcyjnych lub ich mieszanin w określonych warunkach stosowania produktu. Metodyka zawarta w normie PN-EN 16616 [15] jest zaliczana do kategorii badań fazy 2 etapu 2 czyli do metod nośnikowych, które wyznaczają parametry użytkowe stosowania preparatów.

Producent lub dystrybutor zlecający badania zobowiązany jest do dostarczenia odpowiedniej instrukcji stosowania produktu lub mieszanin produktów tak aby przeprowadzenie procedury badawczej mogło odbyć się w zgodzie z niniejszą normą. Należy pamiętać, że norma przeznaczona jest do oceny etapu dezynfekcji bez prania wstępnego. Parametry użytkowe wyznaczone w warunkach laboratoryjnych odpowiadają tylko wybranym warunkom badania. W przypadku jakichkolwiek zmian w rzeczywistych warunkach stosowania produktów, badania wg normy PN-EN 16616 należy przeprowadzić ponownie. Odpowiedzialność za użytkowanie produktu przeznaczonego do dezynfekcji chemiczno-termicznej spoczywa na wytwórcach środków piorących i/lub dezynfekujących. Niniejsza norma jest zharmonizowana z Dyrektywą 93/42/EWG o Wyrobach Medycznych [3]. Podobnie jak procedura krajowa NIZP-PZH [13] metoda badania wykorzystuje nośniki bawełniane, które zakażane są zawiesinami drobnoustrojów o określonej gęstości. Norma Europejska przewiduje wyższe gęstości zawiesin na nośnikach, co najmniej  $1,5 \times 10^9$  jtk/ml w przypadku bakterii jako organizmów testowych, co najmniej  $1,5 \times 10^8$  jtk/ml w przypadku *Candida albicans* oraz  $1,5-5 \times 10^7$  jtk/ml w przypadku *Aspergillus brasiliensis*. Norma Europejska wprowadza również możliwość wykonania oceny działania prątkobójczego. Gęstość zawiesiny prątków

Tabela I  
Lista obowiązujących organizmów testowych w odniesieniu do warunków temperaturowych procesu dezynfekcji chemiczno-termicznej

Spektrum działania	Temperatura procesu dezynfekcji chemiczno-termicznej	
	< 60°C	≥ 60°C
Bakteriobójcze	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> (K12) <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus hirae</i>	<i>Enterococcus faecium</i> *
Bójcze na grzyby drożdżopodobne	<i>Candida albicans</i>	
Grzybobójcze	<i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus brasiliensis</i>	
Bójcze na prątki gruźlicy	<i>Mycobacterium terrae</i>	
Prątkobójcze	<i>Mycobacterium terrae</i> <i>Mycobacterium avium</i>	

\* Badanie w temperaturze ≥ 60°C na *Enterococcus faecium* obejmuje działanie bójcze wobec grzybów drożdżopodobnych, grzybobójcze, prątkobójcze/bójcze na prątki gruźlicy

została ustalona na poziomie takim jak dla innych bakterii. Obciążenie organiczne w postaci sterylnej odwłóknionej krwi baraniej wprowadzane jest do zawiesiny organizmów testowych natomiast w metodzie krajowej obciążenie w postaci albuminy wołowej jest dodawane do preparatu. Oprócz obciążenia dodawanego do zawiesiny, w normie PN-EN 16616 obciążenie w postaci sterylnej odwłóknionej krwi baraniej należy dodać do wsadu w maszynie piorącej przed dopływem wody w proporcji 12,5 ml na 1 kg wsadu. Norma przewiduje ilościowe określenie poziomu redukcji mikroorganizmów testowych wyrażone w dziesiętnej skali logarytmicznej [ $\log_{10}$ ] na poziomie 7 w odniesieniu do bakterii i prątków oraz 6 w przypadku *Candida albicans* i *Aspergillus brasiliensis*. Liczba organizmów testowych na jakich należy przeprowadzić badania, podobnie jak w metodzie krajowej NIZP-PZH, jest zróżnicowana w zależności od warunków temperaturowych procesu dezynfekcji chemiczno-termicznej (Tabela I) [15]. W metodzie krajowej *Enterococcus faecium* jest organizmem testowym badanym w temperaturze < 60°C jak i w temperaturze ≥ 60°C. W odróżnieniu od normy europejskiej, w temperaturze ≥ 60°C w metodzie krajowej, badana jest większa liczba organizmów testowych (*S. aureus*, *C. albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*) jednak temperatura badania dostosowywana jest do przeżywalności badanych organizmów zarówno w zakresie działania bakteriobójczego jak i grzybobójczego [11, 13]. Enterokoki są organizmami o szerokim zakresie tolerancji na warunki środowiskowe. Niektóre szczepy mogą przeżywać w temperaturze powyżej 70°C [7], jak również w temperaturze 60°C przy stężeniu kwasu nadoctowego 3,36 g/kg tekstyliów [5]. Cechy te posiada również szczep *Enterococcus faecium*, który, jako szczep referencyjny, został wybrany do określa-

nia skuteczności preparatów wykazujących aktywność w wysokich temperaturach [6].

Jeśli w badaniach zostaną zastosowane dodatkowe organizmy testowe należy sprawdzić czy ich hodowla pozwala na uzyskanie zawiesiny o odpowiedniej gęstości. W przypadku, gdy nie pochodzą one z ośrodków referencyjnych należy ustalić ich cechy identyfikacyjne oraz przechowywać przez okres 5 lat w celach identyfikacyjnych [15].

Metoda badania polega na umieszczeniu wysuszonych zakażonych nośników wraz z obciążeniem w woreczkach bawełnianych, które wkłada się do maszyny piorącej, wypełnionej wystandaryzowanym wsadem do określonej objętości maszyny piorącej i przeprowadzeniu procesu dezynfekcji chemiczno-termicznej w określonych przez wytwórcę warunkach temperatury, czasu kontaktu i stężenia preparatów dezynfekcyjnych i piorących.

Wsad stanowią tekstylia poliestrowo-bawełniane lub bawełniane wypełniające maszynę piorącą do 70% ± 10% maksymalnej pojemności. Wsad powinien być jałowy. Jego wykorzystanie zostało ustalone na 100 cykli prania wliczając w to cykle jego przygotowania i dezynfekcji. Po przeprowadzeniu procesu dezynfekcji chemiczno-termicznej, w ustalonych warunkach, przebieg procesu prania powinien zostać zatrzymany, tak aby umożliwić wyjęcie nośników oraz jak najszybsze podanie ich neutralizacji i odzyskowi poprzez wytrząsanie, osobno, każdego nośnika w neutralizatorze przez 10 minut. Po czasie neutralizacji i wytrząsania z uwagi na to, że jest to metoda ilościowa, należy przygotować kolejne rozcieńczenia uzyskanej mieszaniny i wysiać na podłoża właściwe dla danych organizmów testowych. Równolegle należy dokonać posiewu 100 ml płynu piorąco-dezynfekującego pobranego po etapie dezynfekcji.

Obliczenie współczynnika redukcji dokonuje się poprzez odjęcie od średniej liczby organizmów testowych uzyskanej z 3 nośników nie poddanych dezynfekcji w danej serii, liczby organizmów testowych odzyskanych z poszczególnych nośników po ekspozycji na preparaty piorące i dezynfekujące. Wymaganą redukcję organizmów testowych należy osiągnąć w 3 kolejnych powtórzeniach badania i ponadto nie powinno wykrywać się żadnych organizmów w 100 ml płynu piorącego/dezynfekującego.

Niezwykle ważny jest proces kontroli procesu prania i dezynfekcji. Aby wykluczyć wpływ mechanicznego działania procesu prania na badane organizmy testowe należy w oddzielnym procesie prania przeprowadzić procedurę polegającą na wprowadzeniu zakażonych nośników do maszyny piorącej bez zastosowania środków piorących i dezynfekujących (Nw).

Dokonać kontroli czystości nośników poprzez przeprowadzenie procedury na 6 niezakażonych nośnikach (kontrola odniesienia RI). Brak wzrostu organizmów testowych oznacza pozytywny wynik kontroli.

Należy również przeprowadzić ocenę wpływu środka piorącego na redukcję drobnoustrojów (kontrola odniesienia RII).

Równoległe do przeprowadzanych procesów dezynfekcji chemiczno-termicznej w procesie prania oraz procesów kontroli należy przeprowadzić walidację dotyczącą wpływu toksyczności neutralizatora na badane organizmy testowe jak również walidację metody rozcieńczenia-neutralizacji sprawdzającą wpływ działania resztkowego preparatu po procesie neutralizacji na odzysk mikroorganizmów.

Norma PN-EN 16616 [15] wymaga od wytwórców wykonania badań wg norm fazy 2 etapu 1 (metody zawiesinowe) w zakresie bakteriobójczym (PN-EN 13727) prątkobójczym (PN-EN 14348) i grzybobójczym (PN-EN 13624) z zastosowaniem temperatury i czasu badania zalecanego przez wytwórcę, warunków brudnych oraz kryteriów redukcji takich jak dla dezynfekcji narzędzi. W przypadku temperatur powyżej 60°C zaleca się przeprowadzenie badań wg norm PN-EN 14348, PN-EN 13624 z organizmami testowymi takimi jak *Mycobacterium avium* i *Aspergillus brasiliensis* [15].

W odróżnieniu od procedury krajowej NIZP-PZH norma PN-EN 16616 nie przewiduje badań bezpośrednio w warunkach praktycznych czyli w pralni szpitalnej [11]. Testowanie preparatów przeznaczonych do dezynfekcji chemiczno-termicznej wg normy PN-EN 16616 przeprowadzane jest w bardzo precyzyjnie wystandardyzowanych warunkach, nie uwzględniających wahań parametrów procesu występujących w warunkach przeprowadzania procesu prania i dezynfekcji w pralniach szpitalnych (np. różne typy techniczne maszyn piorących, naturalnie zanieczyszczone wsady białizny). Zachowanie etapu badań właściwych w terenie po

wyznaczaniu parametrów użytkowych w standardowych urządzeniach piorących i przy standardowym obciążeniu jałowych wsadów wydaje się korzystnym potwierdzeniem skuteczności działania parametrów przeznaczonych do dezynfekcji chemiczno-termicznej.

## 6. Metody oceny aktywności sporobójczej preparatów dezynfekcyjnych w procesie dezynfekcji chemiczno-termicznej – perspektywy

Spory są formami przetrwalnymi, które charakteryzują się wysoką odpornością na czynniki fizyczne i opornością na czynniki chemiczne, dlatego też trudno wyeliminować je ze środowiska jakim jest również białizna szpitalna. Są one odporne na procesy dezynfekcji i tylko nieliczne substancje aktywne wykazują działanie sporobójcze [25].

Zainteresowanie rozwojem metod mających na celu ocenę działania sporobójczego preparatów dezynfekcyjnych przeznaczonych do chemiczno-termicznej dezynfekcji białizny jest związane z pojawiającymi się nowymi zagrożeniami biologicznymi w postaci *C. difficile*

Zauważono konieczność dekontaminacji nie tylko powierzchni szpitalnych, lecz również białizny zanieczyszczonej kałem osoby zakażonej *C. difficile* [1, 8]. Zgodnie z zaleceniami jest wskazana dekontaminacja pościeli za pomocą środków sporobójczych lub autoklawowanie przed wysłaniem do pralni [9]. Dezynfekcja sporobójcza lub autoklawowanie przed praniem jest bardzo kłopotliwe. Ostatnio pojawiły się preparaty na bazie kwasu nadoctowego (PAA) deklarowane przez producenta jako działające sporobójczo w trakcie prania.

Działanie sporobójcze PAA jest uzależnione od [28]:

- stężenia kwasu nadoctowego;
- odczynu środowiska (pH);
- temperatury.

Kwas nadoctowy jest najaktywniejszy w środowisku kwaśnym, natomiast wraz ze wzrostem pH skuteczność sporobójcza znacznie spada. Optymalne działanie preparatów piorących zapewnia aktywność przy pH zasadowym, w tej sytuacji działanie sporobójcze można kompensować wzrostem temperatury kąpieli piorącej. Ponieważ mamy do czynienia z reakcją chemiczną, stosowanie właściwego stężenia PAA oraz temperatury w procesie prania i dezynfekcji jest bardzo ważne [28].

Zainteresowanie rozwojem metod mających na celu ocenę działania sporobójczego preparatów dezynfekcyjnych przeznaczonych do chemiczno-termicznej dezynfekcji białizny jest związane z pojawiającymi się nowymi zagrożeniami biologicznymi. Obecnie trwają zaawansowane prace dotyczące oceny aktywności sporobójczej preparatów przeznaczonych do dezynfekcji powierzchni i narzędzi metodą nośnikową [1], w których organizmem testowym jest *C. difficile*. Została opracowana

metoda uzyskiwania zawiesiny spor tego szczepu o gęstości pozwalającej na oszacowanie redukcji spor na poziomie wymaganym w obszarze medycznym (współczynnik redukcji w skali logarytmicznej równy 5) [8]. Ocena działania substancji czynnych o aktywności sporobójczej w preparatach przeznaczonych do dezynfekcji chemiczno-termicznej bielizny szpitalnej jest obecnie w fazie rozwoju. W październiku 2015 roku Komitet Techniczny nr 216 do spraw dezynfekcji i antyseptyki Europejskiego Komitetu Normalizacyjnego (CEN) powołał grupę roboczą WI00216068, do opracowania Normy dotyczącej działania sporobójczego [4].

Z uwagi na to, że w obszarze medycznym nie ma znormalizowanych metod oceniających aktywność sporobójczą preparatów, producenci preparatów piorąco-dezynfekujących do oceny tej aktywności coraz częściej stosują znormalizowane metody pochodzące z obszaru spożywczego, przemysłowego, domowego i zakładów użyteczności publicznej. Normy te zawierają jednak metody zaliczane do kategorii badań fazy 1 (PN-EN 14347) [17], i fazy 2 etapu 1 (PN-EN 13704) [18], które nie pozwalają wyznaczyć prawidłowych parametrów użytkowych działania preparatów, zwłaszcza w zakresie dezynfekcji chemiczno-termicznej w procesie prania.

## 7. Metody oceny aktywności wirusobójczej preparatów dezynfekcyjnych w procesie dezynfekcji chemiczno-termicznej – perspektywy

Ponieważ wirusy stanowią ważny czynnik etiologiczny zakażeń szpitalnych, prawidłowa dezynfekcja bielizny skażonej wirusami jest bardzo istotna. Obecnie w zakresie oceny aktywności wirusobójczej w obszarze medycznym dysponujemy normą PN-EN 14476+A1: 2015-10 [19]. Jest to norma obejmująca badania wg metody zawieszinowej fazy 2 etapu 1. Wirusem testowym jest *Parvovirus mysi*. Parwowirusy charakteryzują się dużą odpornością na podwyższoną temperaturę jak i opornością na środki chemiczne [22]. Brakuje natomiast normy dotyczącej oceny aktywności wirusobójczej w warunkach symulujących warunki praktyczne tj. normy fazy 2 etapu 2.

## 8. Podsumowanie

Proces technologiczny prania połączonego z dezynfekcją chemiczno-termiczną jest skomplikowany, a o skuteczności działania preparatu dezynfekcyjnego decyduje wiele zmiennych tego procesu, dlatego parametry użytkowe preparatów przeznaczonych do dezynfekcji chemiczno-termicznej w procesie prania powinny być wyznaczane w metodach najbardziej zbliżonych

do warunków praktycznych procesu prania z dezynfekcją chemiczno-termiczną. Obecnie dysponujemy już normą nośnikową PN-EN 16616 do oceny działania preparatów przeznaczonych do dezynfekcji chemiczno-termicznej tekstyliów w zakresie działania bakterio-, grzybo- i prątkobójczego. Konieczne jest dalsze opracowanie norm w zakresie działania sporobójczego i wirusobójczego. Powinny być to metody zaliczane do kategorii badań fazy 2 etapu 2 czyli wykonywane w warunkach symulujących praktyczne zastosowanie preparatów w procesie prania i chemiczno-termicznej dezynfekcji.

## Piśmiennictwo

1. Büttgen S., Gebel J., Rheinbaben F., Hornei B., Engelhart S., Exner M.: Efficacy of surface and instrument disinfection with sporicidal claims against spores of *Clostridium difficile* ribotype 027. *Hyg. Med.* **33**, 194–200 (2008)
2. Biering H.: More than 100 years of Peracetic Acid: An old active substance with a bright future. *Journal for Hygiene in Hospitals and Medical Practice. Aseptica*, 14–19. 2005
3. Dyrektywa Rady 93/42/EWG z dnia 14 czerwca 1993 dotycząca wyrobów medycznych
4. Europejski Komitet Normalizacyjny, Komitet Techniczny nr 216 (CEN) <https://standards.cen.eu>
5. Fijan S., Turk S.S.: Inactivation of *Enterococcus faecium* in water and hospital laundry wastewater by disinfection processes utilizing peroxyacetic acid or ultraviolet radiation. *J. Pure Appl. Microbiol.* **8**, 531–538 (2014)
6. Fijan S., Koren S., Cencić A., Šostar-Turk S.: Antimicrobial disinfection effect of laundering procedure for hospital textiles against various indicator bacteria and fungi using different substrates for stimulating human excrements. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **57**, 251–257 (2007)
7. Fijan S., Turk S.S.: Hospital Textile, Are they a possible vehicle for healthcare associated infections? *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **9**, 3330–3343. (2012)
8. Fraise A.P., Wilkinson., Bradley C.R., Paton S., Walker J., Mailard J.-Y., Wesgate R.L., Hoffman P., Coia J., Woodall C., Fry C., Wilcox M.: Development of a sporicidal test method for *Clostridium difficile*. *J. Hosp. Infect.* **89**, 2–15. (2015)
9. Hryniewicz W., Martirosian G., Ozorowski T.: Zakażenia *Clostridium difficile*, diagnostyka, terapia, profilaktyka, Narodowy Instytut Leków, 2011
10. Kołuda J. Jakość mikrobiologiczna bielizny szpitalnej po procesie prania dezynfekcyjnego. *Probl. Hig. Epidemiol.* **94**, 179–183 (2013)
11. Röhm-Rodowald E., Jakimiak B., Chojecka A., Żmuda-Baranowska M., Kanclerski K., Ziemba B.: Porównanie metod oceny bakteriobójczego i grzybobójczego działania środków dezynfekcyjnych przeznaczonych do chemiczno-termicznej dezynfekcji bielizny szpitalnej. *Zakażenia*, **6**, 15–20 (2012)
12. Przondo J.: Związki powierzchniowo czynne i ich zastosowanie w produktach chemii gospodarczej. Wyd. Politechniki Radomskiej, Radom, 2007
13. PZH DF 05/03: 2003.02.07. Metoda określania działania bakteriobójczego i/lub grzybobójczego dezynfekcyjnych preparatów przeznaczonych do chemiczno-termicznej dezynfekcji bielizny niezanieczyszczonej krwią
14. PN-EN 14065: 2016-07. Tekstylnia. Tekstylnia poddawane obróbce w pralni. System kontroli skażenia biologicznego

15. PN-EN 16616: 2015-10. Chemiczne środki dezynfekcyjne i antyseptyczne. Dezynfekcja chemiczno-termiczna tkanin. Metoda badania i wymagania (faza 2, etap 2)
16. PN-EN 14885: 2015-10. Chemiczne środki dezynfekcyjne i antyseptyczne. Zastosowanie Norm Europejskich dotyczących chemicznych środków dezynfekcyjnych i antyseptycznych
17. PN-EN 13704: 2004. Chemiczne środki dezynfekujące. Ilościowa metoda zawiesinowa określania działania sporobójczego chemicznych środków dezynfekujących stosowanych w sektorze żywnościowym, warunkach przemysłowych, domowych oraz zakładach użyteczności publicznej. Metoda badania i wymagania (faza 2, etap 1)
18. PN-EN 14347: 2005. Chemiczne środki dezynfekcyjne i antyseptyczne – Podstawowe działanie sporobójcze. Metoda badania i wymagania (faza 1, etap 1)
19. PN-EN 14476+A1: 2015-10 Chemiczne środki dezynfekcyjne i antyseptyczne – Ilościowa zawiesinowa metoda określania wirusobójczego działania w obszarze medycznym – Metoda badania i wymagania (Faza 2/Etap 1)
20. Röhm-Rodowald E., Jakimiak B., Podgórska M., Chojecka A.: Ocena mikrobiologiczna skuteczności dezynfekcji chemiczno-termicznej bielizny szpitalnej zanieczyszczonej krwią. *Roczn. PZH*, **61**, 329–33 (2010)
21. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 22.04.2005 w sprawie szkodliwych czynników biologicznych dla zdrowia w środowisku pracy oraz ochrony zdrowia pracowników zawodowo narażonych na te czynniki. Dz.U. 2005; nr 81, poz. 716
22. Sauerbrei A., Wutzler P.: Testing thermal resistance of viruses. *Arch Virol.* **1**, 115–119 (2009)
23. Smulders E.: Laundry Detergents, Wiley-VCH, Weinheim, 2002
24. Sójka-Ledakowicz J., Lewartowska J., Gajdzicki B.: Technologia otrzymywania i właściwości równowagowego kwasu nadoctowego. *Przemysł Chemiczny*, **8/9**, 1171–1173 (2003)
25. Staniszevska M., Röhm-Rodowald E., Jakimiak B.: Działanie sporobójcze środków dezynfekcyjnych. *Zakażenia*, **5**, 12–17 (2006)
26. Tadeusiak B., Jakimiak B., Röhm-Rodowald E., Kanclerski K.: Wytyczne postępowania z bielizną szpitalną, Wydawnictwo Metodyczne NIZP-PZH, Warszawa 2004
27. Tadeusiak B.: Pralnia z barierą higieniczną (w) Higiena w placówkach opieki medycznej, red: G. Dulny, E. Lejbrandt, A. Tymoczko, Verlag Dashöfer, Warszawa, IV, 2003, s. 1–10
28. Tarka P.: Kwas nadoctowy i możliwości jego wykorzystania w dekontaminacji. *Zakażenia*, **1**, 6–11 (2013)
29. Ustawa o zapobieganiu oraz zwalczaniu zakażeń i chorób zakaźnych u ludzi z dnia 5 grudnia 2008 r. Dz. U. 2013; poz. 947 ze zmianami





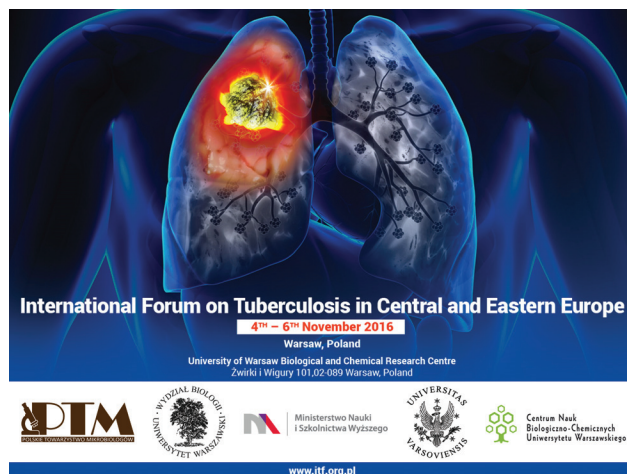
**Sprawozdanie z konferencji  
„International Forum on Tuberculosis in Central and Eastern Europe”**

**Warszawa, 5. 11. 2016 r.**

Dr n. med. Tomasz Jagielski

Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii,  
Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski;  
ul. I. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel. 22 55 41 431; fax: 22 55 41 402;  
e-mail: [t.jagielski@biol.uw.edu.pl](mailto:t.jagielski@biol.uw.edu.pl)

W dniu 5. listopada 2016 r., w Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego (UW) w Warszawie odbyła się konferencja pn. „International Forum on Tuberculosis in Central and Eastern Europe”. Organizatorem wydarzenia było Polskie Towarzystwo Mikrobiologów, zaś współorganizatorem Wydział Biologii UW. Honorowy patronat nad konferencją objęli Minister Nauki i Szkolnictwa Wyższego – Pan dr Jarosław Gowin oraz Ich Magnificencje Rektorzy: Uniwersytetu Warszawskiego – Pan prof. dr hab. Marcin Pałys oraz Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego – Pan prof. dr hab. Mirosław Wielgoś.



Konferencja miała charakter międzynarodowy i poświęcona była sytuacji epidemiologicznej gruźlicy w krajach należących geograficznie i politycznie do tzw. Europy Środkowo-Wschodniej. Wśród okoliczności, które dały impuls do podjęcia projektu, szczególne znaczenie miały ostatnie raporty Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) wskazujące na wciąż wysoką prevalencję gruźlicy w Europie Środkowo-Wschodniej, a także wyjątkowo ograniczona współpraca między krajami omawianego regionu zarówno w zakresie działalności naukowo-badawczej, jak i organizacyjnej (działania w ramach nadzoru epidemiologicznego i profilaktyki gruźlicy). O zaniechaniu takiej współpracy świadczy choćby brak

wspólnych projektów badawczych, opracowań wdrożeń, publikacji, doniesień zjazdowych itp.

W konferencji wzięło udział ok. 75 osób, w tym 22 zaproszonych gości, specjalistów w zakresie gruźlicy, reprezentujących 21 ośrodków zagranicznych z 20 krajów głównie Europy Środkowej i Wschodniej. Pozostali uczestnicy to pracownicy i studenci pochodzący z 12 ośrodków krajowych (akademickich, szpitalno-diagnostycznych itp.), a także kilkunastu gości honorowych, w tym Dziekan Wydziału Biologii UW – Pani prof. dr hab. Agnieszka Mostowska, Dyrektor Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych UW – Pani prof. dr hab. Ewa Bulska, Prezes Federacji Polskich Towarzystw

Medycznych – Pan prof. dr hab. n. med. Jerzy Majkowski oraz Wiceprezes Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych – Pani dr hab. Grażyna Sygitowicz.

Wykład otwarcia poprowadził dr Tomasz Jagielski, który przedstawił krótką historię gruźlicy jako epidemii i problemu naukowego. Następnie 20 referatów wygłosili, w dwóch sesjach, zaproszeni wykładowcy. Osia tematyczną wystąpień była epidemiologia gruźlicy w Europie Środkowo-Wschodniej, w szczególności zaś wskaźniki epidemiologiczne gruźlicy, zasady systemu rejestracji i raportowania zakażeń prątkowych, a także elementy kontroli i nadzoru epidemiologicznego nad gruźlicą w poszczególnych krajach regionu. Ważną częścią tematyki wykładów był przegląd stosowanych metod diagnostycznych, ze szczególnym uwzględnieniem metod molekularnych (diagnostyka molekularna), w rozpoznawaniu przypadków gruźlicy, w tym gruźlicy lekoopornej. Problematykę zjazdową uzupełniały zagadnienia dotyczące biologii, genetyki i ewolucji prątka gruźlicy (*Mycobacterium tuberculosis*).

Końcowy fragment konferencji poświęcono przeglądowi programów finansowania badań naukowych dotyczących gruźlicy oraz dyskusji o potrzebie ścisłej współpracy między krajami regionu na rzecz walki z chorobą oraz możliwościach zinstytucjonalizowania tej współpracy w regionie Europy Środkowo-Wschodniej.

«International Forum on Tuberculosis in Central and Eastern Europe» było wydarzeniem szczególnym, mającym wymiar naukowy, edukacyjny, ale też organizatorski. Przede wszystkim była to pierwsza konferencja poświęcona ściśle problematyce gruźlicy zorganizowana w Polsce przy tak szerokim udziale gości zagranicznych. To właśnie dzięki obecności wielu wybitnych ekspertów w dziedzinie gruźlicy i to z tak licznych krajów, konferencja stała się platformą dla przedstawienia najbardziej aktualnych danych dotyczących sytuacji epidemiologicznej gruźlicy w krajach Europy Środkowo-Wschodniej, w tym najnowszych wyników badań własnych, wcześniej niepublikowanych. Jednocześnie związły i przystępny sposób prezentacji danych sprzyjał popularyzatorskim celom konferencji. Chodziło bowiem o przybliżenie problematyki gruźlicy (i zagadnień pokrewnych) szerszemu, pozaspecjalistycznemu, audytorium. Bardzo ważne, w perspektywie społecznej, było wyeksponowanie najbardziej palących

problemów z zakresu kontroli i nadzoru epidemiologicznego nad gruźlicą, w tym np. zagrożeń związanych z nasiloną w ostatnim czasie migracją ludności.

Bez wątpienia konferencja przysłużyła się integracji międzynarodowego środowiska uczonych (mikrobiologów, lekarzy, diagnostów), związanych z gruźlicą, czy szerzej – chorobami zakaźnymi i umożliwiła dyskusję nad planami wielostronnej współpracy naukowo-badawczej. W podsumowaniu obrad wyrażono konieczność szerokiej kooperacji ośrodków naukowo-badawczych z krajów reprezentowanych przez wykładowców, a także wolę powołania międzynarodowego konsorcjum partnerskiego, podejmującego wspólne działania naukowe, a także popularyzujące wiedzę o gruźlicy i metodach walki z chorobą.

To właśnie powołanie międzynarodowego konsorcjum naukowo-badawczego, pod roboczą nazwą „Partnership to Fight Against TB in Central and Eastern Europe”, skupiającego najważniejsze ośrodki badań nad gruźlicą w Europie Środkowo-Wschodniej, reprezentowane przez zaproszonych gości stanowi jedno z najważniejszych osiągnięć konferencji. Stworzenie takiego konsorcjum pozwoli zintegrować wysiłki badawcze, poprzez tworzenie wspólnych projektów naukowych i wspólne występowanie o ich finansowanie z różnych budżetów zewnętrznych (np. programów Unii Europejskiej). Realizacja takich projektów, wspartych dotacjami rządowymi, unijnymi i innymi, umożliwi publikacje wyników w najlepszych wydawnictwach i periodykach naukowych, a także opracowanie monografii, skryptów, procedur, wytycznych i instrukcji w zakresie diagnostyki, terapii i profilaktyki gruźlicy, ważnych w wymiarze ogólnoświatowym.

Informacja o formalnym ukonstytuowaniu się konsorcjum oraz szczegółowych celach i formach jego działania zostanie zamieszczona w następnym numerze „Postępów Mikrobiologii”.

\* \* \*

„Konferencja pn. „International Forum on Tuberculosis in Central and Eastern Europe” była finansowana w ramach umowy 912/P-DUN/2016 ze środków Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego przeznaczonych na działalność upowszechniającą naukę”.



## INFORMACJE ZARZĄDU GŁÓWNEGO PTM

W trakcie XXVIII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, które odbyło się w dniach 25–27 września 2016 r. w Bydgoszczy, uczestnicy Walnego Zgromadzenia Delegatów PTM wybrali nowe Prezydium Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów oraz Główną Komisję Rewizyjną na kadencję 2016–2020.



Prezes PTM  
Prof. dr hab. Stefan Tyski  
[s.tyski@nil.gov.pl](mailto:s.tyski@nil.gov.pl)

Absolwent Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, który ukończył w 1976 roku. Przez 17 lat pracował w Zakładzie Bakteriologii Państwowego Zakładu Higieny, po czym 2 lata w Centralnym Laboratorium Surowic i Szczepionek. Od 20 lat jest Kierownikiem Zakładu Antybiotyków i Mikrobiologii Narodowego Instytutu Leków. Od października 2006 r. kieruje również Zakładem Mikrobiologii Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Od 2007 r. jest ekspertem Komisji Farmakopei Europejskiej. W 2010 r. został powołany na Zastępcę Przewodniczącego Komisji Farmakopei Polskiej.

Główne zainteresowania mikrobiologiczne prof. S. Tyskiego to zakażenia bakteryjne, aktywność i mechanizmy działania czynników przeciwbakteryjnych – antybiotyków, chemioterapeutyków, środków dezynfekcyjnych i antyseptycznych oraz mechanizmy oporności bakterii na ww. czynniki, a także zagadnienia mikrobiologii farmaceutycznej.

Jest autorem lub współautorem ponad 200 publikacji naukowych o łącznym współczynniku IF ponad 110,

indeks Hirscha wynosi 14, wypromował 5 doktorantów, kierował 7 grantami KBN i MNiSW, współorganizował 5 ogólnopolskich konferencji naukowo-szkoleniowych dotyczących mikrobiologii farmaceutycznej.

Jest członkiem Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych.

Do Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów należy od 39 lat, od 14 lat jest delegatem PTM do Federacji Europejskich Towarzystw Mikrobiologicznych FEMS i Międzynarodowej Unii Towarzystw Mikrobiologicznych IUMS. Był członkiem Zarządu Oddziału Warszawskiego PTM, wygłosił wiele wykładów na posiedzeniach PTM. Został wyróżniony Odznaką PTM (2004 r.) i Odznaką Oddziału Krakowskiego PTM (2012 r.).



Wiceprezes PTM  
Prof. dr hab. n. med. Ewa Augustynowicz-Kopec  
[e.kopec@igichp.edu.pl](mailto:e.kopec@igichp.edu.pl)

Specjalistka z zakresu Zdrowia Publicznego i Mikrobiologii Medycznej. W 1985 roku rozpoczęła pracę w Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc jako asystent naukowo-badawczy. Kilka lat później objęła kierownictwo dwóch pracowni Zakładu: Monitorowanej Terapii Gruźlicy oraz Diagnostyki Gruźlicy

i Mykobakterioz. Od 2011 roku jest Kierownikiem Zakładu Mikrobiologii IGiChP, Referencyjnego Laboratorium Prątka Gruźlicy w Polsce. Główne zainteresowania Prof. Augustynowicz-Kopeć związane są z gruźlicą występującą u ludzi i zwierząt. W roku 2002 za pracę naukową została uhonorowana prestiżową nagrodą UNESCO „Dla Kobiet i Nauki” oraz otrzymała stypendium firmy L’Oreal Polska na ukończenie pracy habilitacyjnej. Jest autorem lub współautorem ponad 200 publikacji naukowych o łącznym współczynniku IF 164,378. Prace były cytowane 1235 razy, a indeks Hirscha wynosi 17. Jest promotorem 3 przewodów doktorskich nagrodzonych wyróżnieniem, a także recenzentem: prac naukowych w czasopismach krajowych i zagranicznych, projektów badawczych, habilitacji, doktoratów, oraz prac magisterskich. Bierze aktywny udział w działaniach następujących Towarzystw Naukowych i Stowarzyszeń: Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc, Komitetu Immunologii i Etiologii Zakażeń Człowieka Polskiej Akademii Nauk, Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych i European Society of Mycobacteriology.

Od 2004 roku należy do Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, brała czynny udział i organizowała liczne konferencje pod patronatem PTM, od 2012 r. do chwili obecnej pełni funkcję wiceprezesa Towarzystwa.



Wiceprezes PTM  
Prof. dr hab. Jacek Międzobrodzki  
jacek.miedzobrodzki@uj.edu.pl

Absolwent Wydziału Farmacji i studiów doktoranckich w Instytucie Mikrobiologii Akademii Medycznej w Krakowie. Zatrudniony od 1985 r. w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ. Stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych uzyskał w roku 1984, doktora habilitowanego w 2002 r. Od 2011 zatrudniony jest na etacie profesora nadzwyczajnego UJ; od 2014 r. z tytułem profesora. Diagnosta laboratoryjny, członek Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych, specjalista zdrowia publicznego.

Autor oryginalnych publikacji w *J. Clin. Microbiol.*, *J. Med. Microbiol.*, *PLoSOne*, *Pol. J. Microbiol.*, *Med.*

*Dośw. Mikrobiol.*, *Postępy Mikrobiol.*, prac przeglądowych, rozdziałów w podręcznikach zagranicznych; haseł w Encyklopedii Biologicznej, Wyd. Opres Kraków 2000 r. i w Słowniku Biologii Komórki, PAN Kraków 2005 r. Członek Rady Redakcyjnej „Postępy Mikrobiologii”. Odbył staże naukowe w Szwecji na Uniwersytetach w Lund i w Malmo; w Holandii, Niemczech, na Ukrainie. Kierownik krajowych projektów badawczych. Obecnie kieruje grupą badawczą, głosi wykłady z mikrobiologii dla studentów biochemii, biofizyki, biotechnologii, ochrony środowiska. Profesor gościnny Uniwersytetu w Groningen.

Zainteresowania naukowe: molekularne mechanizmy zakażeń *Staphylococcus* spp.

Prof. J. Międzobrodzki od 1980 r. jest członkiem Oddziału Krakowskiego PTM; w latach 2012–16 był Przewodniczącym Oddziału. Współorganizował ogólnopolskie zjazdy naukowe w 1992 i 2008 roku; w latach 2008–2012 był w Zarządzie Głównym PTM.



Sekretarz PTM  
Dr n. farm. Agnieszka Ewa Laudy  
alaudy@wp.pl

Absolwentka Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej, kierunku Farmacja, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, który ukończyła w 1992 roku. Od 1992 r. pracuje w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Jest autorem lub współautorem 30 publikacji naukowych o łącznym współczynniku IF około 30, indeks Hirscha wynosi 7. Jest promotorem pomocniczym 2 doktorantów WUM, była promotorem 5 prac magisterskich wykonanych przez studentów SGGW w Warszawie, opiekunem 27 prac magisterskich zrealizowanych na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Analityki Medycznej WUM oraz wykonawcą w 4 grantach KBN. Jest członkiem Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych.

Główne zainteresowania mikrobiologiczne dr Agnieszki E. Laudy to: aktywność i mechanizmy działania czynników przeciwbakteryjnych (antybiotyki, chemiotrapeutyki, środki dezynfekcyjne, nowosyntezo-

wane związki, substancje pochodzenia roślinnego i wytwarzane przez drobnoustroje) oraz mechanizmy oporności Gram-ujemnych pałeczek niefermentujących na powyższe czynniki, a przede wszystkim współwystępowanie, wzajemne zależności oraz udział w oporności różnych typów  $\beta$ -laktamaz i pomp MDR (odpowiedzialnych za zjawisko „efflux”).

Do Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów należy od 22 lat. W latach 2008–2016 była sekretarzem w Komisji Rewizyjnej Oddziału Warszawskiego PTM.

Otrzymała stypendia FEMS Research Grant i ÖAD (Österreichischen Akademischen Austauschdienst) finansowane przez Austriackie Ministerstwo Spraw Zagranicznych na Technische Universität Wien w Austrii. W 2016 r. otrzymała Medal Komisji Edukacji Narodowej.



Członek Zarządu Głównego PTM  
Prof. dr hab. Elżbieta Anna Trafny  
elzbieta.trafny@wat.edu.p

Absolwentka Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, który ukończyła w 1983 roku. W latach 2004–2014 była kierownikiem Zakładu Mikrobiologii WIHiE. Od 2014 roku zatrudniona w Centrum Inżynierii Biomedycznej Instytutu Optoelektroniki WAT. W ramach swojej działalności zajmuje się obecnie wykorzystaniem metod biologii molekularnej i nanotechnologii do rozwoju innowacyjnych technik medycznych. W latach 2012–2014 pełniła funkcję naukowego eksperta „Independent Scientific Evaluation Group” w programie badań naukowych NATO “Science for Peace and Security”. W 2013 roku powołana przez Ministra Zdrowia na Zastępcę Przewodniczącego Krajowej Komisji Certyfikacyjnej do Spraw Eliminacji Poliomyelitis. Jest członkiem Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych i wieloletnim członkiem Rady Redakcyjnej czasopisma Postępy Mikrobiologii.

Główne obszary zainteresowań naukowych prof. Trafny to adhezja bakterii, właściwości biofilmów, me-

chanizmy chorobotwórczości bakterii w zakażeniach przewlekłych oraz nowoczesna diagnostyka mikrobiologiczna próbek klinicznych i środowiskowych. Łączny współczynnik IF dla ponad 75 publikacji, których jest autorką lub współautorką wynosi 72, natomiast indeks Hirscha ma wartość 12. Prace te były cytowane ponad 650-krotnie. Współautorka dwóch patentów dotyczących sposobów miejscowego leczenia ran. Kierowała pięcioma i współrealizowała dziewięć projektów badawczych KBN, NCN i NCBiR. Była stypendystką Zakładu Medycyny Uniwersytetu Kalifornijskiego w San Diego, USA.

Do Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów należy od ponad 25 lat. W tym czasie wygłosiła szereg wykładów na posiedzeniach i konferencjach pod patronatem PTM.



Członek Zarządu Głównego PTM  
Dr hab. Beata Anna Sadowska, prof. nadzw. UŁ  
bsadowska@yahoo.com

Absolwentka Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie: Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska) Uniwersytetu Łódzkiego, który ukończyła w 1996 r. Od 1998 r. pracuje w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej UŁ, będąc od 2015 r. kierownikiem Pracowni Biologii Zakażeń. Jest współautorem 80 publikacji naukowych o łącznym współczynniku IF ponad 60, wypromowała jednego doktoranta, kierowała i była wykonawcą w grantach NCN, była przewodniczącą lub członkiem komitetów organizacyjnych trzech konferencji o zasięgu ogólnopolskim i trzech konferencji o zasięgu międzynarodowym z dziedziny mikrobiologii.

Zainteresowania badawcze dr hab. B. Sadowskiej koncentrują się wokół bakteryjnych i grzybiczych zakażeń u ludzi, głównie o etiologii *Staphylococcus* spp. i *Candida* spp., przebiegających z udziałem biofilmów tych drobnoustrojów. Prowadzone w ostatnich latach badania dotyczą poszukiwania alternatywnych i/lub wspomagających strategii terapeutycznych tego typu infekcji. Drugi, równoległe rozwijany nurt

badawczy obejmuje analizę właściwości biologicznych powierzchni biomateriałów przeznaczonych do zastosowań medycznych.

Pani dr hab. B. Sadowska jest wieloletnim członkiem Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, była wiceprzewodniczącą Oddziału Łódzkiego PTM w latach 2004–2008 oraz przewodniczącą tego Oddziału w latach 2008–2016. Jest członkiem Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych, Towarzystwa Mikrobiologii Klinicznej, American Society for Microbiology. W latach 2012–2016 była członkiem Komitetu Mikrobiologii PAN, zaś od 2016 r. jest członkiem Komitetu Biologii Molekularnej Komórki PAN.



Członek Zarządu Głównego PTM  
Dr n. med. Joanna Jursa-Kulesza  
asiaju@pum.edu.pl

Absolwentka Wydziału Lekarskiego Pomorskiej Akademii Medycznej, obecnie Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego (PUM), który ukończyła w 1997 roku. W 1998 roku rozpoczęła pracę w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii i Immunologii PUM. Od sierpnia 2016 roku p.o. Kierownika Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej w Katedrze Mikrobiologii, Immunologii i Medycyny Laboratoryjnej PUM. Otrzymała m.in. staże zawodowe w klinikach niemieckich jak i naukowe, biorąc udział w kursach krajowych i międzynarodowych organizowanych przez ESMID, CDC. W 2005 roku uzyskała tytuł specjalisty w zakresie mikrobiologii lekarskiej, a w 2007 roku obroniła rozprawę doktorską. Od 2015 roku pełni funkcję konsultanta wojewódzkiego w dziedzinie mikrobiologii lekarskiej w województwie lubuskim. W latach 2001–2012 lekarz konsultant mikrobiolog kliniczny w Szpitalu SPSK nr 2 w Szczecinie, od maja 2016 roku w Wielospecjalistycznym Szpitalu Wojewódzkim w Gorzowie Wielkopolskim.

W kręgu zainteresowań naukowych znajdują się zakażenia szpitalne, antybiotykoterapia, mechanizmy oporności bakterii na antybiotyki, zakażenia bakte-

ryjne, biologia molekularna i jej praktyczne zastosowanie w epidemiologii szpitalnej. Na macierzystej uczelni promotor 4 prac magisterskich, wieloletni opiekun koła naukowego, promotor pomocniczy pracy doktorskiej, wielokrotnie otrzymywała nagrodę naukową przyznaną przez Rektora PUM.

Członek kilku Towarzystw Naukowych. Z Polskim Towarzystwem Mikrobiologii związana jest prawie 20 lat, początkowo jako członek oddziału w Szczecinie, potem przez 2 kadencje – sekretarz, a od 2012 roku Przewodnicząca Oddziału.



Przewodnicząca Głównej Komisji Rewizyjnej PTM  
Dr n. med. Elżbieta Magdalena Stefaniuk  
estefaniuk@cls.edu.pl

Absolwentka Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Warszawskiego na kierunku Analityka Kliniczna. W roku 2004 uzyskała stopień doktora nauk medycznych na I Wydziale Lekarskim WUM. Ukończyła specjalistyczne kształcenie podyplomowe w dziedzinach mikrobiologia (specjalizacja II<sup>o</sup>) i analityka kliniczna (specjalizacja I<sup>o</sup>). W latach 2012–2013 była słuchaczem studiów podyplomowych dla kadry zarządzającej podmiotów leczniczych Menedżer Ochrony Zdrowia w Wyższej Szkole Zarządzania i Informatyki w Olsztynie im. Prof. Tadeusza Kotarbińskiego.

W latach 1984–1997 pracowała jako asystent w Centralnym Laboratorium Diagnostycznym oraz asystent i z-ca Kierownika Samodzielnej Pracowni Bakteriologii, a także członek zespołu ds. zakażeń szpitalnych Szpitala Bielańskiego w Warszawie. Od roku 1998 pracuje jako adiunkt w Zakładzie Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej Narodowego Instytutu Leków w Warszawie. Od roku 2004 pełni funkcję zastępcy dyrektora Centralnego Ośrodka Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej.

Jest autorem i współautorem 64 publikacji, w tym prac oryginalnych, o charakterze rekomendacji i popularyzujących wyniki badań i wiedzę z obszaru mikro-

biologii lekarskiej; autorem monografii i rozdziału w podręczniku. Bierze czynny udział w konferencjach, kształceniu specjalistycznym diagnostów laboratoryjnych, lekarzy i pielęgniarek. Była kierownikiem specjalizacji w dz. mikrobiologii i mikrobiologii medycznej licznego grona diagnostów laboratoryjnych i biologów.

W latach 2004–2012 pełniła funkcje Sekretarza Zarządu Głównego PTM, w latach 2012–2016 była przewodniczącą Głównej Komisji Rewizyjnej PTM. Jest wiceprezesem IV kadencji Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych.



Sekretarz Głównej Komisji Rewizyjnej PTM  
Dr hab. n. med. Alina Małgorzata Olender  
alinaolender@umlub.pl

Specjalista mikrobiolog, kierownik Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, konsultant wojewódzki (woj. lubelskie) w dz. mikrobiologii lekarskiej, członek Rady Naukowej WIHE w Warszawie. Członek ECCMID od 2008 r., członek Lubelskiego Towarzystwa Naukowego. Brała aktywny udział w pracach Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej.

Dydaktyk (zajęcia z kierunkami: lekarski, pielęgniarstwo, położnictwo, biomedycyna i in.), kierownik osób specjalizujących się z mikrobiologii medycznej, promotor trzech ukończonych prac doktorskich, dwóch otwartych, recenzent rozpraw doktorskich, prac magisterskich i publikacji w czasopismach krajowych i zagranicznych. Opiekun Studenckiego Koła Naukowego. Główne aktualne tematy zainteresowań i badań naukowych: udział *Corynebacterium* spp., *Propionibacterium* spp., *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* spp. i in. w zakażeniach u ludzi, ze szczególnym uwzględnieniem gatunków oportunistycznych, ich czynników wirulencji, mechanizmów oporności na antybiotyki oraz genów za nie odpowiedzialnych; patogeny wewnątrzkomórkowe – patomechanizmy zakażenia, czynniki wirulencji; wytwarzanie biofilmu, postaci planktonicznej przez bakterie i grzyby – patomechanizm zakażeń a odpowiedź układu immunologicznego; problemy serologicznej diagnostyki chorób zakaźnych; działanie przeciwdrobnoustrojowe i przeciwgrzybiczne nowo syntetyzowanych związków chemicznych i preparatów roślinnych.

Członek PTM od 1987 r. Pełnione funkcje: członek, Sekretarz Zarządu Oddziału Lubelskiego, Członek Zarządu Głównego.



Członek Głównej Komisji Rewizyjnej PTM  
Dr hab. inż. Sławomir Ciesielski  
slawomir.ciesielski@uwm.edu.pl

Absolwent Wydziału Ochrony Środowiska i Rybnictwa ówczesnej Akademii Rolniczo-Technicznej w Olszynie. Od roku 2002 jest pracownikiem Katedry Biotechnologii w Ochronie Środowiska Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. W latach 2012–2016 pełnił funkcję Prodziekana ds. Nauki na Wydziale Nauk o Środowisku UWM w Olsztynie.

Dr hab. inż. Sławomir Ciesielski jest autorem ponad 50 recenzowanych artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Realizował 13 projektów naukowych finansowanych ze źródeł zewnętrznych zarówno jako kierownik jak i główny wykonawca. Wypromował 2 doktorów, 21 magistrów oraz 16 inżynierów. Główne zainteresowania naukowe dr hab. inż. S. Ciesielskiego to mikrobiologiczna produkcja biopolimerów, badanie procesów regulacji ekspresji genów z wykorzystaniem podejścia transkryptomycznego, mikrobiologiczne przemiany związków azotowych, zastosowanie metod metagenomicznych i bioinformatycznych w badaniach mikrobiomów środowisk naturalnych i antropogenicznych.

Do Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów należy od 6 lat. W latach 2012–2016 pełnił funkcję wiceprzewodniczącego Oddziału Olsztyńskiego PTM.



Członek Głównej Komisji Rewizyjnej PTM  
Dr n. med. Katarzyna Pancer  
kpancer@pzh.gov.pl

Absolwentka Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, który ukończyła w 1991 r. Zastosowanie badań mikrobiologicznych poznała podczas pracy w Dziecięcym Państwowym Szpitalu Klinicznym nr 3 AM w Warszawie. Od 1994 r. pracuje w Narodowym Instytucie Zdrowia Publicznego – Państwowym Zakładzie Higieny w Warszawie, najpierw w Zakładzie Bakteriologii, a od 2007 r. w Zakładzie Wirusologii NIZP-PZH. Od 2010 r. jest także Kierownikiem Laboratorium BSL3 NIZP-PZH oraz koordynuje pracę wielodyscyplinarnego zespołu powyższego laboratorium. Odpowiada za organizację pracy Lab. BSL3 i Zespołu, opracowuje i wdraża diagnostykę zakażeń wywołanych wysoce niebezpiecznymi patogenami człowieka takimi jak wirus Ebola, koronawirus MERS, wirus Zika.

Oprócz reagowania na zmieniającą się sytuację epidemiczną prowadzi także badania naukowe. Zagadnienia związane z oddziaływaniem mikroorganizmów na organizm człowieka, zmiany w zjadliwości drobnoustrojów oportunistycznych są głównym tematem jej badań. Obecnie bierze udział w projekcie ESGLI dot. mikrobiomu w systemie wody ciepłej.

Członek Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów od 1995 r., była sekretarzem Oddziału Warszawskiego PTM w latach 2001–2008. Wówczas wprowadzono zasadę planowania posiedzeń naukowych O/Warszawskiego PTM na dany rok akademicki, co pozwoliło przyznawać punkty edukacyjne uczestnikom tych posiedzeń. Jest członkiem EVDLabnet – sieci zajmującej się identyfikowaniem ważnych z punktu widzenia zdrowia publicznego wirusowych zakażeń; ESGLI – dot. zakażeń *Legionella* spp. Jest członkiem Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych, Polskiego Towarzystwa Wirusologicznego, Polskiego Towarzystwa Zakażeń Szpitalnych.



Członek Głównej Komisji Rewizyjnej PTM  
Dr hab. n. biol. inż. Anna Sip  
aniasip@up.poznan.pl

Absolwentka Wydziału Nauk o Żywności i Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, który ukończyła w 1994 roku. Od 1996 r. pracuje w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. W 2013 roku decyzją Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego otrzymała stopień naukowy doktora habilitowanego nauk biologicznych w zakresie mikrobiologii – mikrobiologii technicznej.

W skład jej dorobku publikacyjnego wchodzi 40 prac oryginalnych oraz 25 prac przeglądowych o łącznym współczynniku IF ponad 30, indeks Hirscha wynosi 5. Dr hab. Anna Sip jest też autorem lub współautorem 1 patentu, 11 zgłoszeń patentowych oraz ponad 100 niepublikowanych opracowań i ekspertyz wykonanych dla przemysłu. Była promotorem 58 prac magisterskich oraz 31 prac inżynierskich i licencjackich, kierowała 3 grantami.

Główne zainteresowania mikrobiologiczne dr hab. Anny Sip to mikrobiota produktów regionalnych, aktywność przeciwdrobnoustrojowa bakterii fermentacji mlekowej, biosynteza bakteriocyn i ich wykorzystanie, bioutrwalanie żywności, zwalczanie *Listeria monocytogenes*. Dr hab. Anna Sip prowadzi też badania nad opracowywaniem biopreparatów niszczących drobnoustroje chorobotwórcze, tworzeniem opakowań aktywnych i środków dezynfekcyjnych. Efektem jej dotychczasowej działalności naukowo-badawczej jest wdrożenie do przemysłu nowych preparatów probiotycznych, kultur starterowych i ochronnych.

Do Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów należy od 11 lat. W latach 2005–2009 była sekretarzem Oddziału Poznańskiego PTM, a od 2009 do chwili obecnej jest członkiem Zarządu Oddziału Poznańskiego PTM.



**W trakcie wyborów przeprowadzonych w Oddziałach Terenowych PTM wybrano również nowe władze Oddziałów.**



Przewodnicząca Oddziału Terenowego PTM  
w Białymstoku  
Dr n. med. Tamara Daniluk  
tamara.daniluk@umwb.edu.pl

Absolwentka Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, który ukończyła w 1993 roku uzyskując tytuł lekarza. Od maja 1994 roku pracuje w Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. W 2001 roku uzyskała II stopień specjalizacji w zakresie mikrobiologii, a w 2004 stopień doktora nauk medycznych. Kierownik ukończonych specjalizacji z mikrobiologii lekarskiej dwóch rezydentów – lekarzy; czynny udział w pracach Komisji Kwalifikacyjnej dla lekarzy ubiegających się o etaty rezydentów oraz w pracach Komisji Egzaminacyjnych na I° z mikrobiologii. Prowadzenie szkoleń podyplomowych indywidualnych dla lekarzy różnych specjalności oraz mikrobiologów. Jest autorem lub współautorem 28 publikacji naukowych o łącznym współczynniku IF około 15, indeks Hirscha wynosi 7. Jest współwykonawcą w grantie NCN na lata 2016–2018 oraz kierownikiem i wykonawcą licznych prac statutowych.

Od 1994 roku jest członkiem Izby Lekarskiej a od 2003 roku członkiem Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych.

Do głównych zainteresowań mikrobiologicznych dr Tamary Daniluk należą: zakażenia bakteryjne i grzybicze, epidemiologia i badania lekooporności Gram-ujemnych pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz pałeczek niefermentujących z uwzględnieniem mechanizmów warunkujących oporność.

Do Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów należy od 22 lat. W latach 2000–2008 była wiceprzewodniczącą Zarządu Oddziału PTM w Białymstoku, od 2009 roku pełni funkcje Przewodniczącej tego Oddziału PTM.



Przewodnicząca Oddziału Terenowego PTM  
w Bydgoszczy  
Dr n. med. Alicja Sękowska  
asekowska@cm.umk.pl

Absolwentka Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Od początku swojej pracy zawodowej związana była z Akademią Medyczną im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy i Państwowym Szpitalem Klinicznym im. dr. A. Jurasza w Bydgoszczy.

Od kilkunastu lat pracuje jako nauczyciel akademicki w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu oraz jako starszy asystent w Zakładzie Mikrobiologii Klinicznej Szpitala Uniwersyteckiego nr 1 im. dr. A. Jurasza w Bydgoszczy. W 2011 roku uzyskała specjalizację z mikrobiologii medycznej. Od 2003 roku prowadzi wykłady na kursach specjalizacyjnych dla lekarzy i diagnostów laboratoryjnych. Była kierownikiem czterech kursów specjalizacyjnych. Jest autorem lub współautorem ponad 40 publikacji naukowych.

Główne zainteresowania mikrobiologiczne dr Alicji Sękowskiej to: czynniki wirulencji i zakażenia bakteriami (głównie pałeczkami z rodzajów *Klebsiella* i *Raoultella*) oraz mechanizmy oporności bakterii Gram-ujemnych na antybiotyki.

Była współorganizatorem XXVIII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów oraz czterech ogólnopolskich konferencji naukowo-szkoleniowych. Jest członkiem Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych. W 2016 roku otrzymała nagrodę KIDL „Zasłużony diagnosta”. Od kilkunastu lat jest członkiem Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, a od 2012 roku pełni funkcję Przewodniczącej PTM Oddział w Bydgoszczy.



Przewodnicząca Oddziału Terenowego PTM  
w Gdańsku

Dr hab. Beata Krawczyk, prof. nadzw. PG  
beakrawc@pg.gda.pl

Pracownik Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii (dawniej Katedra Mikrobiologii), na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej od roku 1991 (obecnie pełniąc obowiązki Kierownika Katedry). Stopień naukowy doktora nauk przyrodniczych w dyscyplinie biologia (1997). Stopień naukowy doktora habilitowanego nauk biologicznych w dyscyplinie biologia uzyskała w 2009 r. W 2012 r. – otrzymała stypendium i odbyła staż naukowy w University of the Mediterranean, Faculty of Medicine of Marseilles, Francja, jako profesor wizytujący. Od 2016 roku zajmuje stanowisko profesora nadzwyczajnego PG. Współpraca naukowa z Meharry Medical College, Nashville, USA. Kierownik w czterech projektach badawczych MNISW, w ośmiu projektach – główny wykonawca oraz realizator w projekcie w ramach Centrum Transferu Technologii „Inkubator Innowacyjności”. Promotor 52 prac magisterskich i inżynierskich. Promotor w 1 przewodzie doktorskim zakończonym; promotor w 2 otwartych, 1 – bez otwartego przewodu doktorskiego (opiekun). Według Web of Science: 39 publikacji, suma cytowań 268; indeks Hirscha 10, współautor 5 podręczników akademickich i skryptów.

Zainteresowania zawodowe: diagnostyka molekularna w mikrobiologii, epidemiologia molekularna, biotechnologia, konstrukcja nowych molekularnych testów diagnostycznych do wykrywania, identyfikacji oraz typowania genetycznego drobnoustrojów, nowe natywne i modyfikowane polimerazy DNA jako narzędzia w reakcji PCR, analiza czynników wirulencji.

Działalność w PTM od 2001 roku. 2008–2012 sekretarz Oddziału Gdańsk PTM, od 2012 – przewodnicząca Oddziału Gdańsk PTM.



Przewodnicząca Oddziału Terenowego PTM  
w Katowicach

Dr hab. n. med. Alicja Ekiel  
aekiel@sum.edu.pl

Absolwentka Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Od 1983 roku pracuje w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego. Prowadzi wykłady, seminaria i ćwiczenia z mikrobiologii lekarskiej i immunologii dla studentów Wydziału Lekarskiego SUM. Prowadzi kursy w ramach specjalizacji dla diagnostów laboratoryjnych i lekarzy. Uczestniczy jako wykładowca w konferencjach naukowo-szkoleniowych.

Tematyka prac badawczych głównie dotyczy zakażeń mykoplazmami urogenitalnymi, *Chlamydia trachomatis*, wirusem HPV a także zakażeń implantów, lekowrażliwości bakterii, aktywności peptydów anty-drobnoustrojowych, mikroflory człowieka.

Posiada specjalizację z mikrobiologii, jest kierownikiem specjalizacji z mikrobiologii medycznej diagnostów laboratoryjnych.

Jako członek Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej w latach 2000–2004 i 1996–2000 pełniła funkcję członka Komisji Rewizyjnej Oddziału Katowickiego PTIDiK. Jest członkiem Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych (w latach 2003–2006 była Członkiem Zarządu Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych). Współpracuje z Polskim Centrum Akredytacji, jako auditor prowadziła oceny w akredytowanych jednostkach.

Członek Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, w latach 2004–2008 pełniła funkcję Członka Zarządu, w latach 2008–2012 Sekretarza Zarządu Oddziału Katowice. Od roku 2012 jest Przewodniczącą Oddziału Katowickiego PTM.



Przewodnicząca Oddziału Terenowego PTM  
w Kielcach  
Dr Wioletta Adamus-Białek  
wioletta.adamus-bialek@ujk.edu.pl

W 2003 roku ukończyła studia na kierunku biologia Akademii Świętokrzyskiej w Kielcach, poczym rozpoczęła studia doktoranckie w Pracowni Genetyki Molekularnej Centrum Biologii Medycznej PAN w Łodzi. Tytuł doktora nauk biologicznych w dyscyplinie mikrobiologia, specjalności genetyka bakterii uzyskała na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Ukończyła także studia podyplomowe „Menedżer komercjalizacji i transferu wiedzy” na UJK oraz „Zarządzanie Organizacjami Ochrony Zdrowia” w SGH. Od 2008 r. pracowała w Katedrze Ochrony i kształtowania Środowiska Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach, a obecnie pełni funkcję adiunkta w Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Nauk Medycznych tej uczelni. Była promotorem kilkudziesięciu prac dyplomowych, obecnie jest promotorem pomocniczym pracy doktorskiej. Jej zainteresowania naukowe dotyczą patogenów dróg moczowych, w szczególności badania zależności pomiędzy lekoopornością tych szczepów, a innymi właściwościami patogennymi. Uczestniczyła w realizacji trzech projektów naukowych, w tym jako kierownik projektu NCN – Sonata.

W 2012 roku przebywała na czteromiesięcznym stypendium w Karolinska Institute, Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology (MTC) w Sztokholmie, a w 2014 roku na dwumiesięcznym stypendium w School of Biological Sciences, University of East Anglia w Norwich, finansowane z projektu „PROGRES-Program rozwoju: Gospodarka-Edukacja-Sukces”.

Jest autorem lub współautorem 14 publikacji naukowych o łącznym współczynniku IF 16, indeks Hirscha wynosi 3.

Do Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów należy od 8 lat. W latach 2009–2012 była Sekretarzem, a w kolejnej kadencji pełniła obowiązki zastępcy przewodniczącego Oddziału Kieleckiego PTM.



Przewodnicząca Oddziału Terenowego PTM  
w Krakowie  
Dr n. farm. Anna Białecka  
bialecka.ania@gmail.com

Jest absolwentką Wydziału Farmacji Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, kierunek Farmacja Kliniczna. Pracę doktorską dotyczącą immunogenności drobnoustrojów z rodzaju *Propionibacterium* obroniła na Wydziale Lekarskim Collegium Medicum UJ. W latach 1982–1990 pracowała w Instytucie Mikrobiologii Collegium Medicum UJ. Od roku 1991 kieruje wspólnie z dr Andrzejem Kasprowiczem Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek im. dr Jana Bobra w Krakowie.

Dr Anna Białecka jest Członkiem Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych, specjalistą w zakresie mikrobiologii oraz w zakresie zdrowia publicznego. Posiada szereg certyfikatów z zakresu badań lekowrażliwości i mechanizmów oporności m.in.: „Antimicrobial Resistance in Bacteria; Basis and Laboratory Detection”. Prowadzi liczne szkolenia z zakresu standardów leczenia dla lekarzy, jest wykładowcą Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków pod patronatem Ministra Zdrowia. Jest promotorem wielu prac dyplomowych.

Jest autorką i współautorką ponad 30 publikacji naukowych oraz wydanej w 2013 roku pod patronatem Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych książki: „Atlas stopni czystości pochwy”.

Zainteresowania naukowe: rola drobnoustrojów w bakteryjnych zakażeniach skóry (acne, furunculosis), zakażenia dróg oddechowych (*Haemophilus*), analiza mechanizmów patogenności drobnoustrojów oraz standaryzacja metod oznaczania lekowrażliwości.

Do Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów należy od wielu lat. Współorganizowała XXII Zjazd PTM w Krakowie w 1992 r. oraz liczne konferencje i sympozja naukowe w Oddziale Krakowskim. W latach 2008–2016 pełniła funkcję Sekretarza Oddziału.



Przewodnicząca Oddziału Terenowego PTM  
w Lublinie

Prof. dr hab. Wanda Małek  
wanda.malek@poczta.umcs.lublin.pl

Absolwentka studiów magisterskich na kierunku biologia – specjalność mikrobiologia Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. W roku 1978 uzyskała stopień doktora nauk przyrodniczych, a w roku 1993 stopień naukowy doktora habilitowanego nauk biologicznych w zakresie mikrobiologii. W 2003 roku, Prezydent Rzeczypospolitej Polskiej nadał jej tytuł naukowy profesora nauk biologicznych.

Prof. dr hab. Wanda Małek jest współautorem 61 prac eksperymentalnych z listy JCR, 11 prac przeglądowych, 64 doniesień konferencyjnych i 1 patentu. Jest promotorem pięciu prac doktorskich i wielu prac magisterskich.

Zainteresowania naukowe prof. dr hab. Wandy Małek początkowo koncentrowały się na zagadnieniach kontroli symbiozy ryzobium – roślina bobowata. Obecnie dotyczą one głównie taksonomii i pokrewieństwa filogenetycznego bakterii brodawkowych tworzących

symbiozę z dziko rosnącymi roślinami bobowatymi i właściwości promujących wzrost ich gospodarzy.

Od wielu lat, prof. dr hab. Wanda Małek jest aktywnym członkiem Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Uczestniczyła w Zjazdach PTM i konferencjach organizowanych przez członków PTM Oddział Lublin. Na ostatnim Zjeździe PTM w Bydgoszczy zespół badawczy prof. dr hab. Wandy Małek został wyróżniony Nagrodą Naukową im. Prof. Edmunda Mikulaszka II stopnia za prace eksperymentalne wykonane w latach 2014–2015. Od roku 2012, prof. dr hab. Wanda Małek jest przewodniczącą Oddziału Lubelskiego PTM.



Przewodnicząca Oddziału Terenowego PTM  
w Łodzi

Dr hab. Beata Gutarowska, prof. nadzw. PŁ  
beata.gutarowska@p.lodz.pl

Absolwentka Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego. Pracowała w Instytucie Mikrobiologii i Immunologii UŁ oraz po ukończeniu studiów doktoranckich na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej w Instytucie Technologii Fermentacji i Mikrobiologii PŁ, od 2013 r. jest Dyrektorem tego Instytutu. Prowadzi aktywnie działalność jako członek Zarządu International Biodeterioration and Biodegradation Society organizując międzynarodowe i krajowe konferencje (Biodeterioration and Biodegradation Symposium, Biodeterioration and Protection of Cultural Heritage, Rozkład i Korozja Materiałów Technicznych). Jest autorem lub współautorem 6 monografii, ponad 100 publikacji naukowych o łącznym współczynniku IF 120, indeks Hirscha wynosi 10, wypromowała 2 doktorantów, kolejnych dwóch jest w trakcie realizacji pracy doktorskiej. Kierowała 2 grantami NCBiR, koordynowała pracę w projek-

cie Wyszehradzkim dotyczącym biodeterioracji obiektów archiwalnych oraz projektu finansowanego przez Fundację Auschwitz-Birkenau na temat biodeterioracji zabytkowych budynków byłego obozu koncentracyjnego Auschwitz-II Birkenau.

Główne zainteresowania mikrobiologiczne dr hab. B. Gutarowskiej skupiają się na: korozji mikrobiologicznej materiałów technicznych, w tym obiektów zabytkowych, dezynfekcji, bioaerozolach, szczególne miejsce w tych badaniach zajmują grzyby strzępkowe o aktywności toksynotwórczej i alergennej. Dr hab. B. Gutarowska opracowała również preparat mikrobiologiczno-mineralny do usuwania związków odorowych w pomieszczeniach inwentarskich nagrodzony na licznych targach innowacji.

Do Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów należy od 2004 r.



Przewodnicząca Oddziału Terenowego PTM  
w Olsztynie  
Prof. dr hab. Łucja Łaniewska-Trokenheim  
lucja.laniewska-trokenheim@uwm.edu.pl

Absolwentka Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu im. Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, który ukończyła w 1975 roku. Przez 6 lat pracowała na Politechnice Białostockiej w Instytucie Budownictwa Lądowego w Zakładzie Technologii Wody i Ścieków. Od 32 lat pracuje na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim, na Wydziale Nauki o Żywności w Katedrze Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności. Od lutego 2007 roku do chwili obecnej jest Kierownikiem Katedry. Ponad 200 publikacji naukowych o łącznym współczynniku IF około 50, indeks Hirscha 9, wypromowała 5 doktorantów, kierowała 4 grantami KBN i MNiSW

oraz była wykonawcą 4 grantów. Była recenzentem prac dysertacyjnych i habilitacyjnych. Recenzentem w postępowaniu na stopień profesora, recenzentem projektów badawczych KBN. NCN, NCBiR. Była promotorem 156 prac magisterskich i 10 inżynierskich, na Wydziałach: Nauki o Żywności, Biologii i Biotechnologii, Bioinżynierii Zwierząt.

Główne zainteresowania badawcze to: metabolizm, fizjologia oraz właściwości przeciwdrobnoustrojowe bakterii fermentacji mlekowej i propionowej, wpływ wysokich ciśnień na drobnoustroje i ich metabolity, jakość mikrobiologiczna i bezpieczeństwo żywności, oporność na antybiotyki *Staphylococcus* i *Enterococcus* występujących w żywności.

Jest członkiem Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności. Od roku 2003 do 2015 była członkiem Komitetu Mikrobiologii PAN.

Do Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów należy od 41 lat, a od 8 lat jest Przewodniczącą Olsztyńskiego Oddziału PTM.



Przewodnicząca Oddziału Terenowego PTM  
w Poznaniu  
Prof. dr hab. Katarzyna Czaczyk  
kasiacz@up.poznan.pl

Absolwentka Wydziału Nauk o Żywności i Żywnieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, który ukończyła w 1987 roku. Jest pracownikiem Katedry Biotechnologii Mikrobiologii Żywności na ww. Uniwersytecie. Jest autorem ponad 100 oryginalnych publikacji naukowych o łącznym współczynniku IF powyżej 80, indeks Hirscha wynosi 11. Wypromowała 4 doktorantów, kierowała 6 projektami badawczymi, brała udział w organizacji 3 konferencji naukowych.

Główne zainteresowania mikrobiologiczne prof. dr hab. Katarzyny Czaczyk to: mikrobiologia żywności,

ze szczególnym uwzględnieniem jakości mikrobiologicznej owoców i warzyw o małym stopniu przetworzenia, tworzenie się biofilmów na powierzchniach abiotycznych, bakterie fermentacji propionowej, nowoczesne techniki w analizie mikrobiologicznej żywności oraz mikrobiologiczna konwersja surowców odpadkowych do produktów użytecznych przemysłowo.

Do Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów należy od ponad 20 lat. W latach 2008–2012 była Przewodniczącą Oddziału Poznańskiego PTM.



Przewodniczący Oddziału Terenowego PTM  
w Puławach

Dr hab. Grzegorz Woźniakowski prof. nadzw.  
PIW-PIB

Grzegorz.Wozniakowski@piwet.pulawy.pl

Absolwent Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie na kierunku biologia, specjalności mikrobiologia. Studia wyższe ukończył w 2006 roku. Od 2007 roku jest zatrudniony w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym – Państwowym Instytucie Badawczym w Puławach. W 2012 roku dr hab. Grzegorz Woźniakowski uzyskał stopień dr nauk weterynaryjnych, natomiast w 2015 dr hab. nauk weterynaryjnych.

Od początku działalności naukowej głównym przedmiotem zainteresowania dr hab. Grzegorza Woźniakowskiego jest wirusologia weterynaryjna oraz doskonalenie i opracowanie nowych metod diagnostyki chorób zakaźnych zwierząt, w tym zoonoz. W chwili obecnej głównym przedmiotem zainteresowania dr hab. Grzegorza Woźniakowskiego są molekularne mechanizmy unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza przez wirus afrykańskiego pomoru świń (ASFV). Jest osobą nadzorującą badania wykonywane w Krajowym Laboratorium Referencyjnym PIWet PIB ds. ASFV.

Do PTM należy od 2009 roku, jest też członkiem Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych (PTNW).



Przewodnicząca Oddziału Terenowego PTM  
w Szczecinie

Dr hab. Jolanta Karakulska  
Jolanta.Karakulska@zut.edu.pl

Absolwentka Wydziału Nauk Przyrodniczych, kierunku Biologia, Uniwersytetu Szczecińskiego, który ukończyła w 1995 roku. W 2000 roku uzyskała stopień naukowy doktora nauk rolniczych w zakresie zootechniki, a w 2013 roku stopień naukowy doktora habilitowanego nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika. Od 2000 roku pracuje na stanowisku adiunkta w Katedrze Immunologii, Mikrobiologii i Chemii Fizjologicznej, na Wydziale Biotechnologii i Hodowli Zwierząt w Zachodniopomorskim Uniwersytecie Technologicznym w Szczecinie (przed reorganizacją – Katedra Immunologii i Mikrobiologii, Akademia Rolnicza w Szczecinie).

Główne zainteresowania naukowo-badawcze dr hab. Jolanty Karakulskiej obejmują diagnostykę i klasyfikację drobnoustrojów oraz analizę czynników chorobotwórczości i lekooporność bakterii, zwłaszcza *Staphylococcus* spp. i *Escherichia coli*. Jest autorem i współautorem ponad 70 publikacji i doniesień naukowych oraz recenzentem artykułów do renomowanych czasopism naukowych. Była promotorem 13 prac magisterskich, 9 prac inżynierskich i 3 prac licencjackich.

Działalność organizacyjna: członek Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów (od 2007), członek Komisji Rektorskiej do spraw pracowniczych (2005–2008), członek Rady Programowej kierunku Biologia (2005–2009), członek Uczelnianej Komisji Wyborczej na kadencję 2008–2012, członek Komisji X Konkursu Biologicznego dla uczniów szkół ponadgimnazjalnych województwa zachodniopomorskiego (2009), Wydziałowy Koordynator ds. Profilaktyki Narkomanii i Innych Uzależnień (od 2014), opiekun Koła Naukowego Mikrobiologów (od 2015), członek Komisji ds. Promocji Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt (od 2016).



Przewodniczący Oddziału Terenowego PTM  
w Warszawie

Dr n. med. Tomasz Jagielski  
t.jagielski@biol.uw.edu.pl

Adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego (UW). Absolwent tego Wydziału (2005 r.). Studia doktoranckie odbył w Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie. Tam też obronił pracę doktorską (2010 r.). Specjalizuje się w zakresie mikrobiologii medycznej.

Jego zainteresowania naukowo-badawcze koncentrują się wokół molekularnych aspektów etiopatogenezy chorób bakteryjnych i grzybiczych. Obecnie prowadzi badania poświęcone ocenie polimorfizmu genetycznego i genetycznym determinantom wirulencji i lekooporności prątków gruźlicy, prątków atypowych oraz chorobotwórczych glonów *Prototheca*. Badania te sterują w kierunku opracowania nowych markerów molekularnych, umożliwiających szybką i wiarygodną identyfikację patogenu, a także ustalenie jego profilu lekowrażliwości, czy stopnia wirulencji. Zastosowanie takich markerów w praktyce klinicznej może mieć kapitalne znaczenie dla wyboru najodpowiedniejszej terapii oraz monitorowania i prognozowania przebiegu choroby.

Autor ponad 60 artykułów naukowych w czasopiśmie listy filadelfijskiej (IF, ok. 135, Indeks Hirscha, 12). Zaangażowany w działalność popularyzatorską – jako autor tekstów i tłumaczeń do czasopism popularnonaukowych, wykładowca Festiwalu Nauki i współorganizator wystaw Pikniku Naukowego Polskiego Radia i Centrum Nauki Kopernik. Laureat krajowych nagród i stypendiów za osiągnięcia naukowe, przyznanych m.in. przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego, JM Rektora UW, Fundację na rzecz Nauki Polskiej.

W Polskim Towarzystwie Mikrobiologów od maja 2008 r. W czerwcu 2016 r. wybrany Przewodniczącym Oddziału Warszawskiego Towarzystwa.



Przewodnicząca Oddziału Terenowego PTM  
we Wrocławiu

Dr hab. Gabriela Bugła-Płoskońska, prof. nadzw. UW  
gabriela.bugla-ploskonska@uwr.edu.pl

Tytuł magistra zdobyła w 1998 r., stopień naukowy doktora nauk biologicznych w 2002 r., a doktora habilitowanego w 2010 r.

W Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Genetyki i Mikrobiologii, którym obecnie kieruje, kontynuuje badania zapoczątkowane przez prof. dr hab. W. Doroszkiewiczą dotyczące bakteriobójczej aktywności surowicy w korelacji do budowy struktur powierzchniowych takich jak lipopolisacharyd i białka błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych. Prace badawcze koncentruje także na wieloaspektowym podejściu do wirulencji pałeczek Gram-ujemnych. Aktywnie współpracuje z wieloma ośrodkami naukowymi w Polsce, a także z ośrodkami zagranicznymi. Dorobek naukowy stanowi ponad 210 pozycji, w tym: 47 prac oryginalnych, 16 prac przeglądowych, rozdziały w podręcznikach, monografiach, prace popularnonaukowe oraz ponad 100 zgłoszeń i publikacji konferencyjnych.

Popularyzuje mikrobiologię, jako przewodnicząca (od 2012 r.) Oddziału Wrocławskiego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów organizując cykliczne spotkania naukowe oraz, wspólnie z prof. dr hab. E. Lonc, Ogólnopolską Konferencję Naukowo-Szkoleniową pt. „Wektory i patogeny – w przeszłości i przyszłości” (lata: 2011, 2012, 2014), której celem jest integracja środowiska mikrobiologiczno-parazytologicznego, ze szczególnym wskazaniem na doktorantów, jako młodych adeptów nauki. Laureatka Naukowych Nagród im. Profesora Mikulaszka przyznanych przez PTM, wyróżniona I nagrodą w Konkursie Komitetu Mikrobiologii PAN im. Prof. K. Bassalika, współautorka pracy nagrodzonej Nagrodą Srebrnej Ezy. W 2015 roku otrzymała Medal Komisji Edukacji Narodowej.

**INFORMACJA O KONFERENCJACH WSPÓLORGANIZOWANYCH  
PRZEZ POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW  
ORAZ Z PATRONATEM PTM W 2017 r.**



**Konferencja Jubileuszowa  
90 lat Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, PTM wczoraj – dziś – jutro  
Kraków, 22–23 września 2017 r.**

**Komunikat I**

**Konferencja Jubileuszowa Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów** organizowana jest przede wszystkim z okazji 90. rocznicy powołania naszego Stowarzyszenia. Jednocześnie w 2017 roku przypada rocznica 160-lecia urodzin Ojca mikrobiologii polskiej profesora Odonu Bujwida oraz 130-lecia wygłoszenia przez niego w Krakowie słynnych pięciu „odczytów o bakteryjach”. W 2017 roku upływa także 90 lat od powołania ogólnoswiatowego stowarzyszenia towarzystw mikrobiologicznych International Society of Microbiology, obecnie International Union of Microbiological Societies (IUMS), którego współzałożycielem było PTM.

Konferencji towarzyszyć będzie Nadzwyczajne Walne Zgromadzenie Delegatów Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, które podejmie uchwały w sprawie wprowadzenia zmian do Statutu PTM.

Tematyka konferencji, poza częścią poświęconą historii polskiej mikrobiologii ze szczególnym uwzględnieniem roli prof. O. Bujwida oraz działalności PTM, będzie również dotyczyła przeglądu osiągnięć naukowych różnych dyscyplin mikrobiologii.

Planuje się zorganizowanie sesji wykładowej, na którą zostaną zaproszeni najwybitniejsi polscy naukowcy z różnych dyscyplin mikrobiologii oraz kilku sesji plakatowych, na których wszyscy mikrobiolodzy, a zwłaszcza Delegaci na Walne Zgromadzenie PTM będą mogli przedstawić wyniki swoich prac.

Planuje się również stworzenie warunków umożliwiających zorganizowanie stoisk wystawowych przez różne firmy działające w obszarze mikrobiologii.

Spotkanie członków Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów będzie okazją do poznania początków polskiej mikrobiologii i serologii, do dyskusji, przeglądu sesji plakatowych, do integracji pokoleń mikrobiologów, do rekreacji w czasie spotkań koleżeńskich w uroczym klimacie dawnej stolicy Polski.

Konferencja organizowana jest przez Polskie Towarzystwo Mikrobiologów Oddział w Krakowie i Uniwersytet Jagielloński.

**Termin nadsyłania streszczenia plakatu: 01.05.2017 r.**

**Termin powiadomienia o akceptacji streszczenia: 21.05.2017 r.**

**OPLATY ZJAZDOWE:**

Osoby do 35 roku życia (w tym studenci) członkowie PTM

W terminie do dnia 15.06.2017 r.: 100 zł;  
w terminie po 15.06.2017 r.: 150 zł

Osoby do 35 roku życia (w tym studenci) nie będący członkami PTM – udział czynny

W terminie do dnia 15.06.2017 r.: 200 zł;  
w terminie po 15.06.2017 r.: 250 zł

Członkowie PTM

W terminie do dnia 15.06.2017 r.: 300 zł;  
w terminie po 15.06.2017 r.: 400 zł

Osoby nie będące członkami PTM

W terminie do dnia 15.06.2017 r.: 400 zł;  
w terminie po 15.06.2017 r.: 500 zł





VI Konferencja Naukowo-Szkoleniowa  
 MIKROBIOLOGIA FARMACEUTYCZNA 2017  
 Gdańsk 31.05–2.06.2017

Komunikat I

Szanowni Państwo,

W imieniu Rady Naukowo-Programowej serdecznie zapraszamy do udziału w **Konferencji – Mikrobiologia Farmaceutyczna 2017**. Tegoroczna Konferencja jest organizowana przez Polskie Towarzystwo Mikrobiologów i firmę Transpharmacia i jest kontynuacją rozpoczętego w 2009 roku cyklu spotkań naukowo szkoleniowych, którego celem jest stworzenie Forum Specjalistów zainteresowanych mikrobiologią farmaceutyczną, służącego wymianie wiedzy, poglądów i doświadczeń w obszarach oceny i zapewnienia jakości, badań mikrobiologicznych oraz bezpieczeństwa mikrobiologicznego produktów leczniczych.

Podczas naszego spotkania przedstawimy szereg zagadnień istotnych dla Mikrobiologów pracujących w wytwórniach farmaceutycznych, laboratoriach mikrobiologicznych współpracujących z przemysłem farmaceutycznym, wydziałach farmaceutycznych uczelni, a także dla Osób Wykwalifikowanych, Specjalistów Zapewnienia i Kontroli Jakości, Auditorów oraz Osób odpowiedzialnych za współpracę z kontraktowymi laboratoriami mikrobiologicznymi.

Do udziału w konferencji zapraszamy również mikrobiologów z wytwórni kosmetycznych.

Tematem wiodącym konferencji będzie Jakość Badań Mikrobiologicznych, ale również jakość mikrobiologiczna produktów leczniczych i wyrobów medycznych obecnych na rynku. Tradycyjnie już przedstawimy aktualne i planowane zmiany w przepisach, wymaganiach farmakopealnych, oraz nowości w temacie Woda i problemy z nią związane.

Szczegółowe informacje i program zostaną zamieszczone w następnym komunikacie.

Organizatorzy konferencji Mikrobiologia Farmaceutyczna 2017 – Transpharmacia:  
 Tel. + 48 601382182; + 48 509710103; e-mail: [transpharmacia@transpharmacia.pl](mailto:transpharmacia@transpharmacia.pl)



**Mikrobiologia w Ochronie Zdrowia i Środowiska – MIKROBIOT 2017**  
 Łódź, 19–21 września 2017 r.

Komunikat I

W imieniu Organizatorów, Instytutu Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii Uniwersytetu Łódzkiego oraz Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów mamy przyjemność serdecznie Państwa zaprosić do wzięcia udziału w **IV edycji konferencji naukowej „Mikrobiologia w Ochronie Zdrowia i Środowiska” – MIKROBIOT 2017**, która odbędzie się w **Łodzi w dniach 19–21 września 2017 r.**

Głównym celem Konferencji jest wymiana informacji naukowej w zakresie mikrobiologii, immunologii i biotechnologii, w tym badań czynników chorobotwórczości drobnoustrojów, reakcji organizmu człowieka na zakażenia, epidemiologii zakażeń, struktury i fizjologii mikroorganizmów środowiskowych, możliwości ich wykorzystania w procesach biotechnologicznych oraz w eliminacji skażeń środowiska, a także dotyczących interakcji drobnoustrojów z innymi organizmami w różnych mikroniszach środowiskowych.

Wzorem poprzednich edycji konferencji MIKROBIOT, które cieszyły się bardzo dużym zainteresowaniem środowisk naukowych z całej Polski i spotkały się z uznaniem gości z zagranicy, również podczas zbliżającej się IV edycji MIKROBIOT 2017 wykłady plenarne wygłoszą wybitni naukowcy, między innymi z Niemiec, Portugalii, Francji czy Włoch. Oficjalnym językiem konferencji będzie język angielski. W ramach konferencji MIKROBIOT 2017 odbędą się cztery sesje tematyczne:

1. Mikrobiologia kliniczna i immunologia
2. Biotechnologia mikrobiologiczna
3. Mikrobiologia ogólna i środowiskowa
4. Genetyka i genomika drobnoustrojów



**KONFERENCJA BIOMILLENIUM 2017**  
**„Trendy i rozwiązania w biotechnologii i mikrobiologii”**  
**Gdańsk, 6–8 września 2017 r.**

**Komunikat I**

Szanowni Państwo,

W imieniu Komitetu Organizacyjnego mamy zaszczyt zaprosić Państwa do udziału w **Konferencji BioMillennium 2017 – „Trendy i rozwiązania w biotechnologii i mikrobiologii”**, która odbędzie się w dniach 6–8 września 2017 na terenie Politechniki Gdańskiej w Gdańsku.

Głównym organizatorem Konferencji jest Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej oraz Gdański Oddział Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Współorganizatorami są również Katedra Mikrobiologii i Katedra Immunologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Szczecińskiego oraz Gdański Oddział Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Chorób Zakaźnych.

Prezentowane zagadnienia będą podzielone na pięć tematycznych sesji: Biotechnologia: w medycynie, w przemyśle, w ochronie środowiska, Mikrobiologia: kliniczna oraz molekularna

Konferencja rozpocznie się wykładem przedstawiającym sylwetkę, zainteresowania i osiągnięcia naukowe zmarłego w tym roku Pana Prof. dr hab. Józefa Kura, założyciela Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej oraz naukowca, który swoimi pracami nie tylko wniósł wiele do mikrobiologii i biotechnologii, ale był ich wielkim popularyzatorem.

Przewidujemy wykłady plenarne, prezentacje ustne, sesję plakatową oraz warsztaty praktyczne prowadzone przez firmy. Mamy nadzieję, że prezentacje wyników Państwa badań naukowych pokażą, że biotechnologia nie jest wciąż dziedziną „nauki przyszłości”, ale już dziś przyniosła rozwiązania stosowane w wielu gałęziach przemysłu i w medycynie oraz że mikrobiologia nie jest „skostniałą dziedziną”, ale obszarem nauki, w którym zarówno tworzy się, jak i wykorzystuje nowoczesne technologie.

Wierzymy, że Konferencja będzie okazją do nawiązania kontaktów umożliwiających efektywną współpracę.

Wszystkim, którzy wezmą udział w Konferencji, życzymy miłego pobytu w Gdańsku. Szczegółowy program i informacje zostaną przesłane w następnym komunikacie.

Organizatorzy Konferencji BioMillennium 2017  
Kontakt: 583472417 – sekretariat  
oraz 583472383; 583476412; 583472406; 583472302

**Konferencja pod patronatem PTM**

**II Konferencja Ogólnopolska naukowo-szkoleniowa**  
**pt: „ Stare i nowe patogeny – aktualne problemy”**  
**Lublin, 17–19 luty 2017 r.**



**[www.patogenykonferencjalublin.pl](http://www.patogenykonferencjalublin.pl)**

Serdecznie zapraszamy do udziału w kolejnej konferencji poświęconej aktualnym problemom związanym z zakażeniami wywołanymi przez patogeny o dużym znaczeniu epidemiologicznym. Są to zarówno te stare, znane drobnoustroje, które może uspiły trochę naszą czujność i mimo szczepień ochronnych mogą stwarzać problemy, jak również mało znane, nabierające coraz większego znaczenia epidemiologicznego oraz zagrożenia związane z występowaniem w Polsce szczepów z nowym mechanizmem oporności na antybiotyki. Zwrócimy również uwagę na problemy zakażeń u dzieci i kobiet w ciąży, co szczególnie zainteresuje pediatrów i położników. Prezentacja aktualnych problemów zakażeń na tle sytuacji epidemiologicznej w kraju i na świecie będzie po raz kolejny podstawą do wspólnej debaty nad stosowaniem właściwej diagnostyki, terapii i profilaktyki zakażeń. Jako wykładowcy zostali zaproszeni wybitni specjaliści polscy, którzy przedstawią aktualne problemy zakażeń, nowe możliwości diagnostyczne i terapeutyczne. Spotkanie, do którego zapraszamy lekarzy i mikrobiologów będzie okazją do dyskusji nad wspólnymi problemami wypracowania zasad diagnostyki i leczenia oraz możliwością przedstawienia własnych doświadczeń i przedyskutowania problemów.

**Wiodące tematy:**

- Nowe możliwości antybiotykoterapii
- Występowanie w Polsce wieloopornych pałeczek Gram-ujemnych
- Aktualna sytuacja epidemiologiczna – możliwe zagrożenia
- Problemy trudnych diagnostycznie zakażeń i ich konsekwencje
- Nowe spojrzenie na sepsę
- Stare patogeny – wciąż groźne, czy zawsze szczepienia mogą je ograniczać?
- Mało znane patogeny – czy nam zagrażają?
- Zakażenia u kobiet w ciąży i małych dzieci
- WZWC – nowe możliwości diagnostyczne i terapeutyczne
- Wspólne problemy diagnostyki zakażeń – spojrzenie lekarza i mikrobiologa

Podczas konferencji zapraszamy również na spotkanie w magicznej atmosferze Starego Miasta, gdzie w ramach konferencyjnej integracji będą mogli Państwo poddać urokowi dawnego Lublina.

Organizatorem Konferencji jest  
Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie.

**Konferencja pod patronatem PTM**

**IV edycja konferencji**  
**„Wektory i patogeny – w przeszłości i przyszłości”**  
**Wrocław, 24 listopada 2017**

Szanowni Państwo,

Instytut Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego oraz Wrocławski Oddział Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów i Wrocławski Oddział Polskiego Towarzystwa Parazytologicznego zapraszają na IV edycję konferencji pt. „*Wektory i patogeny – w przeszłości i przyszłości*”.

Konferencja ma na celu prezentację badań z zakresu mikrobiologii i parazytologii jakie są prowadzone aktualnie w krajowych jak i zagranicznych jednostkach naukowych. Pragniemy również udokumentować historyczny dorobek polskich naukowców w tych dziedzinach. W tym roku szczególną uwagę objęty będzie problem uwarunkowanych środowiskowo chorób infekcyjnych i inwazyjnych, których czynnikami etiologicznym są patogeny transmitowane przez stawonogi (wektory), głównie hematofagiczne kleszcze i komary, a także ukazanie skutecznych sposobów zapobiegania i monitorowania tych zagrożeń.

Podczas konferencji planowana jest prezentacja praktycznych osiągnięć 20-letniej współpracy Instytutu Genetyki i Mikrobiologii UWr z Wydziałem Środowiska i Rolnictwa Urzędu Miasta Wrocławia w zakresie biologicznego (mikrobiologicznego) zwalczania komarów na terenie Aglomeracji Wrocławskiej. Ważnym celem konferencji jest także integracja środowiska naukowego oraz ukazanie osiągnięć naukowych młodych adeptów nauki.

Szczegółowe informacje zamieszczone są na stronie:

**<http://www.mikrobiologia.uni.wroc.pl>**

Organizator:

Uniwersytet Wrocławski Instytut Genetyki i Mikrobiologii

Miejsce:

Uniwersytet Wrocławski Instytut Genetyki i Mikrobiologii  
ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław



### Konferencja pod patronatem PTM

#### 7 Międzynarodowa Konferencja Weiglowska Lwów, 26–29 września 2017 r.

<http://cellbiol.lviv.ua/2017/>

Rudolf Weigl był wybitnym polskim mikrobiologiem austriackiego pochodzenia. Pracował w czasach międzywojennych we Lwowie (dzisiejsza Ukraina) w dziedzinach mikrobiologii lekarskiej, parazytologii, immunologii oraz biotechnologii, opracowując przy tym pierwszą skuteczną szczepionkę przeciwko durowi plamistemu.

Mikrobiolodzy polscy i ukraińscy od 2003 r. organizują naprzemiennie w Polsce i Ukrainie dwustronne (później międzynarodowe) konferencje Weiglowskie w dziedzinie mikrobiologii i dyscyplinach pokrewnych. Poprzednie konferencje Weiglowskie odbywały się we Lwowie (2003), Warszawie (2007), Odessie (2009), Wrocławiu (2011), Czerniowcach (2013) oraz w Gdańsku (2015). Kolejną, **7 Konferencję Weiglowską** zaplanowano zorganizować we Lwowie, mieście, gdzie R. Weigl pracował.

Główne tematy konferencji to mikrobiologia ogólna, mikrobiologia lekarska, mikrobiologia środowiskowa, immunologia oraz biotechnologia. Konferencja odbędzie się w przepięknym Lwowskim Budynku Uczonych. Głównymi uczestnikami konferencji będą mikrobiolodzy ukraińscy i polscy, jednak przewiduje się także udział naukowców z innych krajów (Austria, Francja, Niemcy, Szwecja, Włochy, USA, Japonia). W konferencji weźmie udział około 250 uczestników. Oprócz programu naukowego, przewidziane są: wycieczka po Lwowie, koncert, recepcja oraz na życzenie – bankiet, spektakl w Operze Lwowskiej, a także wycieczka do pobliskich zamków. Konferencja przyczyni się do nawiązania bliższych kontaktów z naukowcami z Ukrainy oraz wzmocnieniu przyjacielskich stosunków między naszymi narodami.

Planuje się, że opłata konferencyjna wyniesie 140 Euro oraz 110 Euro dla młodych naukowców. Koszty obejmą 3 obiady, recepcję, 5 poczęstunków podczas przerw na kawę, wycieczka po mieście oraz materiały konferencyjne. Dodatkowo płatne będą bankiet (około 40 Euro) oraz spektakl w operze Lwowskiej (10 Euro). Po konferencji można będzie odwiedzić zamek Oleski (1 dzień), Poczajow i Krzemieniec (1 dzień) lub Kamieniec Podolski (2 dni), wycieczki te są płatne dodatkowo.

<http://www.cellbiol.lviv.ua/2017>

Ukrainian Society of Cell Biology



7th International Weigl Conference  
September 26-29, 2017  
Lviv, Ukraine

For the attention of specialists in the field of microbiology, biotechnology, immunology. Institute of Cell Biology National Academy of Sciences of Ukraine, All-Ukrainian Public Organization “Ukrainian Society of Cell Biology” inform you about:

7<sup>th</sup> International Weigl Conference that will be held on September 26–29, 2017 in Lviv, Ukraine, in the main building of Ivan Franko Lviv National University.

**List of planned sessions:**

1. Microbial cell biology.
2. Microbial biotechnology.
3. Environmental microbiology.
4. Metabolism and regulation.
5. Medical microbiology.
6. Immunology.
7. Microbe-host cell interaction.
8. Microbial genetics.

Participation of leading foreign and ukrainian scientists is expected in the Conference.  
Working language – English.

Conditions of participation:  
Deadline for Abstract submission – **May 31, 2017.**

Registration form and abstracts should be filled and sent to the conference  
e-mail: **weigl2017@gmail.com**

Early bird registration & payment (till May 31, 2017): 110 € / 90 €.

Materials received after the deadline will not be accepted. Each person may submit up to 3 abstracts.  
Invitation letters to the participants of the conference will be sent by email before 1<sup>st</sup> September 2017.

CONTACT INFORMATION  
OF ORGANIZING COMMITTEE REPRESENTATIVES

Address:

Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, Drahomanov Street, 14/16, Lviv, 79005 Ukraine

Dmytruk K.V., Head of Secretariat  
PhD, Senior Scientist  
Phone: 00 380 32 261 21 63;  
FAX: 00 380 32 261 2108,  
e-mail: dmytruk@cellbiol.lviv.ua // dmytruk77@gmail.com

Barska M.L., Executive Secretary of Ukrainian Society of Cell Biology, PhD  
Phone: 00 380 32 261 2142;  
FAX: 00 380 32 261 2108,  
e-mail: barska@cellbiol.lviv.ua

Polskie Towarzystwo Mikrobiologów  
Zarząd Główny  
ul. Banacha 1 b, 02-097 Warszawa  
NIP 521-11-21-855



Warszawa, 16.01.2017 r.

Szanowni Mikrobiolodzy i wszyscy Państwo  
zainteresowani badaniami mikrobiologicznymi w Polsce

We wrześniu ub. roku ukonstytuowało się nowe Prezydium Zarządu Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów (PTM). Głównym celem naszego Stowarzyszenia jest propagowanie rozwoju nauk mikrobiologicznych i popularyzowanie osiągnięć mikrobiologii wśród członków PTM oraz szerokich kręgów społeczeństwa.

Zarząd PTM stara się zaprosić do współpracy i zjednoczyć w ramach Towarzystwa wszystkie osoby wnoszące istotny wkład w rozwój rozmaitych gałęzi mikrobiologii: klinicznej, weterynaryjnej, środowiskowej, przemysłowej, farmaceutycznej, mikrobiologii żywności, wody, osoby prowadzące badania podstawowe, rozwojowe, przeglądowe, kontrolne, genetyczne i inne.

Wiele jest zagadnień wymagających wnikliwych badań i oceny przez mikrobiologów, np.: problem narastającej lekooporności drobnoustrojów zwłaszcza chorobotwórczych, mikrobiologiczne zanieczyszczenie środowiska, GMO, poprawa systemu jakości i metod kontroli żywności, kosmetyków, leków, wyrobów medycznych i produktów biobójczych. Do realizacji tych planów konieczna jest szeroka współpraca nie tylko mikrobiologów: naukowców, nauczycieli akademickich, lekarzy, specjalistów pracujących w przemyśle, rolnictwie, wykonujących mikrobiologiczne badania kontroli w rozmaitych obszarach, ale także firm diagnostycznych, farmaceutycznych, kosmetycznych, produkujących żywność, środki przeciwdrobnoustrojowe, odczynniki oraz aparaturę kontrolną i badawczą.

**W 2017 r. z okazji 90-lecia działalności Towarzystwa planujemy zorganizować Konferencję, która odbędzie się 22–23 września w Krakowie i jak zakładamy zgromadzi kilkaset osób związanych z mikrobiologią.**

W związku z tak szeroką działalnością, zwracamy się do Państwa z prośbą o wsparcie naszego Towarzystwa poprzez:

- darowizny na cele statutowe
- udział w Konferencji z okazji 90-lecia Towarzystwa. Planujemy w trakcie jej trwania udostępnienie powierzchni na organizację stoisk firm, pragnących reklamować swoje produkty.
- przystąpienia do Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów jako **członek wspierający PTM**. Prezydium PTM podjęło decyzję o minimalnej wysokości składki rocznej członka wspierającego:

Członek Zwyczajny – 3.000 zł; Członek Srebrny – 5.000 zł; Członek Złoty – 10.000 zł

Członkowie wspierający (informacje o nich: nazwa firmy, logo i adres) uzyskują następujące przywileje:

- wszyscy wymienieni są na stronie PTM, na facebooku oraz w każdym numerze 3 czasopism – kwartalników PTM: Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia, Postępy Mikrobiologii i Polish Journal of Microbiology, w danym roku;
- wszyscy wymienieni są w materiałach konferencji organizowanych i współorganizowanych przez PTM. Możliwe jest dołączenie materiałów informacyjnych firm do materiałów konferencyjnych;
- wszyscy otrzymują w danym roku wszystkie numery 3 czasopism (łącznie 12 numerów – zeszytów);
- otrzymują zniżki 15% (Członek Srebrny) 25% (Członek Złoty) na stoisko, jeżeli takie będą na konferencjach organizowanych przez PTM;
- możliwe jest nieodpłatne umieszczanie reklam czarno-białych i kolorowych z 50% zniżką, w kwartalnikach: Postępy Mikrobiologii oraz Polish Journal of Microbiology (oba czasopisma z IF):

Członek Srebrny – 1 reklama całostronicowa lub 2 reklamy po pół strony raz w roku, w jednym numerze jednego z ww. wymienionych czasopism

Członek Złoty – 2 reklamy całostronicowe lub 3 reklamy po pół strony raz w roku, w jednym numerze, obu ww. wymienionych czasopism.

Niniejszy list jest informacją i jednocześnie prośbą o współpracę z Towarzystwem.

W przypadku Państwa zainteresowania, możliwości udziału Państwa firmy w działalności PTM będziemy omawiać bezpośrednio (ptm.zmf@wum.edu.pl)

PREZES  
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów  
*prof. dr hab. Stefan Tyski*

## INFORMACJA O SKŁADKACH CZŁONKOWSKICH PTM W 2017 ROKU

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów uprzejmie informuje, iż wysokość składki członka zwyczajnego PTM w roku 2017 wynosi 100 zł/rok. Wysokość składki dla emerytowanych członków zwyczajnych PTM wynosi 50 zł/rok. W przypadku zmiany danych wcześniej przekazanych do ZG PTM (np. zmiana miejsca pracy, adresu, e-maila, przejście na emeryturę itp.), prosimy o aktualizację i wypełnienie „Formularza aktualizacji danych osobowych” (dostępny na stronie PTM). Z opłacania składki członkowskiej zwolnieni są członkowie honorowi Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów.

### SKŁADKI PROSIMY OPŁACAĆ DO KOŃCA I KWARTAŁU KAŻDEGO ROKU KALENDARZOWEGO.

Statut PTM § 14 ust 3. „Członek zwyczajny jest zobowiązany do regularnego opłacania składki członkowskiej w wysokości ustalonej przez Walne Zgromadzenie Delegatów Towarzystwa”.

Statut PTM § 15 ust 3. „Członkostwo zwyczajne ustaje na skutek skreślenia z listy członków Towarzystwa z powodu niezapłacenia składki członkowskiej przez dwa kolejne lata...”

W związku z porządkiem listy członków zwyczajnych PTM, osoby, które nie zapłaciły składki za lata 2015, 2016 uprzejmie są proszone o uregulowanie tych składek.

Osoby, które nie opłaciły składek za lata 2014, 2013 i wcześniejsze, proszone są o uregulowanie tych składek (można to uczynić w miesięcznych ratach w ciągu I półrocza 2017 r.), a w przypadku nie uregulowania składek do 30.06.2017 r. osoby te zostaną skreślone z listy członków zwyczajnych PTM. W przypadku, gdy dysponujemy aktualnym adresem, osoby te zostaną wcześniej powiadomione listem wysłanym z Oddziału Terenowego PTM, o możliwości skreślenia ich z listy członków PTM w sytuacji nie uregulowania zaległych składek PTM do dnia 30.06.2017 r.

Jednocześnie informujemy, że tylko członkowie z opłaconą składką za dany rok otrzymają nieodpłatnie kwartalnik Postępy Mikrobiologii lub Polish Journal of Microbiology (prosimy o podanie wybranego czasopisma przy opłacaniu składki członkowskiej). W przypadku braku deklaracji przesyłany będzie kwartalnik Postępy Mikrobiologii. Istnieje możliwość rocznej prenumeraty drugiego kwartalnika koszt – 40 zł/rok (dla członków PTM).

Również tylko członkowie z opłaconą składką za dany rok mogą starać się o stypendia FEMS, niższe opłaty wpisowe na konferencje współorganizowane przez PTM oraz występować jako osoby rekomendujące: kandydatów na nowych członków PTM oraz kandydatów na stypendia FEMS.

### NUMER KONTA

Składki członkowskie należy wpłacać na konto:

**Polskie Towarzystwo Mikrobiologów  
ul. Banacha 1 b, 02-097 Warszawa**

Bank: BGŻ BNP Paribas, nr konta:

**57 2030 0045 1110 0000 0261 2550**

**Na przekazie prosimy umieścić informacje:  
imię, nazwisko, oddział PTM, rok za który dokonywana jest opłata składki.**

Otrzymaliśmy kilkanaście wpłat składek, bez określenia, kto i za jaki rok wnosi opłatę.

## INFORMACJA DLA AUTORÓW

*Postępy Mikrobiologii* zamieszczają artykuły przeglądowe ze wszystkich dziedzin mikrobiologii, które nie zostały wcześniej opublikowane w innych czasopismach. Drukujemy również prace przeglądowe metodyczne oraz w dziale Nowości Wydawnicze recenzje nowych książek z zakresu mikrobiologii i nauk pokrewnych, które ukazują się w Polsce. Artykuły i ilustracje drukowane w *Postęпах Mikrobiologii* nie mogą być bez zgody Redakcji publikowane w innych periodykach.

1. Sposób przygotowania manuskryptu. 1.1. Tekst. 1.2. Ilustracje i tabele. 1.3. Piśmiennictwo. 1.4. Cytowanie danych z sieci internetowej. 2. Prawa autorskie. 3. Zalecenia szczegółowe. 3.1. Nazewnictwo drobnoustrojów. 3.2. Nomenklatura genetyczna. 3.3. Skrótów nazw chemicznych. 3.4. Pisownia danych numerycznych. 3.5. Pisownia substancji znakowanych izotopami. 4. Proces recenzowania. 5. Sposób przygotowania i nadesłania manuskryptu. 6. Uwagi dodatkowe

### 1. Sposób przygotowania manuskryptu

#### 1.1. Tekst

Prace należy przysłać do Redakcji w postaci elektronicznego zapisu tekstu w edytorze Microsoft Word dowolnej edycji w wersji PL jako załącznik poczty elektronicznej. Objętość pracy nie powinna przekraczać wraz z piśmiennictwem i ilustracjami 30 stron (wielkość czcionki 12, odstęp pomiędzy wierszami 1,5). Po tytułach wydziałonych nie należy stawiać kropek. Na oddzielnej stronie (strona tytułowa) należy podać tytuł pracy, pod nim w pełnym brzmieniu imiona i nazwiska autorów, adresy autorów i afiliacje, telefony oraz e-mail z zaznaczeniem autora korespondencyjnego, spis treści (tytuły poszczególnych rozdziałów) oraz nie więcej niż 5 słów kluczowych (key words), podanych w porządku alfabetycznym. Tytuł pracy, spis treści i słowa kluczowe należy powtórzyć w języku angielskim. W oddzielnym pliku ze stroną tytułową należy dołączyć krótkie streszczenie pracy w języku angielskim (maksymalnie 250 słów). Praca powinna kończyć się krótkim podsumowaniem, zawierającym najistotniejsze elementy treści. Tekst pracy powinien być zgodny z zaleceniami szczegółowymi Redakcji.

W przypadku prac kierowanych do działu „Publikacje metodyczne i standardy” prace przygotowane według wyżej wymienionych wytycznych oraz szczegółowych wytycznych przedstawionych w drugiej części instrukcji należy przesłać na adres Redaktora Działu. Przesłane do Redakcji prace winny być napisane poprawną polszczyzną. Redakcja rekomenduje P.T. Autorom Słownik Poprawnej Polszczyzny (Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa) jako pomoc w redagowaniu tekstu. Jakkolwiek *Postępy Mikrobiologii* są polskojęzyczne, nie wyklucza się druku prac napisanych w języku angielskim. Ze względu na powszechność języka angielskiego, Redakcja zrezygnowała z oznaczania skrótów (ang.) z tego języka.

#### 1.2. Ilustracje i tabele

Tabele i rysunki powinny być dostarczone jako osobne pliki. Maksymalne rozmiary rysunków i tabel planowanych w artykule w jednej szpalce nie powinny przekraczać szerokości 82 mm, a zaplanowanych w obszarze dwóch szpalt – 169 mm. Dozwolona wysokość grafik wynosi 246,6 mm.

W manuskrypcie nie należy pozostawiać wolnych miejsc na tabele, rysunki, wykresy i zdjęcia, a tylko w tekście zaznaczyć miejsce, w którym powinny być umieszczone, np.

– tab. I

– rys. 1

Liczbę rysunków i tabel należy ograniczyć do minimum. Tabele i rysunki powinny być umieszczone wraz z opisem w osobnym pliku. Tabele oznaczamy kolejnymi numerami rzymskimi, a rysunki (zdjęcia, wykresy, diagramy) cyframi arabskimi. Każda tabela powinna mieć nagłówek opisujący jej treść (tytuł), a ewentualne objaśnienia należy zamieścić poniżej. Objasnienia do umieszczenia pod wykresami, rysunkami, zdjęciami należy przesłać w osobnym pliku. Pliki cyfrowe zawierające ilustracje akceptowane do druku należy przygotować zgodnie z zaleceniami Redakcji. Ilustracje we wstępnej wersji artykułu przeznaczonej dla recenzentów mogą być dostarczone jako dowolne pliki graficzne lub tekstowe, ale w wersji ostatecznej do druku powinny być dostarczone w wymaganej rozdzielczości jako pliki TIFF albo EPS. Grafiki należy przysyłać w ich naturalnym planowanym formacie, aby nie istniała konieczność ich powiększenia lub zmniejszenia w Wydawnictwie. Minimalna rozdzielczość stosowana w ilustracjach powinna wynosić 300 dpi dla zdjęć szarych i kolorowych, 600 dpi dla liter i 1200 dpi dla linii w wykresach. Kolorowe ilustracje muszą pozostawać także w systemie CMYK jako obrazy CMYK TIFF o rozdzielczości 300 dpi. Wydawca pobiera opłatę za wydruk kolorowych ilustracji zgodnie z załączoną na końcu instrukcji informacją o opłatach. Pliki pochodzące z programu Microsoft Office (Power Point, Word) akceptowane są jedynie w wersji ilustracji czarno białej. Wszystkie rysunki (oprócz czarno białych z MS Office) wyeksportowane do formatu bitmapy muszą być zachowane w skali szarości albo w systemie CMYK (Cyan, Magenta, Yellow, black). Nie należy stosować zapisu w systemie RGB (Red, Green, Blue). Obrazy stonowane (zróżnicowanie gęstości lub cienie) muszą być sporządzone w skali szarości (nie używać bitmapy). Redakcja nie akceptuje kolorowych ilustracji wykonanych w Microsoft Office, ponieważ są one zapisane w systemie RGB.

Wszystkie ostateczne napisy, oznaczenia czy też klucze oznaczeń muszą być wprowadzone do rysunków. Każdy rysunek musi być dołączony jako osobny plik, a rysunki wielopanelowe muszą być podane w jednym pliku. Aby uniknąć problemu z różnymi fontami Redakcja zaleca stosowanie następujących czcionek: Times New Roman, Times New Roman PL, Arial, Arial PL oraz Symbol. W celu szczegółowej informacji proszę wysłać zapytanie przez e-mail na adres Redakcji.

#### 1.3. Piśmiennictwo

Cytowane piśmiennictwo należy wpisać oddzielnie jako ostatnie strony manuskryptu, wymieniając pozycje w kolejności alfabetycznej. W wykazie powinny być podane kolejno: liczba porządkowa, nazwisko autora, pierwsze litery imion, nazwiska współautorów pracy i pierwsze litery ich imion (w kolejności podanej w cytowanej pracy), pełny tytuł cytowanej pracy, skrócony tytuł czasopisma, tom, numery stron i rok wydania (w nawiasie). Lista stosowanych nazw i skrótów czasopism znajduje się w bazie Journal Title Abbreviations Web of Science. Jeżeli jest przyjęte podawać pełną nazwę periodyku, stawiamy za nazwą przecinek [1], natomiast za każdym skróconym członem nazwy kropkę [2], np.:



1. Adams G.M., Blumenthal R.M.: Gene *pvuIIW*: a possible modulator of PvuII endonuclease subunit association. *Gene*, **157**, 193–199 (1999)
2. Beld J., Woycechowsky K.J., Hilvert D.: Diselenides as universal oxidative folding catalysts of diverse proteins. *J. Biotechnol.* **150**, 481–489 (2010)

W przypadku, gdy liczba współautorów pracy przekracza 10 (przytoczona poniżej praca jest dziełem 42 autorów), należy podać nazwiska i inicjały pierwszego oraz ostatniego współautora, a następnie dodać uwagę i wsp., np.:

1. Tomb J.F., Venter J.C. i wsp.: The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, **338**, 539–543 (1997)

Cytacje prac z czasopism ukazujących się tylko w sieci internetowej powinny zawierać następujące dane: liczba porządkowa, nazwisko autora, pierwsze litery imion, nazwiska współautorów pracy i pierwsze litery ich imion (w kolejności podanej w cytowanej pracy), pełny tytuł cytowanej pracy, skrócony tytuł czasopisma, tom, strona (lub jej odpowiednik [1]), i rok wydania (w nawiasie). W przypadku, gdy wydawnictwo nie stosuje numeracji stron [2], należy podać numer DOI, np.:

1. Esberg A., Muller L.A., McCusker J.H.: Genomic structure of and genome-wide recombination in the *Saccharomyces cerevisiae* S288C progenitor isolate EM93. *PLoS One*, **6**, e25211 (2011)
2. Stachowiak R., Łyżniak M., Budziszewska B.K., Roeske K., Bielecki J., Hoser G., Kawiak J.: Cytotoxicity of bacterial metabolic products, including Listeriolysin O, on leukocyte targets. *J. Biomed. Biotechnol.* DOI:10.1155/2012/954375 (2012)

Dla cytowanych wydawnictw nieperiodycznych należy podać kolejno: nazwisko i pierwsze litery imion autora oraz współautorów, tytuł dzieła, wydawnictwo, miejsce i rok wydania. W przypadku odwoływania się do artykułu w pracy zbiorowej, np. rozdziału w książce [2], należy dodatkowo podać tytuł tej pracy oraz nazwisko jej redaktora, wydawnictwo, miejsce wydania, rok, tom oraz na końcu numery stron, np.:

1. Boulton R.B., Singleton V.L., Bisson L.F., Kunkee R.E.: Principles and practices of winemaking. Chapman Hall, New York, 1996
2. Portnoy D.A., Sun A.N., Bielecki J.E.: Escape from the phagosome and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* (w) *Microbial Adhesion and Invasion*, red. M. Hook, L. Świątalski, Springer, New York, 1992, s. 85–94

Powolywanie się w tekście na pozycje cytowanego piśmiennictwa następuje przez wymienienie liczby porządkowej w nawiasach, np. [10], [10–12], [10, 25]. Ze względu na możliwość zmian w piśmiennictwie podczas procesu recenzowania artykułów Redakcja dopuszcza stosowanie tymczasowych odnośników. Wewnątrz nawiasów kwadratowych można wziąć w okrągły nawias odnośnik w dowolnym formacie, np. [(Adams i wsp.)]. Po uzyskaniu akceptacji artykułu należy zamienić formatowanie odnośników na docelowe. Redakcja zaleca stosowanie programów do zarządzania piśmiennictwem. Liczba cytowań w piśmiennictwie nie może przekraczać 100 pozycji.

#### 1.4. Cytowanie danych z sieci internetowej

Preferowane jest cytowanie informacji pochodzących z prac oryginalnych wydawanych przez uznane w środowisku naukowym oraz recenzowane czasopisma. Warunkiem koniecznym przy użyciu informacji ze strony internetowej jest sprawdzenie i aktualizacja zapisu informacyjnego na stronie WEB w dniu wysłania pliku. W przypadku niewłaściwego adresu i niemożliwości odtworzenia informacji z sieci komputerowej, prace będą zwracane autorom. Cytowanie informacji publikowanej na stronach sieci internetowej

powinno wyglądać następująco: autorzy (jeśli są znani [1]) lub nazwa organizacji [2] (wydawca strony), tytuł artykułu, nazwa strony (jeśli nie została już wcześniej podana), data publikacji (jeśli została podana [3]), adres www, data ostatniego sprawdzenia adresu, np.:

1. Harmon K.: Ancient „Fossil” virus shows infection to be millions of years old. *Scientific American*, <http://www.scientificamerican.com/article/fossil-virus-bird-genome> (31.12.2015)
2. World Health Organization: Poliomyelitis, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs114/en> (06.03.2014)
3. World Health Organization: What we know about transmission of the Ebola virus among humans. Ebola situation assessment, 06.10.2014, <http://www.who.int/mediacentre/news/ebola/06-october-2014> (31.12.2015)

## 2. Prawo autorskie

W polskim prawodawstwie autorskie prawo osobiste interesujące szczególnie autorów *Postępów Mikrobiologii* oraz autorskie prawo majątkowe reguluje Ustawa z dn. 4. lutego 1994 r. (Dz.U. Nr 90, poz. 631 ze zm.).

Autorskie prawo osobiste, zwane dalej w **Informacji dla Autorów** prawem autorskim dotyczy niemajątkowych interesów twórcy związanych z danym utworem oraz określa zasady ochrony więzi twórcy z utworem. Do praw tych między innymi należy:

- prawo do autorstwa utworu wyrażające m.in. zakaz „przywłaszczenia” utworu przez inne niż twórca osoby (zakaz dokonywania plagiatów).
- prawo do oznaczenia utworu swoim nazwiskiem albo udostępnienia utworu anonimowo.
- prawo do nienaruszalności treści i formy utworu oraz jego rzetelnego wykorzystania.

Konieczność ochrony autorskich praw osobistych innych autorów przez Redakcję *Postępów Mikrobiologii* obliuguje nas do przyjęcia następującej procedury:

(a) Reprodukacja utworów wytworzonych przez innych Autorów w pracy własnej, przesłane do opublikowania w *Postęпах Mikrobiologii* tj. cudzych rysunków lub tabel – pochodzących z oryginalnej, pierwotnej pracy innego Autora – bądź cytowanie fragmentów cudzego tekstu, wymaga od Autorów wcześniejszego uzyskania przez nich pisemnej zgody od Wydawnictwa lub Autorów pierwotnej pracy (z której materiały te pochodzą) na ich reprodukcję. Zgodę tę w formie oryginalnego zaświadczenia należy przysłać wraz z materiałami reprodukowanymi do Redakcji *Postępów Mikrobiologii*.

- Pod cytowanym rysunkiem należy w opisie podać nazwisko pierwotnego Autora, pełną bibliografię pracy, z której pochodzi rysunek oraz informację o zgodzie Wydawnictwa lub Autora na jego reprodukcję.
- Cytowany tekst powinien być wyraźnie oznaczony w odpowiednim miejscu manuskryptu, zaś u dołu strony powinna być zamieszczona informacja dotycząca pochodzenia cytatu oraz uzyskanej zgody na przedruk.

(b) Dozwolone jest wprowadzanie zmian w cytowanych rysunkach innych Autorów/twórców pod warunkiem każdorazowego uzyskania ich zgody (lub osób upoważnionych przez nich) na dokonanie takich zmian. Zmiany w oryginalnych rysunkach mogą wynikać z chęci Autorów do dokonania nowego opracowania lub nowego przedstawienia omawianego przez siebie zagadnienia. W tych przypadkach wskazane jest, aby zgoda twórcy wskazywała na zakres dokonywanych zmian, gdyż pozwoli to uniknąć wątpliwości odnośnie zakresu wyrażonej tak zgody. Wreszcie konieczność uzyskania zgody pierwotnego Autora/twórcy na dokonanie

zmian w reprodukowanym rysunku wynika z możliwości ingerencji Autorów w autorskie prawo osobiste w postaci nienaruszalności formy i treści utworu oraz jego rzetelnego wykorzystania.

(c) Warunkiem przyjęcia przez Redakcję manuskryptu pracy oraz poddania jej dalszej procedurze wydawniczej jest złożenie wraz z manuskrytem oświadczenia dotyczącego praw autorskich.

### 3. Zalecenia szczegółowe\*

#### 3.1. Nazewnictwo drobnoustrojów

Należy stosować dwuczłonowe nazwy zawierające nazwę rodzajową oraz gatunkową (np. *Escherichia coli*). Nazwy rodzajowe mogą być użyte bez nazwy gatunkowej, natomiast nie można użyć samych tylko nazw gatunkowych. Gdy w pracy podaje się pierwszy raz nazwę gatunku, musi ona składać się z pełnych wyrazów, przy ponownym jej użyciu, podaje się tylko pierwszą literę nazwy rodzajowej (zawsze dużą) oraz nazwę gatunkową w pełnym brzmieniu np. *E. coli*. Nazwy gatunku, rodziny, rzędu, klasy, działu oraz królestwa należy pisać kursywą. Informacje szczegółowe dotyczące pisowni oraz prawidłowego nazewnictwa (zgodnego z wymogami współczesnej systematyki) – przyjęte przez Redakcję *Postępów Mikrobiologii*, za instrukcją ASM – można znaleźć w **Instructions to Authors**, *J. Bacteriol.* Ponadto, Redakcja zwraca uwagę, by nie rozpoczynać zdań od nazw łacińskich.

Zgodnie z propozycjami WHO – Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* ("Antigenic Formulas of the *Salmonella* Serovars" (M. Y. Popoff i L. Le Minor, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France, 1997) and "Identification and Serotyping of *Salmonella* and an Update of the Kaufmann-White Scheme" (A.C. McWhorter-Murlin and F. W. Hickman-Brenner, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.) do rodzaju *Salmonella* należą tylko dwa gatunki, tj. *S. enterica* i *S. bongori*, z których pierwszy podzielony został na 6 podgatunków. Stosowane dotychczas zwyczajowe nazwy, nie mające statusu taksonomicznego, takie jak **serotyp**, **typ serologiczny**, zostały zastąpione nazwą **serowaru** (w oryginale **serovar**, sv.). Nazwę serowaru należy pisać dużą literą oraz prostym pismem (np. Typhi, Paratyphi B, Typhimurium, itp.). Zgodnie z powyższym, nazwę pierwszego podgatunku rodzaju *Salmonella* można zapisać: *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium lub *Salmonella* subsp. I. ser. Typhimurium, bądź, po prostu, *Salmonella* Typhimurium.

#### 3.2. Nomenklatura genetyczna

Właściwości genetyczne szczepu opisywane są w terminach fenotypu oraz genotypu. Fenotyp opisuje obserwowane właściwości organizmu. Genotyp określa genetyczną strukturę organizmu, zwykle odnosi się do szczepu dzikiego. Wyżej wymienione określenia są bliżej objaśnione w pracy Demerec i wsp.: *Genetics*, 54, 61–76 (1966).

(a) Fenotypowe określenie właściwości organizmu stosuje się, gdy zmutowane loci nie zostały zidentyfikowane oraz zmapowane. Może być także użyte w przypadku, gdy identyfikuje się produkt genu, np. białko OmpA. Zapis fenotypu zasadniczo składa się z trzech liter, nie można ich pisać kursywą, pierwsza litera powinna być zawsze dużą literą. Preferuje się użycie liczb rzymskich lub arabskich dla oznaczania bliźniaczych fenotypów, np. Pol1, Pol2, Pol3, itd. Typ dziki można zapisać dodatkowym oznaczeniem *plus* (Pol<sup>+</sup>); w odróżnieniu do tego oznaczenie *minus* określać będzie

fenotyp mutanta (Pol<sup>-</sup>). Charakterystyczne właściwości organizmu można zapisać używając liter, np. Str<sup>s</sup>. Fenotypy oporności determinowane plazmidowo określa się kodem dwuliterowym, np. Ap<sup>r</sup>, a chromosomowo – kodem trzyliterowym, np. Amp<sup>r</sup>.

(b) Genotypowe oznaczenia są podobne do fenotypowych – w obu przypadkach stosuje się zestaw trzech liter; genotyp pisze się zawsze małymi literami oraz kursywą, np. *ara*, *his*, *rps*. Promotor, terminator oraz operator oznacza się literami *p*, *t* oraz *o*, np. *lacZp*, *lacZt*, *lacZo*; Bachman B.J., Low K.B.; *Microbiol. Rev.* 44, 1–56 (1980).

(c) Typ dziki alleli można zaznaczyć wpisując dodatkowe oznaczenie plus nad oznaczeniem genu, np. *ara*<sup>+</sup>, *his*<sup>+</sup>, nie oznacza się natomiast zmutowanych alleli znakiem minus.

(d) Miejsca mutacji oznacza się poprzez wstawianie liczby kolejnych izolacji (liczby alleli) po symbolu zmutowanego locus (np. *araA1*, *araA2* itp.). W przypadku, gdy tylko jedno takie locus istnieje, lub gdy nie wiadomo, w którym kolejnym locus mutacja powstała – po oznaczeniu genu wstawia się myślnik w miejscu dużej litery oznaczającej locus, zaś dalej podaje się liczbę izolacji (np. *ara-23*).

(e) Zapis genotypu może być wzbogacony innymi oznaczeniami, jak *plus* dla typu dzikiego – można wprowadzić oznaczenia określające mutacje, np. mutacja Amber (Am), mutant termowrażliwy (Ts), mutant konstytutywny (Con), mutant wrażliwy na niskie temperatury (Cs), białko hybrydowe (Hyb) np. *araA230*(Am), *hisD21*(Ts). Wprowadzanie innych wzbogaceń powinno być poprzedzone w tekście odpowiednim wyjaśnieniem.

(f) Dodatkowe oznaczenia mogą też być użyte w przypadku konieczności rozróżnienia tego samego genu znajdującego się w różnych organizmach lub szczepach tego samego gatunku, np. *his*<sub>*E.coli*</sub> lub *his*<sub>*K-12*</sub>. Dodatkowe oznaczenia stosuje się również dla rozróżnienia pomiędzy genetycznymi elementami o tej samej nazwie np. promotory operonu *gln*, *glnA*<sub>1</sub> i *glnA*<sub>2</sub>.

(g) Delecję oznacza się symbolem, Δ usytuowanym przed nazwą usuniętego genu lub regionu, np. Δ *trpA432*, Δ (*aroP-aceE*)419, lub Δ *his*(*dhuA hisJ hisQ*)1256. Fuzję genów *ara* i *lac* można przedstawić w ten sam sposób – *F* (*ara-lac*)1256. Podobnie *F* (*araB-lacZ*<sup>+</sup>)(Hyb) oznacza, że fuzja nastąpiła pomiędzy genami *araB* a *lacZ*. Inwersja jest oznaczana następująco IN (*rrnD-rrnE*)1. Insercję genu *his* *E. coli* do plazmidu pSC101 w pozycji 0 zasad (0kb) zapisuje się następująco pSC101 W (0kb::K-12*hisB*)4. Oznaczenie obecności episomu polega na podaniu jego symboli w nawiasie po nazwie szczepu rodzicielskiego, np. W3110/I<sup>r</sup> 8(*gal*<sup>+</sup>).

#### 3.3. Skróty nazw chemicznych

Nie wymagają dodatkowych wyjaśnień skróty:

- nazw miar i wag regulowanych przez Systeme International de Unites (SI), ogólnie akcetowane jednostki takie jak: bp, kb, Da, masa cząst., m. cząst.,
- nazw chemicznych takich jak: DNA, cDNA, RNA, cRNA, RNaza, DNaza, rRNA, mRNA, tRNA; AMP, ADP, ATP, dATP, ddATP, GTP itp.,
- ATPaza, dGTPaza itp. NAD<sup>+</sup>, NADH, NADPH, NADP<sup>+</sup>, poly(A), poly(dT), itp.,
- nazw powszechnie stosowanych technik biologii molekularnej, np. PCR, SDS-PAGE, nazw ogólnie znanych linii komórkowych, np. HeLa, J774,
- nazw jednostek biologicznych, np.: PFU (jednostka formowania lizyniek), JTK (jednostka tworząca kolonię), MIC (minimalne stężenia hamujące wzrost), itp.,

Zasady kształtowania nomenklatury endonukleaz restrykcyjnych oraz metylotransferaz zostały opublikowane w *Nucleic Acids Res.* 31, 1805–1812 (2003). Przy pisaniu prac prosimy o korzystanie z zawartych tam informacji.

\* fragmenty instrukcji dla autorów czasopism wydawanych przez American Society for Microbiology – wykorzystywanie w *P. M.* za zgodą Journals Departments ASM

### 3.4. Pisownia danych numerycznych

Standardowe jednostki metryczne są stosowane dla określenia długości, wagi i objętości. W przypadku przedstawiania tych wartości oraz molarności należy stosować przedrostki m,  $\mu$ , n oraz p dla wartości  $10^{-3}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-9}$  oraz  $10^{-12}$ . Temperaturę należy przedstawiać tylko w stopniach Celsjusza, np. 37°C, a zawartość substancji w danej jednostce (stężenie) w formie g/ml.

### 3.5. Pisownia substancji znakowanych izotopami

Jeśli wyznakowana jest pojedyncza cząsteczka w związku chemicznym, nazwę tego związku należy zapisać w następujący sposób:  $^{14}\text{CO}_2$ ,  $^3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2^{35}\text{SO}_4$ . Taki sam sposób zapisu stosuje się, gdy radioaktywna cząsteczka nie występuje w naturalnej formie wyznakowanego związku, np.  $^{32}\text{S}$ -ATP lub gdy symbol izotopu związany jest z niespecyficzną nazwą związku, np.  $^{14}\text{C}$  aminokwasy,  $^3\text{H}$ -liganty, itp. W przypadku niektórych specyficznych związków chemicznych można stosować nawiasy kwadratowe obejmujące symbole radioaktywnej cząsteczki przed nazwą chemiczną związku, np. [ $^{14}\text{C}$ ] mocznik, L-[*metyl*- $^{14}\text{C}$ ] metionina, [ $^{32}\text{P}$ ] ATP.

## 4. Proces recenzowania

Prace przysyłane do Redakcji w celu ich opublikowania w *Postęпах Mikrobiologii* podlegają podwójnej ocenie, tj. ich wartości merytorycznej (recenzje) oraz poprawności pod względem redakcyjnym (układ pracy, język, załączniki ilustrujące tekst, oświadczenia autorów).

- Każda praca przesłana do Redakcji jest oceniana przez Zespół Redakcyjny i jednego ze stałych Recenzentów z Rady Redakcyjnej *Postępów Mikrobiologii* (skład Rady Redakcyjnej jest publikowany w każdym zeszycie *Postępów Mikrobiologii* oraz na stronie internetowej <http://www.pm.microbiology.pl>). W przypadku braku w Radzie Redakcyjnej Recenzenta o odpowiedniej specjalności lub jego braku z innych ważnych przyczyn, Redaktor Naczelny powołuje Recenzenta spoza Rady Redakcyjnej (lista Recenzentów jest publikowana w ostatnim zeszycie każdego tomu).
- Recenzje są anonimowe oraz dokonywane na specjalnie do tego celu przygotowanych arkuszach.
- Recenzenci za wykonaną pracę nie otrzymują honorarium.
- Nazwiska Recenzentów spoza Rady Redakcyjnej są wraz z podziękowaniami publikowane ostatnim zeszycie *Postępów Mikrobiologii* odpowiedniego roku.
- W przypadku negatywnej oceny pracy przez Recenzenta oraz jego sugestii skierowanej do Redaktora Naczelnego odrzucenia recenzowanej pracy, bądź jej znacznego przerezegowania, Autor ma prawo odwołania się od tej opinii do Redaktora Naczelnego. W opisywanym przypadku decyzją Redaktora powoływany jest dodatkowy Recenzent spoza Rady Redakcyjnej *Postępów Mikrobiologii*.

## 5. Sposób przygotowania i nadesłania manuskryptu

Pracę wraz z kompletem oświadczeń należy przysyłać na adres poczty elektronicznej Redakcji:

e-mail: [post.mikrobiol@biol.uw.edu.pl](mailto:post.mikrobiol@biol.uw.edu.pl)

W przypadku prac kierowanych do działu „Publikacje metodyczne i standardy” prace przeglądowe przygotowane zgodnie z ogólną instrukcją dla Autorów oraz zasadami wymienionymi w informacjach dotyczących prac kierowanych do działu „Publikacje metodyczne i standardy” należy przesłać w wersji elektronicznej na adres Redaktora Działu:

Prof. dr hab. Stefania Giedrys-Kalemba

e-mail: [kalemba@mp.pl](mailto:kalemba@mp.pl) lub [kalemba@pum.edu.pl](mailto:kalemba@pum.edu.pl)

Przed wysłaniem pracy do Redakcji prosimy o sprawdzenie kompletności wysyłanych plików zgodnie z poniższą listą:

1. Strona tytułowa ze streszczeniem
2. Manuskrypt (zawierający tytuł oraz właściwy tekst pracy)
3. Rysunki
4. Opis do rysunków
5. Tabele

Wymagane dokumenty:

1. Deklaracja oryginalności pracy
2. Oświadczenie dotyczące praw autorskich
3. Oświadczenie dotyczące konfliktu interesów
4. Zobowiązanie do zapłaty w przypadku przyjęcia pracy do druku

(wzory oświadczeń znajdują się w niniejszej instrukcji, można też je pobrać ze strony *Postępów Mikrobiologii*)

## 6. Uwagi dodatkowe

Redakcja zastrzega sobie możliwość dokonywania skrótów i poprawek nie wpływających na treść pracy. W przypadku konieczności wprowadzenia zmian w treści odsyła się Autorowi manuskrypt pracy w celu dokonania poprawek. Adresy instytucji, w których pracują autorzy (adres pocztowy oraz e-mail) należy podawać w pracy na dole strony tytułowej. Prace nie odpowiadające wymaganiom Redakcji będą odsyłane autorom bez rozpatrzenia merytorycznego. Za datę wpływu przyjmuje się dzień otrzymania pracy w formie zgodnej z instrukcją dla autorów. Jako datę przyjęcia do druku przyjmuje się dzień, w którym Redakcja powiadamia Autorów, że praca została zakwalifikowana do druku. Za prace opublikowane w *Postęпах Mikrobiologii* nie przewiduje się honorariów autorskich. Zgodnie z decyzją Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów pobierane są opłaty za prace przyjmowane do druku w *Postęпах Mikrobiologii*. Przesłanie kompletu podpisanych oświadczeń, w tym zobowiązania do zapłaty za artykuł zakwalifikowany do wydania, jest warunkiem uruchomienia procedury wydawniczej.

### INFORMACJA DLA AUTORÓW o opłatach za prace publikowane w *Postęпах Mikrobiologii*

Uprzejmie informujemy PT Autorów, że zgodnie z decyzją Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów z dnia 6 lutego 2007 roku oraz z dnia 2 marca 2011 r. wprowadzono zasady płatności za prace przyjmowane do druku w naszym czasopiśmie w wysokości 250 zł + VAT 23% – razem 307,50 zł za każdy artykuł.

Informujemy również, że Zarząd Główny PTM dnia 23 listopada 2016 r. uchwałą nr 24 podjął decyzję o różnicowaniu opłat za druk publikacji od dnia 1 stycznia 2018 r. Jeżeli Autor nie będzie członkiem PTM, lub jako członek PTM nie będzie miał opłaconych składek w roku bieżącym lub w ubiegłych latach – obowiązywać będzie opłata w wysokości 350 zł + VAT 23% (430,50 zł). Dla Autorów będącymi aktywnymi członkami PTM (uregulowane opłaty składek członkowskich w roku bieżącym i ubiegłych latach) obowiązywać będzie aktualna opłata w wysokości 250 zł + VAT 23% (307,50 zł).

Autorzy manuskryptów proszeni są o wnoszenie opłat na **konto Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów:**

**BGŻ SA 57 2030 0045 1110 0000 0261 2550**

Opłatę można wносить indywidualnie. W imieniu Autorów opłatę może wносить sponsorująca instytucja, fundacja, itp. W takim przypadku należy przesłać do Redakcji informacje potrzebne do wystawienia faktury. Opłatę należy wnieść po otrzymaniu faktury. W przypadku, gdy faktura nie jest potrzebna do dokonania wpłaty (opłata indywidualna) przelew należy dokonać po uzyskaniu od Redakcji informacji, że praca została przyjęta do druku. Dodatkowo, Wydawca pobiera opłaty za wydruk kolorowych ilustracji w wysokości 300 zł + VAT 23% (369 zł) za stronę.

**Otrzymanie przez Redakcję pracy wraz z zobowiązaniem zapłaty jest warunkiem uruchomienia procedury wydawniczej. Do zobowiązania zapłaty należy dołączać informacje zawierające tytuł pracy i nazwisko Autora korespondencyjnego.**

### INFORMACJE DOTYCZĄCE PRAC DRUKOWANYCH W DZIALE PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

W dziale zatytułowanym **PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY** publikowane są artykuły przeglądowe o charakterze metodycznym, reprezentujące dowolną dziedzinę mikrobiologii. Redakcja *Postępów Mikrobiologii*, w porozumieniu z Zarządem Głównym PTM ustaliła, iż drukowanych będzie rocznie nie więcej niż cztery artykuły tej kategorii.

Redaktorem odpowiedzialnym za wartość merytoryczną, redakcję tekstu oraz ostateczne przyjęcie pracy do druku jest prof. dr hab. Stefania Giedrys-Kalemba (**adres: ul. Malinowa 11, 72-003 Wołczkowo, tel. 605031324, fax: (91) 3113186, e-mail: kalemba@mp.pl lub kalemba@pum.edu.pl**)

Prace metodyczne przeznaczone do druku podlegają ocenie dokonywanej przez stałych Recenzentów lub Ekspertów powoływanych każdorazowo przez Redaktora Działu.

Lista stałych Recenzentów, patrz Zalecenia dla Autorów, pkt. 5.

Strona tytułowa każdego artykułu zaopatrzona będzie w informacje, iż praca należy do **PUBLIKACJI METODYCZNYCH I STANDARDÓW** oraz każdorazowo podana będzie data otrzymania od Autorów manuskryptu jak i data zaakceptowania go do druku.

#### Zalecenia dla Autorów:

##### 1. Przesyłanie publikacji:

- Manuskrypt (w dwu egzemplarzach w formie papierowej oraz jednym egzemplarzu na nośniku elektronicznym wraz z rysunkami, tabelami, itp.) proszę przysłać bezpośrednio do Redaktora **PUBLIKACJI METODYCZNYCH I STANDARDÓW**.
- Podając adres/y Autorów publikacji należy zaznaczyć Autora korespondencyjnego – prócz adresu pocztowego, numeru telefonu i ewentualnie faxu. Należy obowiązkowo podać adres e-mail Autora korespondencyjnego.

##### 2. Sposób przygotowania manuskryptu – pracę należy opracować zgodnie z ogólnymi zaleceniami zawartymi w INFORMACJI DLA AUTORÓW aktualnie wydanego Tomu *Postępów Mikrobiologii* (Zeszyt 1) z uwzględnieniem następujących zmian:

- Objętość pracy wraz z piśmiennictwem i ilustracjami nie może przekraczać 20 stron .
- Liczba cytowań w rozdziale **Piśmiennictwo** nie powinna przekraczać 50 pozycji.
- W wykazie cytowanego piśmiennictwa należy umieszczać wyłącznie prace drukowane w czasopiśmie naukowych. Niedopuszczalne jest zamieszczanie danych bibliograficznych prospektów reklamowych lub promocyjnych firm farmaceutycznych.

##### 3. Prawa autorskie – do każdej przygotowanej do druku publikacji załączyć **oświadczenie dotyczące praw autorskich**. Wzór oświadczenia można pobrać ze strony internetowej *Postępów Mikrobiologii*.

##### 4. Zalecenia i uwagi dodatkowe:

W celu uniknięcia kryptoreklamy, proszę o zwrócenie szczególnej uwagi na sposób przedstawienia czytelnikom produktów komercyjnych lub metod opracowanych przez producentów. Autorzy są również zobowiązani do ujawnienia (jeżeli takie istnieją) wszelkich powiązań (honoraria, granty, płatne ekspertyzy lub inne formy uzyskiwania korzyści osobistych) między Autorami a firmą, której produkt ma istotne znaczenie w nadesłanej pracy. W tym celu każdy z Autorów proszony jest o złożenie oświadczenia o oryginalności pracy, oświadczenia dotyczącego praw autorskich oraz oświadczenia dotyczącego „konfliktu interesów”. Konflikt interesów występuje, kiedy Autor lub zakład pracy Autora ma finansowe lub osobiste związki z innymi osobami lub instytucjami, które mogą wpływać na jego działania i decyzje. Wzór deklaracji można pobrać ze strony internetowej *Postępów Mikrobiologii*.

- Redakcja zastrzega sobie prawo ostatecznej decyzji o akceptacji pracy przeznaczonej do druku w dziale **PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY**.
- Wszelkie proponowane zmiany w **INFORMACJI DLA AUTORÓW** zostaną przedstawione PT Czytelnikom *Postępów Mikrobiologii* przed ich wprowadzeniem.

##### 5. Stali recenzenci działu **PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY:**

Jerzy Długoński (Uniwersytet Łódzki)

Waleria Hryniewicz (Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego)

Anna Przondo-Mordarska (Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu)

### Oświadczenie o oryginalności pracy

.....  
 Nazwisko i imię Autora (korespondencyjnego)  
 .....

.....  
 Tytuł pracy  
 .....

.....  
 Data złożenia pracy w Redakcji *Postępów Mikrobiologii*  
 .....

Oświadczam, że złożona przeze mnie praca, zatytułowana jak wyżej, jest moim oryginalnym utworem i stanowi przedmiot prawa autorskiego w myśl Ustawy o prawie autorskim i prawach pokrewnych z dn. 4 lutego 1994 r.

Oświadczam również, że praca ta ani w całości, ani we fragmentach nie została opublikowana wcześniej w żadnym innym czasopiśmie lub wydawnictwie naukowym. Dodatkowo stwierdzam, iż w/w pracy nie wysłano równoległe do opublikowania w innym czasopiśmie naukowym lub wydawnictwie.

.....  
 (miejsce, data)

.....  
 (podpis Autora korespondencyjnego)

### Oświadczenie dotyczące praw Autorskich

1. ....  
 .....  
 (nazwisko/a i imię/ona Autora/ów – proszę podkreślić Autora korespondencyjnego)

Adres Autorów: .....

Tytuł pracy: .....

2. **Oświadczenie** (proszę wypełnić a lub b)

(a) Oświadczam, iż w mojej/naszej pracy przeznaczone do opublikowania rysunki oraz tabele, są dziełem mojej/naszej oryginalnej twórczości (tzn. zostały wymyślone i zaprojektowane przez Autorów przedkładanego Redakcji manuskryptu), nie są obciążone jakimikolwiek prawami osób trzecich, ani nie naruszają jakichkolwiek przepisów prawa i interesów dóbr osób trzecich. W pracy nie ma cytatów z obcej publikacji/ ewentualnie w pracy zamieszczono cytaty w ramach dozwolonego prawnie prawa cytatu, przy czym wszystkie zamieszczone cytaty zostały należycie oznaczone wraz z wymienieniem twórcy i źródła cytatu.

.....  
 (miejsce, data)

.....  
 (podpis Autora korespondencyjnego)

(b) Oświadczam, iż uzyskałem/liśmy wymaganą prawem zgodę uprawnionych autorsko podmiotów na reprodukcję rysunków

nr: ....., zamieszczonych w\*: .....

Oświadczam, iż uzyskałem/liśmy wymaganą prawem zgodę uprawnionych autorsko podmiotów na reprodukcję tabel

nr: ....., zamieszczonych w: .....

(\* podać bibliografie prac oryginalnych z których reprodukowane będą rysunki lub tabele)

Do Oświadczenia załączam oryginalne zezwolenia reprodukcji w liczbie: .....

rysunków: ..... tabel: ..... cytowanego tekstu: .....

.....  
 (miejsce, data)

.....  
 (podpis Autora korespondencyjnego)

### Oświadczenie dotyczące „konfliktu interesów”<sup>1</sup>

1. Nazwisko i imię Autora: .....

2. Tytuł pracy: .....

.....  
 .....

3. Oświadczenie (proszę wypełnić a lub b, niepotrzebne skreślić)

(a) Oświadczam, że „konflikt interesów” nie występuje

(b) Oświadczam, że występuje „konflikt interesów”, który polega na: .....

.....

.....

(miejsce, data)

.....

(podpis Autora korespondencyjnego)

<sup>1</sup> Konflikt interesów występuje, kiedy Autor lub zakład pracy Autora ma finansowe lub osobiste związki z innymi osobami lub instytucjami, które mogą wpływać na jego działania i decyzje.

### Zobowiązanie do zapłaty

.....

Nazwisko i imię Autora korespondencyjnego

.....

.....

Afiliacja Autora korespondencyjnego

Autor korespondencyjny pracy pod tytułem: „.....”

.....”

w przypadku przyjęcia pracy do druku w *Postęпах Mikrobiologii* zobowiązuje się w imieniu pozostałych współautorów do wniesienia opłaty\* na konto **Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów**.

.....

(miejsce, data)

.....

(podpis Autora korespondencyjnego)

\* Do końca 2017 r. obowiązuje opłata w wysokości 307,50 zł. Od 1 stycznia 2018 r. opłata ulega zróżnicowaniu. Dla Autorów którzy nie są członkami PTM opłata będzie wynosić 430,50 zł. Dla aktywnych członków PTM obowiązywać będzie aktualna opłata w wysokości 307,50 zł.

## INSTRUKCJA DLA AUTORÓW PRAC PUBLIKOWANYCH W SUPLEMENTACH DO KWARTALNIKA POSTĘPY MIKROBIOLOGII

W celu ułatwienia publikowania w jednym miejscu artykułów o podobnej problematyce, *Postępy Mikrobiologii* wydawać będą w formie suplementów, następujące prace naukowe:

1. Referaty z sesji plenarnych Zjazdów naukowych, Konferencji naukowych oraz Sympozjów organizowanych staraniem Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Manuskrypt pojedynczego referatu nie powinien przekraczać 25 stron i powinien być przygotowany wg Informacji dla Autorów *Postępów Mikrobiologii*. Całość materiałów przygotowanych do jednego suplementu nie może przekraczać 150 stron.
2. Streszczenia przyjętych przez organizatorów referatów oraz doniesień prezentowanych na zjazdach naukowych, konferencjach oraz sympozjach. Streszczenie nie powinno przekraczać jednej strony tekstu i kończyć się nie więcej jak trzema pozycjami cytowanego piśmiennictwa.

W suplementie nie będą publikowane oryginalne prace doświadczalne prezentowane na zjazdach naukowych. Prace te po odpowiednim przygotowaniu, zgodnie z instrukcją dla autorów, można przysyłać do Redakcji *Polish Journal of Microbiology* lub innego czasopisma naukowego.

Autorzy lub zamawiający suplement ponoszą pełny koszt jego opracowania oraz wydania. Możliwy jest druk czterech suplementów rocznie. Ponieważ materiały przeznaczone do suplementu nie są opracowywane oraz nie podlegają ocenie Zespołu Redakcyjnego *Postępów Mikrobiologii*, zamawiający suplement, tj. osoba upoważniona przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, bierze całkowitą odpowiedzialność za redakcję oraz wartość merytoryczną suplementu. Wydanie suplementu powinno być poprzedzone jego akceptacją przez Radę Redakcyjną *Postępów Mikrobiologii*.

---

### **Oferta Reklamy**

*Postępy Mikrobiologii* udostępnią w każdym numerze kilka stron (łącznie z wewnętrznymi stronami okładek) **reklamie**.

Czasopismo *Postępy Mikrobiologii* dociera co kwartał do kilku tysięcy odbiorców. Są wśród nich specjaliści różnych dziedzin mikrobiologii, pracujący jako nauczyciele wyższych uczelni, szkół średnich oraz pracownicy naukowcy instytutów badawczych, biotechnologów oraz lekarze. Dużą grupę naszego pisma stanowią studenci.

**Cena ogłoszenia czarno-białego wewnątrz numeru wynosi:**

1/2 strony 250,- zł

cała strona 500,- zł

**Proponujemy również ogłoszenia kolorowe – cena do uzgodnienia.**

Teksty opracowanych graficznie reklam proszę składać na adres Redakcji *Postępów Mikrobiologii*

**Redakcja nie ponosi odpowiedzialności za treść reklam i ogłoszeń**





## SPIS TREŚCI

Prof. dr hab. Józef Wojciech Kur (1955–2016) .....	3
M. Zaborowska – Krezole a drobnoustroje środowiska glebowego .....	7
N. Trojan, P. Satora – Probiotyki i ich potencjalne właściwości antyoksydacyjne .....	18
M. Siebyła, D. Hilszczańska – Różnorodność gatunkowa bakterii związanych z grzybami z rodzaju <i>Tuber</i> (trufla) .....	28
M. Malinowska, B. Tokarz-Deptuła, W. Deptuła – Mikrobiom człowieka .....	33
J.J. Klim, R. Godlewska – Zastosowanie bakteryjnych pęcherzyków zewnątrz błonowych w konstrukcji szczepionek .....	43
K. Gustaw, M. Michalak, M. Polak-Berecka, A. Waśko – Fruktofilne bakterie kwasu mlekowego (FLAB) – nowa grupa heterofermentatywnych mikroorganizmów ze środowiska roślinnego .....	56
S. Niestępski, M. Harnisz, E. Korzeniewska, A. Osińska, B. Dziuba – <i>Bacteroides</i> spp. – znaczenie kliniczne, lekooporność i metody jej oznaczania .....	67
B.K. Pawłowska, B.M. Sobieszczkańska – Amyloidy, białka powszechne wśród drobnoustrojów .....	77
S. Mucha, M. Berezowski, K. Markowska – Mechanizmy toksyczności i transportu arsenu u mikro- organizmów .....	88
T. Chmielewski, S. Tylewska-Wierzbanowska – Czynniki odpowiedzialne za rozwój <i>Lyme carditis</i> .....	100
N. Łanocha-Arendarczyk, D. Kosik-Bogacka, K. Galant, W. Zaorski, K. Kot, A. Łanocha – Pełzaki wolno żyjące o właściwościach patogenicznych dla człowieka .....	106
PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY	
P. Tarka, A. Chojecka, O. Paduch, A. Nitsch-Osuch, K. Kanecki – Ocena aktywności bójczej preparatów przeznaczonych do dezynfekcji chemiczno-termicznej białizny szpitalnej w świetle nowej Normy Europejskiej PN-EN 16616: 2015-10. Dezynfekcja chemiczno-termiczna tekstyliów .....	113
ZJAZDY I KONFERENCJE .....	121
KOMUNIKATY I INFORMACJE .....	123
INFORMACJA DLA AUTORÓW .....	144

## CONTENTS

Prof. dr hab. Józef Wojciech Kur (1955–2016) .....	3
M. Zaborowska – Cresols and the microorganisms of the soil environment .....	7
N. Trojan, P. Satora – Probiotics and their potential antioxidative activity .....	18
M. Siebyła, D. Hilszczańska – Species diversity of bacteria associated with fungi of the genus <i>Tuber</i> (truffles) .....	28
M. Malinowska, B. Tokarz-Deptuła, W. Deptuła – The human microbiome .....	33
J.J. Klim, R. Godlewska – Application of the bacterial outer membrane vesicles in vaccine design .....	43
K. Gustaw, M. Michalak, M. Polak-Berecka, A. Waśko – Fructophilic lactic acid bacteria (FLAB) – a new group of heterofermentative microorganisms from the plant environment .....	56
S. Niestępski, M. Harnisz, E. Korzeniewska, A. Osińska, B. Dziuba – <i>Bacteroides</i> spp. – clinical significance, antibiotic resistance and identification methods .....	67
B.K. Pawłowska, B.M. Sobieszczkańska – Amyloids, common proteins among microorganisms .....	77
S. Mucha, M. Berezowski, K. Markowska – Mechanisms of arsenic toxicity and transport in microorganisms .....	88
T. Chmielewski, S. Tylewska-Wierzbanowska – Factors responsible for the development of <i>Lyme</i> <i>carditis</i> .....	100
N. Łanocha-Arendarczyk, D. Kosik-Bogacka, K. Galant, W. Zaorski, K. Kot, A. Łanocha – Pathogenic free-living amoeba .....	106
METHODS AND STANDARDS	
P. Tarka, A. Chojecka, O. Paduch, A. Nitsch-Osuch, K. Kanecki – Assessing biocidal activity of agents used in chemical-thermal decontamination of hospital textiles in the light of new European Standard PN-EN 16616: 2015-10. Chemical-thermal decontamination of textiles .....	113
MEETINGS AND CONFERENCES .....	121
INFORMATION AND ANNOUNCEMENTS .....	123
INFORMATION FOR AUTHORS .....	144

