

Kwartalnik

**Tom 56**

**Zeszyt 3•2017**

LIPIEC – WRZESIEŃ

CODEN:

PMKMAV 56 (3)

2017

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

# Postępy Mikrobiologii

Advances in Microbiology

Index Copernicus ICV = 111,53 (2015)

Impact Factor ISI = 0,311 (2016)

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 Bącał, Pracownia Teorii i Zastosowań Elektrood, Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej,  
Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski.*

*Obraz SEM uzyskano przy użyciu aparatury zakupionej w ramach projektu CePT POIG.02.02.00-14-024/08-00.*

---

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

Nakład 820 egz., Objętość 14,5 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

Małgorzata Pawlikowska-Warych<sup>1\*</sup>, Joanna Palma<sup>2</sup>, Wiesław Deptuła<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Koło Naukowe Mikrobiologów, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński

Wpłynęło w lipcu 2016 r.

Zaakceptowano w maju 2017 r.

1. Wstęp. 2. Chlamydie środowiskowe chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt. 2.1. Chorobotwórczość rodziny *Parachlamydiaceae*. 2.2. Chorobotwórczość rodziny *Simkaniaceae*. 2.3. Chorobotwórczość rodziny *Rhabdochlamydiaceae*. 2.4. Chorobotwórczość rodziny *Waddliaceae*. 2.5. Chorobotwórczość innych chlamydii. 3. Diagnostyka chlamydii środowiskowych 4. Podsumowanie

### Pathogenicity of environmental chlamydiae for humans and animals

**Abstract:** More and more attention has been paid to environmental chlamydiae in recent years. They were classified as pathogenic bacteria for both humans and animals. Thanks to molecular biology techniques, the following nine families of environmental chlamydiae were assigned to the order of *Chlamydiales*: *Candidatus* Clavichlamydiaceae, *Criblamydiaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Candidatus* Piscichlamydiaceae, *Rhabdochlamydiaceae*, *Simkaniaceae*, *Waddliaceae*, *Candidatus* Actinochlamydiaceae and *Candidatus* Parilichlamydiaceae. These bacteria are considered the infectious factors of zoonoses due to the fact that they can be found among pets and livestock such as cats, guinea pigs, sheep, cattle, and even fish. Many of these animals also suffer from diseases caused by these bacteria. In this study, while characterizing environmental chlamydiae, special attention has been paid to illnesses of the respiratory tract caused by *Simkania negevensis*, and to the abortions among people and ruminants caused by *Waddlia chondrophila*. Furthermore, the species of the *Rhabdochlamydiaceae* family, as well as the bacteria from the *Parachlamydiaceae* family responsible for eye illnesses in humans and animals, are also characterized in this work. Lastly, newly discovered fish chlamydiae, which are potential factors of illnesses in humans and terrestrial animals, are also presented in this paper.

1. Introduction. 2. Pathogenicity of environmental chlamydiae for humans and animals. 2.1. Pathogenicity of the *Parachlamydiaceae* family. 2.2. Pathogenicity of the *Simkaniaceae* family. 2.3. Pathogenicity of the *Rhabdochlamydiaceae* family. 2.4. Pathogenicity of the *Waddliaceae* family. 2.5. Pathogenicity of other chlamydia. 3. Diagnostics of environmental *chlamydiae*. 4. Conclusions

**Słowa kluczowe:** chlamydie środowiskowe, chorobotwórczość, diagnostyka

**Key words:** diagnostics, environmental chlamydiae, pathogenicity

## 1. Wstęp

Chlamydie, czyli bakterie z rzędu *Chlamydiales*, są wewnątrzkomórkowymi, Gram-ujemnymi bakteriami, cechującymi się unikalnym cyklem rozwojowym [9, 40, 80]. Wyjątkowość tego cyklu wiąże się z faktem, że podczas namnażania wyróżnia się u nich trzy morfologicznie odmienne formy: ciało elementarne (EB – elementary body), ciało siateczkowate (RB – reticulate body) oraz ciało pośrednie (IB – intermediate body), zwane też czasami ciałkiem AB (aberrant body) [9, 40, 80]. Obecnie rząd *Chlamydiales* tworzy dziesięć rodzin (Tab. I), wśród których rodzinę *Chlamydiaceae*, stanowią mikroorganizmy określane mianem chlamydii klasycznych, a pozostałe dziewięć rodzin, to jest *Candidatus* (*Ca.*) Clavichlamydiaceae, *Criblamydiaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Ca.* Piscichlamydiaceae, *Rhabdochlamydiaceae*, *Simkaniaceae*, *Waddliaceae*, *Ca.* Actinochlamydiaceae i *Ca.* Parilichlamydiaceae stanowią chlamydie środowiskowe lub chlamydio-podobne organizmy (CLOs-chlamydia-like organisms).

Chlamydie klasyczne, jako czynnik chorobotwórczy dla ludzi i zwierząt, są znane od ponad 100 lat, choć choroby wywoływane przez nie u ludzi opisano już ponad 5 tysięcy lat temu [60, 67]. U ludzi i zwierząt (ssaki, ptaki, gady, płazy, ryby) wywołują zakażenia oczu (zapalenia spojówek, rogówki), układu oddechowego (zapalenie ucha, gardła, oskrzeli, płuc), układu krążenia (zapalenie mięśnia sercowego, miażdżyca, choroba wieńcowa), układu pokarmowego (zapalenie wątroby, śledziony, jelit), układu nerwowego (zapalenie opon mózgowych i rdzenia kręgowego, stwardnienie rozsiane, choroba Alzheimera), układu kostnego (zapalenia stawów) oraz układu moczowo-płciowego (zapalenie cewki moczowej, moczowodu, nerek, najądrzy, szyjki macicy i narządów miednicy mniejszej, niepłodność) i przebiegają objawowo, bezobjawowo lub mogą powodować zakażenie utajone [12, 18, 61, 68–70]. Wykazano, że zakażenie utajone wywoływane przez te chlamydie, następuje w wyniku spowolnienia ich cyklu rozwojowego, wskutek wpływu różnych czynników np. penicyliny czy IFN- $\gamma$ , które opóźniają

\* Autor korespondencyjny: Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński, ul. Felczaka 3c, 71-412 Szczecin;  
e-mail: malgorzata.pawlikowska@usz.edu.pl

Tabela I  
Systematyka rzędu *Chlamydiales*

Lp.	Rodzina	Rodzaj	Gatunek
1	<i>Chlamydiaceae</i>	<i>Chlamydia</i> (C.)	<i>C. trachomatis</i>
			<i>C. suis</i>
			<i>C. muridarum</i>
			<i>C. pneumoniae</i>
			<i>C. pecorum</i>
			<i>C. psittaci</i>
			<i>C. abortus</i>
			<i>C. caviae</i>
			<i>C. felis</i>
			<i>C. ibidis</i>
			<i>C. avium</i>
			<i>C. gallinaceae</i>
			<i>Ca. Amphibiichlamydia ranarum</i>
			<i>Ca. Amphibiichlamydia salamandrae</i>
2	<i>Candidatus Clavichlamydiaceae</i>	<i>Ca. Clavichlamydia</i>	<i>Ca. Clavichlamydia salmonicola</i>
3	<i>Criblamydiaceae</i>		<i>Criblamydia sequanesis</i>
			<i>Estrella lausannensis</i>
4	<i>Parachlamydiaceae</i>	<i>Parachlamydia</i> (P.)	<i>P. acanththamoebae</i>
		<i>Neochlamydia</i> (N.)	<i>N. hartmanellae</i>
		<i>Protochlamydia</i> (Pr.)	<i>Pr. amoebophila</i>
			<i>Pr. neagregliophila</i>
			<i>Ca. Metachlamydia lacustris</i>
			<i>Ca. Mesochlamydia elodeae</i>
			<i>Rubidus massiliensis</i>
5	<i>Candidatus Piscichlamydiaceae</i>	<i>Ca. Piscichlamydia</i>	<i>Ca. Piscichlamydia salmonis</i>
			<i>Ca. Piscichlamydia cyprinis</i>
6	<i>Rhabdo chlamydiaceae</i>	<i>Rhabdochlamydia</i> (R.)	<i>R. porcellionis</i>
			<i>R. crassificans</i>
			<i>Ca. Renichlamydia lutjani</i>
7	<i>Simkaniaceae</i>	<i>Simkania</i> (S.)	<i>S. negevensis</i>
		<i>Ca. Fritschea</i> (F.)	<i>Ca. F. bemisiae</i>
			<i>Ca. F. eriococci</i>
			<i>Ca. Sygnamydia venezia</i>
			<i>Ca. Sygnamydia salmonis</i>
			<i>Ca. Neptunochlamydia vexilliferae</i>
8	<i>Waddliaceae</i>	<i>Waddlia</i> (W.)	<i>W. chondrophila</i>
			<i>W. malaysiensis</i>
			<i>W. cocoyoc</i>
9	<i>Candidatus Actinochlamydiaceae</i>		<i>Ca. Actinochlamydia clariae</i>
10	<i>Candidatus Parilichlamydiaceae</i>		<i>Ca. Parilichlamydia carangidicola</i>
			<i>Ca. Similichlamydia latridicola</i>
			<i>Ca. Similichlamydia laticola</i>
			<i>Ca. Similichlamydia labri</i>

Na podstawie: [10, 16, 25, 40, 69, 71, 73, 86, 92].

dojrzwianie ciałek elementarnych (EB) i ich transformację w ciała siateczkowate (RB) [9, 40, 80]. Ich chorobotwórczość, wynika z cech, które ukształtowały się na drodze ewolucji [83, 84]. Jedną z nich jest ich wewnątrzkomórkowe pasożytność związane z utratą

funkcji niektórych genów, np. translokazy ATP/ADP [1, 61]. Inną cechą warunkującą ich chorobotwórczość jest zdolność do kontroli zaprogramowanej śmierci komórek zakażonych [63]. W ten obraz ich działania wpisuje się także możliwość zwiększenia ich inwazyjności poprzez

wykorzystywanie przez nie makrofagów, do ich transportu po całym organizmie [44, 68]. Nadto za czynniki wirulencji u chlamydii klasycznych uznawane są antygeny powierzchniowe, takie jak białka błony zewnętrznej, lipopolisacharyd, białka szoku termicznego oraz system sekrecji typu III [12, 28, 61, 68, 92].

W przypadku chlamydii środowiskowych przyjmuje się, że za ich chorobotwórczość odpowiadają charakterystyczne dla chlamydii cechy, to jest ich cykl rozwojowy, wewnątrzkomórkowe bytowanie [1, 20, 33, 42, 83, 84, 92] oraz zdolność do stymulacji apoptozy [20, 33, 42]. Również u tych chlamydii czynnikami wirulencji są białka błonowe, choć nie posiadają one identycznego kompleksu białkowego jak chlamydie klasyczne oraz system sekrecji typu III, a także typu IV [11, 51, 92]. Dane dotyczące potencjału patogenego chlamydii środowiskowych rejestrowane są dopiero od roku 1990, kiedy wyizolowano chlamydio-podobną bakterię z poronionego płodu bydła [24]. Następnie bakterie te izolowano także ze środowiska naturalnego, głównie jednak z wód jezior i rzek, a obecnie stwierdza się je nawet w wodzie wodociągowej [41, 45–47, 62], a także wykrywa się je w tkankach owadów [21, 26, 38, 54, 83] i nietoperzy [4, 11, 71]. Ich obecność opisano także w tkankach różnych zwierząt lądowych, w tym ssaków i człowieka [1, 27, 35, 36, 39, 52, 74, 77], a także ptaków, ryb, skorupiaków, roztoczy (kleszcze) i owadów (wszy, pchły, karaczany, mączlik, czerwiec) [17, 19, 21, 22, 26, 38, 43, 48, 50, 54, 60, 64, 74, 76, 77, 79, 82, 84, 87, 90, 93, 96, 98] oraz u ameb [11, 29, 30, 35, 41, 62, 75, 92]. Także ich powszechne występowanie w środowisku (woda, gleba, powietrze) sprawia, że są one potencjalnymi zarazkami dla wielu istot żywych na Ziemi [38, 74, 92]. Spowodowane jest faktem, że występując jako endosymbionty ameb [29, 30, 35, 75, 92], mają zapewnioną możliwość przetrwania niekorzystnych warunków środowiska. Pierwotniaki te cechuje oporność na wysychanie, różnice temperatur, zmiany pH, a nawet działanie związków organicznych i nieorganicznych, w tym chloru i bromu oraz środki czyszczące, a także niewrażliwość na promieniowanie UV [58]. Stąd przyjmuje się, że cysty – formy spoczynkowe ameb, stanowią bardzo duże zagrożenie dla człowieka i zwierząt ze względu na wspomniane już ich powszechne występowanie w wodzie, w tym w osadach zbiorników wody słodkiej i słonej oraz wodzie wodociągowej, mineralnej i w systemach wodnych jednostek stomatologicznych, a nawet w urządzeniach klimatyzacyjnych i w aparatach do dializ, a także w glebie i powietrzu (kurz) [41, 58]. Wykazano, że endosymbiontami ameb w szczególności są gatunki z rodziny *Parachlamydiaceae* [11, 15, 29, 30, 32, 34, 41, 62] oraz *Simkania negevensis* z rodziny *Simkaniaceae* [45, 59], a także *Waddlia chondrophila* z rodziny *Waddliaceae*, której namnażanie się w amebach wykazano *in vitro* [57]. Znane są poglądy mówiące, że być

może te właśnie wolno żyjące ameby przyczyniły się do ewolucji chlamydii, nim nastąpiła ich ekspansja do wielokomórkowych gospodarzy, w tym ludzi i zwierząt [75, 92]. Chlamydie środowiskowe wywołują cały szereg infekcji u zwierząt, kręgowych (ssaki, ptaki, ryby) i bezkręgowych (owady), które dotyczą oczu (zapalenie spojówek, rogówki), układu oddechowego (zapalenie oskrzeli, płuc czy cysty skrzelowe), pokarmowego (zapalenie jelit), krążenia (zmiany miażdżycowe), nerwowego (stwardnienie rozsiane) oraz rozrodczego (niepłodność), a które przebiegają tak objawowo jak i bezobjawowo [11, 24, 34, 45, 56, 68, 74, 92, 95, 97]. Do infekcji tymi chlamydiami dochodzi drogą aerogenną i pokarmową za pośrednictwem wody, poprzez kontakt z zakażoną glebą oraz styczność z zakażonymi zwierzętami i ich wydzielinami i wydaliniami [14, 57, 60, 74, 75, 79], w tym produktami pochodzenia zwierzęcego [2, 44, 58, 65, 68, 70, 99]. Wykazano także, że kleszcze oraz pchły i wszy są nosicielami tych bakterii, przez co stanowią zarówno ich rezerwuar, jak też są ich wektorami, zarówno dla ludzi jak i zwierząt [21, 43]. U ludzi chlamydiami środowiskowymi, spośród 9 rodzin, które wywołują choroby, są gatunki z rodzin *Parachlamydiaceae*, *Simkaniaceae*, *Rhabdochlamydiaceae* i *Waddliaceae*, zaś u zwierząt także gatunki z rodzin *Parachlamydiaceae*, *Simkaniaceae*, *Rhabdochlamydiaceae*, *Waddliaceae* oraz z rodzin *Ca. Piscichlamydiaceae*, *Ca. Clavichlamydiaceae*, *Ca. Actinochlamydiaceae* i *Ca. Parilichlamydiaceae*. W przypadku rodziny *Criblamydiaceae* nie wykazano patogenego ich oddziaływania na ludzi i zwierzęta, choć ich cechy wskazują, że mogą one być potencjalnymi patogenami dla nich.

## 2. Chlamydie środowiskowe chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt

### 2.1. Chorobotwórczość rodziny *Parachlamydiaceae*

Zarazki z tej rodziny będące endosymbiontami ameb [10, 11, 15, 16, 29, 30, 41, 62] są czynnikami chorobotwórczymi dla ludzi i zwierząt. Rodzinę tę tworzą rodzaje *Parachlamydia*, *Neochlamydia*, *Protochlamydia* (tab. I) oraz inne gatunki jak *Ca. Metachlamydia lacustris* [15], *Ca. Mesochlamydia elodeae* [16] oraz *Rubidus massiliensis* [10]. W przypadku *Parachlamydia* (*P.*) *acanthamoebae*, stwierdzono ją po raz pierwszy u ameby z rodzaju *Acanthamoeba* [62], pochodzącej z próbek śluzu z ludzkiego nosa [62], natomiast gatunek *Neochlamydia* (*N.*) *hartmannellae* izolowano u ameb z rodzaju *Hartmannella* pochodzących z wody z jednostki dentystycznej [41]. Gatunek *Protochlamydia* (*Pr.*) *amoebophila* po raz pierwszy został wyizolowany z ameb z rodzaju *Acanthamoeba* żyjących w glebie [30], zaś *Pr. naegleriophila* otrzymano od ameb

z rodzaju *Naegleria* występujących w wodach słodkich [11]. Także *Ca. Metachlamydia lacustris*, należący do tej rodziny, zidentyfikowano u ameb *Saccamoeba limax* w wodach słodkich [15], podobnie jak *Ca. Mesochlamydia elodeae*, którą stwierdzono także w wodach słodkich u ameb z rodzaju *Vannella* [16]. Natomiast gatunek *Rubidus massiliensis* izolowano od ameb *Vermamoeba vermiformis* z wody kranowej w Marsylii [10]. W ostatnim czasie wykazano także materiał genetyczny tych bakterii z rodzaju *Neochlamydia*, *Parachlamydia*, *Protochlamydia* i *Ca. Metachlamydia* u kleszczy oraz z rodzaju *Ca. Metachlamydia* u pcheł [21].

Bakterie z tej rodziny, zarówno u ludzi jak i u zwierząt (koty, świnki morskie, owce, bydło, jelenie) są przyczyną infekcji dróg oddechowych [11, 32, 34, 36, 55, 56, 68, 72, 98], układu rozrodczego [5, 18, 23, 28, 37, 55, 68, 97, 98] oraz schorzeń oczu [8, 36, 68, 74, 79, 91]. Przyjmuje się, że bakterie z rodziny *Parachlamydiaceae*, jako endosymbionty ameb występujących powszechnie w wodzie, są zarazkami, zakażającymi ludzi poprzez kontakt z wodą, choć także drogą aerozolową [41, 99]. U ludzi, *Parachlamydia acanthamoebae*, wykryto w próbkach z dróg oddechowych hospitalizowanych pacjentów, w tym u wcześniaków [11, 55, 68] i u osób dotkniętych zapaleniem płuc [36]. Szczególnie niebezpieczna wydaje się być u ludzi z obniżoną odpornością, np. zakażonych wirusem HIV, u których jest przyczyną stanów patologicznych [32]. Rejestruje się ją także u kobiet z infekcjami układu rozrodczego, a w momencie kiedy przedostanie się przez łożysko do płodu, powoduje poronienia [5, 55, 68]. Przypuszcza się, że źródłem zakażenia ludzi może być zainfekowane *P. acanthamoebae* bydło [57]. Bakterie te (*P. acanthamoebae*) wraz z *N. hartmannellae*, stwierdza się u ludzi w biofilmie soczewek kontaktowych [34], natomiast *Protochlamydia naegleriophila* izolowano z zapalenia płuc u ludzi [11, 36, 55].

U zwierząt, *P. acanthamoebae* jak i *N. hartmannellae*, wykazano u kotów i owiec dotkniętych chorobami oczu [8, 36, 68, 74, 79, 91]. W przypadku bakterii z rodzaju *Neochlamydia* sugeruje się, że mogą one być także przyczyną poronień u bydła, jako że rejestruje się te bakterie w tkankach poronionego płodu oraz w łożysku u tych zwierząt [23, 97, 98]. Do zakażenia zwierząt tymi bakteriami dochodzi poprzez wodę, gdyż bakterie do wody pitnej dostają się poprzez wydzieliny z oczu i nosa zwierząt zainfekowanych tymi zarazkami [99], bo stwierdzono je w śluzie pochodzącym z nosa świnek morskich [60] oraz w wydzielinie z oczu kotów [8, 79] i owiec [74]. Także zanieczyszczona woda dla zwierząt na pastwiskach *P. acanthamoebae* i bakteriami z rodzaju *Neochlamydia*, jest dużym zagrożeniem zarówno dla udomowionych jak i dzikich przeżuwaczy, pasących się na tych obiektach [99]. Potwierdzono to w badaniach u zdrowego bydła i jeleni, u których stwierdzono te bak-

terie odpowiednio w odchodach (bydło) oraz w próbkach z wątroby i płuc (jelenie) [77]. Kolonizację płuc przez te bakterie, w kontekście wykazania ich w płucach u jeleni [77], potwierdzono wcześniej *in vitro*, gdyż wykazano występowanie *P. acanthamoebae* w pneumocytach i w makrofagach płucnych u ludzi [11, 32].

## 2.2. Chorobotwórczość rodziny *Simkaniaceae*

Rodzinę *Simkaniaceae* tworzą obecnie rodzaje *Simkania*, *Ca. Fritschea* i *Ca. Syngnamydia* oraz gatunek *Ca. Neptunochlamydia vexilliferae* (tab. I), z których pierwszy jest chorobotwórczy wyłącznie dla ludzi, a dwa kolejne są chorobotwórcze odpowiednio dla owadów i ryb, natomiast co do ostatniego, brak danych odnośnie jego patogennego oddziaływania. Gatunek *Simkania* (*S.*) *negevensis*, izolowano po raz pierwszy jako zanieczyszczenie hodowli komórkowej [25, 45, 46, 47], natomiast rodzaj *Ca. Fritschea* reprezentują wykryty wewnątrz komórek bakteriocytów mączlika ostroskrzydłego (*Bemisia tabaci*) *Ca. Fritschea bemisiae* oraz *Ca. Fritschea eriococci*, zidentyfikowany u czerwca wiązowca (*Eriococcus spurium*) [26, 93]. Do tej rodziny przypisuje się również gatunki, *Ca. Syngnamydia salmonis*, zidentyfikowany w cystach nabłonkowych skrzeli hodowlanych łososi szlachetnych (*Salmo salar*) w Norwegii [67] oraz *Ca. Syngnamydia venezia*, stwierdzany w cystach u igliczni (*Syngnathus typhle*) wyłowionych w wodach Laguny Weneckiej [27], jak też gatunek *Ca. Neptunochlamydia vexilliferae* wykryty u ameb z rodzaju *Vexillifera* sp. występujących w wodach jeziora Lago di Paola (Włochy) [73].

Spośród chlamydii z rodziny *Simkaniaceae*, chorobotwórczą dla ludzi jest tylko *S. negevensis*, której patogenne działanie wiąże się głównie z infekcjami dróg oddechowych [45, 49, 53, 59, 64]. Wykazano, że bakteria ta towarzyszy nie tylko pozaszpitalnemu zapaleniu płuc u ludzi, zapaleniu oskrzeli u niemowląt, ale także izolowano ją z przewlekłej obturacyjnej choroby płuc u ludzi dorosłych w Europie [65, 70], Japonii [65, 100], Ameryce Północnej i Brazylii [65] oraz Izraelu [53]. Bakteria ta zakaża ludzi drogą aerozolową oraz poprzez wodę, jako że stwierdza się ją w wodzie pitnej z wodociągów i ze studni oraz w wodach z salonów odnowy biologicznej i systemów chłodniczych, a także w miejskich systemach melioracyjnych [65, 70]. Wektorami transmisji tej bakterii do ludzkiego organizmu, mogą być także ameby [45, 58]. Badania seroepidemiologiczne wykazały występowanie *S. negevensis* u dzieci w wieku przedszkolnym (1–6 lat) w Finlandii oraz w Izraelu [53, 66], jak też izolowano ją od inuickich noworodków w Kanadzie, które chorowały na ostre zapalenie oskrzeli [31]. Generalnie przyjmuje się, że infekcje na tle *S. negevensis*, najczęściej dotyczą dzieci do 6 roku życia oraz dorosłych w wieku około 30 lat, choć stwierdza się ją, niezależnie od wieku

i u biorców przeszczepu płuc [49, 53, 59]. Wykazano, że infekcja tą bakterią nie ma wpływu na występującą u dzieci astmę i nie wpływa na pogorszenie się stanu osób zainfekowanych wirusem RSV [53, 59]. Przyjmuje się, że jeśli infekcja na tle *S. negevensis* rozpoczynała się przez pochłonięcie wolnych ameb zawierających te mikroorganizmy, to kontakt tych ameb z komórkami serii monocytarno-makrofagowej makroorganizmu, często powoduje ich śmierć i zahamowania rozprzestrzeniania się ich w organizmie [45].

Dla zwierząt, jak wspomniano, chorobotwórczymi z tej rodziny są gatunki z rodzaju *Ca. Fritschea* (owady) i gatunki z rodzaju *Ca. Syngnamydia* (ryby). W przypadku *Ca. Fritschea bemisiae* oraz *Ca. Fritschea eriococci*, nie znana jest ich rola jako czynnika etiologicznego schorzeń u swoich gospodarzy, choć stwierdzano je w bakteriocytach i jelitach tych owadów, które są pasożytami warzyw [26, 93]. W przypadku rodzaju *Ca. Syngnamydia* wykazano, że gatunek *Ca. Syngnamydia salmonis*, cechuje się dużą patogennością w stosunku do łososi szlachetnych, gdyż powoduje ona w hodowlach tych ryb zaburzenia ze strony układu oddechowego, manifestujące się wysoką śmiertelnością [67]. Także gatunek *Ca. Syngnamydia venezia*, jest przyczyną infekcji skrzel u wolno żyjących igliczni, z tym, że nie określono ich śmiertelności [27].

### 2.3. Chorobotwórczość rodziny *Rhabdochlamydiaceae*

Bakterie z rodziny *Rhabdochlamydiaceae* (Tab. I), reprezentowane są przez *Rhabdochlamydia (R.) porcellionis*, *R. crassificans* i *Ca. Renichlamydia lutjani*, które mogą być patogenami człowieka, bydła, równonogów, ryb, przy czym równonogi i ryby są dodatkowo ich rezerwuarem [19, 54, 84, 96]. Gatunek *R. porcellionis* zaobserwowano w wątrobotrzustce oraz w gruczołach jelita środkowego skorupiaka (równonoga) prosionka szorstkiego (*Porcellio scaber*) [54, 84], natomiast *R. crassificans*, wykazano w ciałkach tłuszczowych karaczanów wschodnich (*Blatta orientalis*) [17, 76], zaś trzeci gatunek *Ca. Renichlamydia lutjani*, stwierdzono w nerkach i śledzionie lucjanów kaszmirskich (*Lutjanus kasmira*) żyjących w Oceanie Spokojnym u wybrzeży Hawajów [19, 96]. Także materiał genetyczny *Rhabdochlamydia* spp. wykazano w próbach z nozdrzy tylnych jastrzębia rdzawosternego (*Buteo jamaicensis*), który dodatkowo miał inwazję wszy [43].

Rozpatrując chorobotwórczość tych bakterii u ludzi, należy stwierdzić, że *R. porcellionis*, powoduje u osób dorosłych i u wcześniaków, stany chorobowe układu oddechowego [38, 55, 56], a także może być przyczyną poronień u kobiet, co potwierdzono badaniami serologicznymi i molekularnymi [37, 55]. Natomiast w przypadku zwierząt, chorobotwórczość *R. porcellionis* wykazano w odniesieniu tylko dla bydła, u którego może być

przyczyną ronień, na co wskazują badania serologiczne i molekularne [18, 98]. Zarazek ten występuje u prosionka szorstkiego (*Porcellio scaber*), reprezentującego równonogi, powoduje zakażenie komórek gruczołu jelita środkowego, choć ta infekcja nie zawsze powoduje lizę komórek tego równonoga, jako że bakterie te często wykazują symbiozę odżywczą z organizmem gospodarza, co sugeruje asymptotyczny stan koegzystencji [84]. Inny gatunek, *R. crassificans*, opisywany wcześniej jako *Rickettsiella crassificans* [76], stwierdzano u karaczanów wschodnich, u których lokalizował się w ciałach tłuszczowych oraz w nabłonku jelit, cewce Malpighiego, komórkach hemolimfy oraz w układzie rozrodczym, powodując u nich, w ostatnim stadium infekcji, opuchliznę brzuszną uniemożliwiającą poruszanie się tych zwierząt [17, 76]. W przypadku trzeciego rodzaju/gatunku z tej rodziny, *Ca. Renichlamydia lutjani* wykazano, że powoduje on u młodych osobników lucjana kaszmirskiego, introdukowanych w rafy wysp hawajskich, cysty głównie w nerkach i w mniejszym stopniu w śledzionie [19, 96]. Zmiany te powodują stany zapalne, które nasilają się wraz z wiekiem tych ryb, ale co ciekawe nie stwierdza się tego zarazka u ryb powyżej 26 cm długości [19, 96]. Sugeruje się, że infekcja *Ca. Renichlamydia lutjani* u lucjanów, staje się przyczyną przenoszenia się tego czynnika zakaźnego także na inne ryby, występujące naturalnie w tych wodach [96].

### 2.4. Chorobotwórczość rodziny *Waddliaceae*

Rodzinę tę reprezentuje tylko jeden rodzaj – *Waddlia (W.)* z trzema gatunkami *W. chondrophila*, *W. malaysiensis* i *W. cocoyoc* (tab. I), które są czynnikami chorobotwórczymi dla ludzi i zwierząt (bydło, nietoperze, gryzonie) [2, 4, 20, 57, 71]. Po raz pierwszy *W. chondrophila* wyizolowano z poronionych płodów bydła [24], zaś *W. malaysiensis* otrzymano z odchodów nietoperzy owocowych z gatunku *Eonycteris spelaea* żyjących w Malezji [4, 13], natomiast *W. cocoyoc* izolowano z płuc nietoperzy owocowych z gatunku *Artibeus intermedium* żyjących w Meksyku [71].

U ludzi *W. chondrophila* jest przyczyną infekcji układu rodniego, co skutkuje poronieniami [2, 4, 6, 20, 57, 78], gdyż bytując wewnątrzkomórkowo, ma możliwość utrzymywania się w komórkach łożyska [20]. Bakteria ta infekuje głównie komórki nabłonka gruczołowego dróg rodnych, powodując poronienia manifestujące się zapaleniem błony doczesnej, błon płodowych i powoduje zwiększenie ilości komórek plazmatycznych we krwi [6]. Przyjmuje się, że mechanizm tych poronień na tle tej bakterii, związany jest z białkami szoku cieplnego 60 (HSP60) i/lub produkcją cytokin prozapalnych między innymi TNF- $\alpha$  [6]. Wysłunięto także hipotezę, że *W. chondrophila*, podobnie jak *Chlamydia trachomatis*, wywołuje u kobiet bezpłodność jajnikową [95]. Trzeba

dodać, że również u małych człękoksztalnych (goryl, szympan), zarówno tych trzymany w niewoli jak i wolno żyjących, stwierdzono występowanie *Waddlia chondrophila*, przy czym nie stwierdzono u nich żadnych objawów chorobowych [52].

W przypadku zwierząt, *W. chondrophila*, powoduje u bydła infekcje dróg rodnych powodując roniecia [24, 57] oraz stwierdzono ją u małych gryzoni, które mogą być rezerwuarem tych bakterii [57]. Przypuszcza się, że zarówno od gryzoni jak i od bydła możliwa jest transmisja tej bakterii na ludzi [57]. Nadmienić trzeba, że *W. chondrophila* wykorzystywana jest do badań nad patogennością chlamydii, jako że może namnażać się w różnych komórkach (ludzkie makrofagi, pneumocyty, komórki endometrium) jak i w amebach [57]. Ponadto, u bakterii tej, jako pierwszej środowiskowej chlamydii, zidentyfikowano białka immunogenne, które wykorzystywane mogą być w diagnostyce zakażeń na jej tle [51]. Odnośnie chorobotwórczego działania *Waddlia* sp., stwierdzić należy, że *W. cocoyoc* wykazano u nietoperzy, u których powoduje śródmiąższowe zapalenie płuc, hiperplazję limfoidalną śledziony oraz zmiany na skórze [71]. Bakteria ta w hodowli komórek Vero i BHK21, daje także efekt cytopatyczny, co dowodzi jej patogenności [71].

## 2.5. Chorobotwórczość innych chlamydii

### Chorobotwórczość rodziny *Candidatus Piscichlamydiaceae*

Rodzinę *Ca. Piscichlamydiaceae* reprezentują dwa gatunki: *Ca. Piscichlamydia salmonis* i *Ca. Piscichlamydia cyprinis* (tab. I), które są chorobotwórcze w obrębie zwierząt tylko dla ryb. Po raz pierwszy gatunek *Ca. Piscichlamydia salmonis* izolowano z cyst skrzelowych łososi atlantyckich (*Salmo salar*) [22, 48, 75, 89], natomiast gatunek *Ca. Piscichlamydia cyprinis* z cyst amurów białych z Australii [69, 90], choć charakterystyczny dla tych bakterii materiał genetyczny uzyskano także z cyst łososi atlantyckich (*Salmo salar*) [22, 48, 75]. Wykazano także, że gatunek *Ca. Piscichlamydia salmonis*, występuje w inkluzjach nabłonka pstrąga alpejskiego (*Salvelinus alpinus*) w Kanadzie [22] oraz u pstrągów alpejskich (*Salvelinus alpinus*) żyjących w rzekach Wirginii (USA) [75], a także u pstrągów potokowych (*Salmo trutta*) żyjących w wodach rzecznych w Szwajcarii [82]. Bakterie te u ryb powodują powstawanie cyst skrzelowych, co objawiać się może dysfunkcją układu oddechowego oraz powodować może zapalenie jelit z wysoką śmiertelnością ryb młodocianych [85]. Bakterie te jako czynniki chorobotwórcze stwierdzano początkowo tylko u ryb hodowlanych, a obecnie także u ryb wolnożyjących, w wyniku, jak się przypuszcza, horyzontalnej transmisji czynnika etiologicznego pomiędzy gatunkami [82]. Stan taki związany

jest z dość szerokim widmem tej chlamydii dla różnych gatunków ryb, choć nadal nie jest czynnikiem infekcyjnym dla zwierząt domowych i ludzi.

### Chorobotwórczość rodziny *Candidatus Clavichlamydiaceae*

Reprezentantem rodziny *Ca. Clavichlamydiaceae* jest jeden gatunek *Ca. Clavichlamydia salmonicola* (tab. I), który wyizolowano z komórek nabłonka skrzelu łososa atlantyckiego (*Salmo salar* L.), choć po raz pierwszy opisał go Plehn w 1920 r. jako mukofilozę u karpia zwyczajnego (*Cyprinus carpio* L.) [48, 64, 82]. Bakteria ta jest chorobotwórcza wśród zwierząt tylko dla ryb, u których powoduje dysfunkcję układu oddechowego prowadzącą do śmierci ryb, która w zależności od gatunku i wieku ryb waha się od 20% do 100% [48, 64]. Zarazek ten wykazano również w cystach nabłonkowych u bassa niebieskiego (*Lepomis macrochirus Rafinesque*) [64], u łososi atlantyckich (*Salmo salar* L.) [64] oraz u pstrągów alpejskich (*Salvelinus alpinus*) żyjących w wodach rzek Wirginii (USA).

### Chorobotwórczość rodziny *Candidatus Actinochlamydiaceae*

Do rodziny *Ca. Actinochlamydiaceae* przynależy gatunek *Ca. Actinochlamydia clariae* (tab. I), chorobotwórczy tylko dla zwierząt – ryb, a który wyizolowano z cyst skrzelowych sumów afrykańskich (*Clarias gariepinus*) hodowanych w Ugandzie [86]. Powoduje ona u form młodocianych tych ryb zaburzenia poruszania się (często ryby pływają brzuchem do góry) oraz zaburzeń oddychania, co skutkuje śmiercią [86]. Zarazek ten powoduje inkluzje w skrzelach tych ryb i tworzy tunele przez aktynowopodobne białko, które rozchodząc się promieniście otwierają się na powierzchni komórek lub w sąsiadujących komórkach. Takie inkluzje z kanałami nie zostały nigdy opisane u bakterii rzędu *Chlamydiales*, dlatego wydaje się, że ta nowa cecha tych bakterii, to bardzo ciekawy i ważny element w biologii, w tym biologii tych zarazków [86].

### Chorobotwórczość rodziny *Candidatus Parilichlamydiaceae*

Rodzinę *Ca. Parilichlamydiaceae* reprezentują cztery gatunki: *Ca. Parilichlamydia carangidicola*, *Ca. Similichlamydia latridicola*, *Ca. Similichlamydia laticola* i *Ca. Similichlamydia labri* (tab. I), które są chorobotwórcze tylko dla zwierząt – ryby, u których powodują zaburzenia w oddychaniu. Gatunek *Ca. Parilichlamydia carangidicola* stwierdzono w cystach ryb z gatunku *Seriola lalandi* w Australii [88], zaś gatunek *Ca. Similichlamydia latridicola* wyizolowano z cyst ryb *Latris lineata* [89]. Natomiast trzeci gatunek, *Ca. Similichlamydia laticola*, wykryto w ikrze i skrzelach barramundi (*Lates calcarifer*) z południowej Australii [90], a gatunek



*Ca. Similichlamydia labri* stwierdzono w cystach skrzeli wargaczy kniazik (*Labrus bergylta*) [87]. Ta ostatnia – *Ca. Similichlamydia labry*, przypomina ultrastrukturalnie *Ca. Actinochlamydia clariae* (rodzina *Ca. Actinochlamydiaceae*), którą opisano u sumy [86]. Wszystkie cztery zarazki z tej rodziny nie powodują stanów zapalnych ani rozrostu tkanek, a jedynie towarzyszą cystom nabłonkowym [82]. Sugeruje się [82, 87–90], że fakt występowania zarazków z rodziny *Ca. Parilichlamydiaceae* u różnych ryb, w kontekście spożywania ich przez człowieka, mimo nie stwierdzania ich u ssaków, winien stać się sygnałem ważnym w epidemiologii chorób zakaźnych ludzi.

### Potencjalna chorobotwórczość rodziny

#### *Criblamydiaceae*

Rodzinę *Criblamydiaceae* tworzą dwa gatunki (tab. I), z tym że gatunek *Criblamydia sequanensis* izolowany był z wody rzeki Sekwana w Paryżu w 2006 roku [94], zaś gatunek *Estrella (E.) lausannensis* z wody rzeki Llobregat w Barcelonie [7]. Bakterie te, mimo że nie wykazują patogennego działania wobec ludzi i zwierząt, przyjmuje się, że są potencjalnymi czynnikami infekcyjnymi, bo dowiedziono, że *E. lausannensis* namnaża się w komórkach pochodzenia ludzkiego i rybiego [7, 50, 81], jednakże wykazano, że nie hamuje zaprogramowanej śmierci tych komórek i dlatego przyjmuje się, że ma ograniczoną zdolność do rozprzestrzeniania się w ludzkich makrofagach [7, 50, 81]. Natomiast stwierdzone przeciwciała (o różnym mianie) anty-*E. lausannensis* u dzieci zdrowych [81] oraz u kobiet z zapaleniem jajo-wodu [3] sugerują, że ta chlamydia, może być również przyczyną chorób u ludzi i zwierząt. Ciekawym faktem wydaje się być wykazanie obecności materiału genetycznego rodzaju *Criblamydia* u kleszczy w Szwajcarii oraz rodzaju *Estrella* u kleszczy w Algierii [21], co może wskazywać na szersze, niż się do tej pory przyjmowało widmo tego zarazka.

### 3. Diagnostyka chlamydii środowiskowych u zwierząt

Dzisiejsza diagnostyka chlamydii środowiskowych dostarcza bardzo wielu problemów, jako że tak jak przy chlamydiach klasycznych, tak i przy chlamydiach środowiskowych, nie ma możliwości hodowli ich na sztucznych pożywkach, a jedynie namnażają się w specyficznych dla nich hodowlach komórkowych, których wobec chlamydii środowiskowych w pełni nie opracowano. W ich diagnostyce często wykorzystuje się linie komórkowe dedykowane chlamydiom klasycznym, takie jak HeLa, HEp-2, Vero, BGM, BHK21, komórki McCoy'a, czy też linie komórkowe monocytarno-makrofagowe U937, linie komórkowe fibroblastów ludzkich, małżowiny nosowej bydła oraz komórki

owadzie [20, 42, 46, 47, 84]. Chlamydie środowiskowe w hodowli, wykazują charakterystyczny kształt form morfologicznych, specyficzny dla poszczególnych rodzin [83]. Natomiast w ich diagnostyce badania serologiczne nie są skuteczne, jako że np. test ELISA w diagnostyce bakterii z rzędu *Chlamydiales*, opiera się głównie na rekombinantowych głównych białkach błony zewnętrznej (MOMP – major outer membrane protein) i białku błony zewnętrznej (OmcB – cysteine-rich outer membrane protein) chlamydii klasycznych [4, 51], które nie są swoiste dla chlamydii środowiskowych. Przykładowo *S. negevensis* nie zawiera antygeny LPS, trisacharydu  $\alpha$ Kdo-(2→8)- $\alpha$ Kdo-(2→4)- $\alpha$ Kdo, powszechnego dla wszystkich chlamydii klasycznych (rodzina *Chlamydiaceae*), a nadto nie zostaje on rozpoznany przez monoklonalne przeciwciała odnoszące się do MOMP tych chlamydii [25, 45]. Białka błony zewnętrznej MOMP chlamydii klasycznych bogate w cysteinę, czyli białka OmcA i OmcB oraz polimorficzne białka błony (PMP), nie są specyficzne dla zarazków np. z rodziny *Waddliaceae* [51]. Wprawdzie duże możliwości zaprojektowania specyficznego testu ELISA dla tej rodziny, dało opisanie białek Wim3 i Wim4, których gen *wcw\_1618* koduje białko Wim4 u *W. chondrophila*, i jest zlokalizowany w chromosomie bakteryjnym w jednym z czterech skupisk genetycznych systemu sekrecyjnego typu III (T3SS) [51]. Te białka (Wim3 i Wim4) wydają się najbardziej immunogenne i rokują jako cel w teście ELISA, wykorzystywanym w diagnostyce *W. chondrophila* [51].

### 4. Podsumowanie

Rozwój metod biologii molekularnej pozwolił poznać wiele nowych patogenów, a wśród nich przebogate pod względem cech biologicznych chlamydie środowiskowe. Wykazano, że te chlamydie stanowią realne i potencjalne zagrożenie dla zdrowia człowieka oraz są przyczyną chorób u wielu ssaków (bydło, owce, jelenie, koty, świnki morskie, małe gryzonie nietoperze), ptaków, ryb, skorupiaków oraz owadów. Stan ten pogarsza także fakt, że wektorami tych bakterii są zarówno roztocza (kleszcze) i owady (wszy, pchły), a także ameby, powszechnie występujące w środowisku naturalnym. Bakterie te, jak się przypuszcza, mogą być przyczyną chorób odzwierzęcych, gdyż *W. chondrophila* czy *P. acanthamoebae*, mogą przenosić się od bydła lub małych gryzoni, na człowieka. Szczególnie niebezpieczne są infekcje na tle *S. negevensis* dróg oddechowych u ludzi i zwierząt oraz ronienia u ludzi i przeżuwaczy na tle *W. chondrophila*. Nadto endosymbionty ameb, *P. acanthamoeba* czy *N. hartmanelleae*, są także przyczyną chorób oczu u ludzi i zwierząt (owce, koty) oraz towarzyszą wraz z bakteriami z rodziny

*Rhabdochlamydiaceae*, infekcjom dróg oddechowych u ludzi. Sporym wyzwaniem dla badaczy i diagnostów jest zdolność do namnażania się chlamydii środowiskowych w ludzkich makrofagach, a przez to wykorzystywania komórek tej linii do ich hodowli. Przyjmuje się, że infekcje chlamydiami środowiskowymi u ludzi, są szczególnie niebezpieczne dla dzieci i osób z obniżoną odpornością. Nadto fakt, że bakterie te powszechnie występują głównie w środowisku, w tym wodnym i infekują m.in. ryby, które są dość powszechnym środkiem spożywczym dla ludzi, dlatego zarazki te powinny stać się grupą mikroorganizmów o zwiększonej uwadze w postępowaniu epidemiologicznym i prozdrowotnym.

## Piśmiennictwo

- Ball S.G., Greub G.: Blurred pictures from the crime scene; the growing case for a function of *Chlamydiales* in plastid endosymbiosis. *Microbes Infect.* **17**, 723–726 (2015)
- Barkallah M., Gharbi Y., Hassena A.B., Slima A.B., Mallek Z., Gautier M., Greub G., Gdoura R., Fendri I.: Survey of infectious etiologies of bovine abortion during mid- to late gestation in dairy herds. *PLoS ONE*, **9**, e91549 (2014)
- Barsy M. de, Bottinelli L., Greub G.: Antibiotic susceptibility of *Estrella lausannensis*, a potential emerging pathogen. *Microbes Infect.* **16**, 746–754 (2014)
- Barsy M. de, Greub G.: *Waddlia chondrophila*: from biology to pathogenicity. *Microbes Infect.* **15**, 14–15 (2013)
- Baud D., Goy G., Gerber S., Vial Y., Hohlfeld P., Greub G.: Evidence of maternal-fetal transmission of *Parachlamydia acanthamoebae*. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 120–121 (2009)
- Baud D., Goy G., Osterheld M.C., Croxatto A., Borel N., Vial Y., Pospischil A., Greub G.: Role of *Waddlia chondrophila* placental infection in miscarriage. *Emerg. Infect. Dis.* **3**, 41–45 (2014)
- Bertelli C., Aeby S., Chassot B., Clulow J., Hilfiker O., Rappo S., Ritzmann S., Schumacher P., Terrettaz C., Benaglio P., Falquet L., Farinelli L., Gharib W.H., Goesmann A., Harshman K., Linke B., Miyazaki R., Rivolta C., Robinson-Rechavi M., van der Meer J.R., Greub G.: Sequencing and characterizing the genome of *Estrella lausannensis* as an undergraduate project: training students and biological insights. *Front. Microbiol.* **6**, 101 (2015)
- Bomhard W. von, Polkinghorne A., Lu Z.H., Vaughan L., Vogtlin A., Zimmermann D.R., Spiess B., Pospischil A.: Detection of novel chlamydiae in cats with ocular disease. *Am. J. Vet. Res.* **64**, 1421–1428 (2003)
- Borel N., Pospischil A., Hudson A.P., Rupp J., Schoborg R.V.: The role of viable but non-infectious developmental forms in chlamydial biology. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **4** (2014)
- Bou Khalil J.Y., Benamar S., Baudoin J.P., Croce O., Blanc-Tailleur C., Pagnier I., Raoult D., La Scola B.: Developmental cycle and genome analysis of “*Rubidus massiliensis*”, a new *Vermamoeba vermiformis* pathogen. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **6** (2016)
- Casson N., Michel R.: Müller K.-D., Aubert J.D., Greub G.: *Protochlamydia naegleriophila* as etiologic agent of pneumonia. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 168–172 (2008)
- Choroszy-Król I.C., Frej-Mądrzak M., Jama-Kmiecik A., Bober T., Sarowska J.: Characteristics of the *Chlamydia trachomatis* species – immunopathology and infections. *Adv. Clin. Exp. Med.* **21**, 799–808 (2012)
- Chua P.K.B., Corkill J.E., Hooi P.S., Cheng S.C., Winstanley C., Hart C.A.: Isolation of *Waddlia malaysiensis*, a novel intracellular bacterium, from Fruit bat [*Eonycteris spelaea*]. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 271–277 (2005)
- Corsaro D., Greub G.: Pathogenic potential of novel chlamydiae and diagnostic approaches to infections due to these obligate intracellular bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 283–297 (2006)
- Corsaro D., Michel R., Walochnik J., Müller K.D., Greub G.: *Saccamoeba lacustris*, sp. nov. (Amoebozoa: Lobosea: Hartmannellidae), a new lobose amoeba, parasitized by the novel chlamydia, *Candidatus Metachlamydia lacustris* (Chlamydiae: Parachlamydiaceae). *Eur. J. Protistol.* **46**, 86–95 (2010)
- Corsaro D., Müller K.D., Wingender J., Michel R.: “*Candidatus Mesochlamydia elodeae*” (Chlamydiae: Parachlamydiaceae), a novel chlamydia parasite of free-living amoebae. *Parasitol. Res.* **112**, 829–838 (2013)
- Corsaro D., Thomas V., Goy G., Venditti D., Radek R., Greub G.: ‘*Candidatus Rhabdochlamydia crassificans*’, an intracellular bacterial pathogen of the cockroach *Blatta orientalis* (Insecta: Blattodea). *Syst. Appl. Microbiol.* **30**, 221–228 (2007)
- Corsaro D., Venditti D.: Emerging chlamydial infection. *Crit. Rev. Microbiol.* **30**, 75–106 (2004)
- Corsaro D., Work T.M.: *Candidatus Renichlamydia lutjani*, a Gram-negative bacterium in internal organs of blue-striped snapper *Lutjanus kasmira* from Hawaii. *Dis. Aquat. Org.* **98**, 249–254 (2012)
- Croxatto A., Greub G.: Early intracellular trafficking of *Waddlia chondrophila* in human macrophages. *Microbiology*, **156**, 340–355 (2010)
- Croxatto A., Rieille N., Kernif T., Bitam I., Aeby S., Péter O., Greub G.: Presence of *Chlamydiales* DNA in ticks and fleas suggests that ticks are carriers of *Chlamydiae*. *Ticks Tick-borne Dis.* **5**, 359–365 (2014)
- Draghi II A., Bebak J., Daniels S., Tulman E.R., Geary S.J., West A.B., Popov V.L., Frasca S. Jr.: Identification of ‘*Candidatus Piscichlamydia salmonis*’ in Arctic charr *Salvelinus alpinus* during a survey of charr production facilities in North America. *Dis. Aquat. Org.* **89**, 39–49 (2010)
- Deuchande R., Gidlow J., Caldow G., Baily J., Longbottom D., Wheelhouse N., Borel N., Greub G.: *Parachlamydia* involvement in bovine abortions in a beef herd in Scotland. *Vet. Rec.* **166**, 598–599 (2010)
- Dilbeck P.M., Evermann J.F., Crawford T.B., Ward A.C., Leathers C.W., Holland C.J., Mebus C.A., Logan L.L., Rurangirwa F.R., McGuire T.C.: Isolation of a previously undescribed *Rickettsia* from an aborted bovine fetus. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 814–816 (1990)
- Everett K.D.E., Bush R.M., Andersen A.A.: Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 415–440 (1999)
- Everett K.D.E., Thao M., Horn M., Dyszynski G.E., Baumann P.: Novel chlamydiae in whiteflies and scale insects: endosymbionts ‘*Candidatus Fritschea bemisiae*’ strain Falk and ‘*Candidatus Fritschea eriococci*’ strain Elm. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **55**, 1581–1587 (2005)
- Fehr A., Walther E., Schmidt-Posthaus H., Nufer L., Wilson A., Svercel M., Richter D., Segner H., Pospischil A., Vaughan L.: *Candidatus Syngnamydia venezia*, a novel member of the phylum chlamydiae from broad nosed pipefish, *Syngnathus typhle*. *PLoS ONE*, **8**, e70853 (2013)
- Ferrell J.C., Fields K.A.: A working model for the type III secretion mechanism in Chlamydia. *Microbes Infect.* **18**, 84–92 (2016)
- Fritsche T.R., Gautom R.K., Seyedirashti S., Bergeron D.L., Lindquist T.D.: Occurrence of bacteria endosymbionts in *Acan-*

- thamoeba* spp. isolated from corneal and environmental specimens and contact lenses. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 1122–1126 (1993)
30. Fritsche T.R., Horn M., Wagner M., Herwig R.P., Schleifer K.H., Gautam R.K.: Phylogenetic diversity among geographically dispersed *Chlamydiales* endosymbionts recovered from clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2613–2619 (2000)
  31. Greenberg D., Banerji A., Friedmann M.G., Chiu C-H., Kahane S.: High rate of *Simkania negevensis* among Canadian Inuit infants hospitalized with lower respiratory tract infections. *Scand. J. Infect. Dis.* **35**, 506–508 (2003)
  32. Greub G., Berger P., Papazian L., Raoul D.: *Parachlamydiaceae* as rare agents of pneumonia. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 755–756 (2003)
  33. Greub G., Mege J.L., Raoul D.: *Parachlamydia acanthamoeba* enters and multiplies within human macrophages and induces their apoptosis. *Infect. Immun.* **71**, 5979–5985 (2003)
  34. Greub G., Raoul D.: *Parachlamydiaceae*: potential emerging pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 626–630 (2002)
  35. Greub G., Raoul D.: Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 413–433 (2004)
  36. Greub G.: *Parachlamydia acanthamoebae*, an emerging agent of pneumonia. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**, 18–28 (2009)
  37. Haider S., Collingro A., Walochnik J., Wagner M., Horn M.: *Chlamydia*-like bacteria in respiratory samples of community-acquired pneumonia patients. *FEMS Microbiol. Lett.* **281**, 198–202 (2008)
  38. Hokynar K., Sormunen J.J., Vesterinen E.J., Partio E.K., Lilley T., Timonen V., Panelius J., Ranki A., Puolakkainen M.: Chlamydia-like organisms (CLOs) in Finnish *Ixodes ricinus* ticks and human skin. *Microorganisms*, **4**, 28 (2016)
  39. Horn M.: *Chlamydiae* as symbionts in eukaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* **62**, 113–131 (2008)
  40. Horn M.: Phylum XXIV. *Chlamydiae* Garrity and Holt 2001 (w) Bergey's manual of systematic bacteriology red. W.B. Whitman, A.C. Parte, Springer-Verlag, New York, 2011, s. 843–877
  41. Horn M., Wagner M., Müller K.D., Schmid E.N., Fritsche T.R., Schleifer K.H., Michel R.: *Neochlamydia hartmannellae* gen. nov., sp. nov. (*Parachlamydiaceae*), an endoparasite of the amoeba *Hartmannella vermiformis*. *Microbiology*, **146**, 1231–1239 (2000)
  42. Ito A., Matsuo J., Nakamura S., Yoshida A., Okude M., Hayashi Y., Sakai H., Yoshida M., Takahashi K., Yamaguchi H.: Amoebal endosymbiont *Protochlamydia* induces apoptosis to human immortal HEP-2 cells. *PLoS ONE*, **7**, e30270 (2012)
  43. Jouffroy S.J., Schlueter A.H., Bildfell R.J., Rockey D.D.: *Rhabdochlamydia* spp. in an Oregon raptor. *J. Vet. Diagn. Invest.* **1–4** (2016)
  44. Kahane S., Dvoskin B., Friedman M.G.: The role of monocyte/macrophages as vehicles of dissemination of *Simkania negevensis*: an in vitro simulation model. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **52**, 219–227 (2008)
  45. Kahane S., Everett K.D.E., Kimmel N., Friedman M.G.: *Simkania negevensis* strain Z<sup>T</sup>: growth, antigenic and genome characteristics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 815–820 (1999)
  46. Kahane S., Gonen R., Sayada C., Elion J., Friedman M.G.: Description and partial characterization of a new *Chlamydia*-like microorganism. *FEMS Microbiol. Lett.* **109**, 329–333 (1993)
  47. Kahane S., Metzger E., Friedman M.G.: Evidence that the novel microorganism 'Z' may belong to a new genus in the family *Chlamydiaceae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **126**, 203–207 (1995)
  48. Karlsen M., Nylund A., Watanabe K., Helvik J.V., Nylund S., Plarre H.: Characterization of 'Candidatus Clavochlamydia salmonicola': an intracellular bacterium infecting salmonid fish. *Environ. Microbiol.* **10**, 208–218 (2008)
  49. Karunakaran K., Mehlitz A., Rudel T.: Evolutionary conservation of infection – induced cell death inhibition among *Chlamydiales*. *PLoS ONE*, **6**, e22528 (2011)
  50. Kebbi-Beghdadi C., Batista C., Greub G.: Permissivity of fish cell lines to three Chlamydia-related bacteria: *Waddlia chondrophila*, *Estrella lausannensis* and *Parachlamydia acanthamoebae*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **63**, 339–345 (2011)
  51. Kebbi-Beghdadi C., Lienard J., Uyttebroeck F., Baud D., Riederer B.M., Greub G.: Identification of immunogenic proteins of *Waddlia chondrophila*. *PLoS ONE*, **7**, e28605 (2012)
  52. Klöckner A., Nagel M., Greub G., Aeby S., Hoffman K., Liégeois F., Rouet F., De Benedetti S., Borel N., Henrichfreise B.: *Chlamydia*-related bacteria in free-living and captive great apes, Gabon. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 2199–2201 (2016)
  53. Korppi M., Paldanius M., Hyvärinen A., Nevalainen A.: *Simkania negevensis* and newly diagnosed asthma: a case-control study in 1- to 6-year-old children. *Respirology*, **11**, 80–83 (2006)
  54. Kostanjšek R., Štrus J., Drobne D., Avguštin G.: 'Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis', an intracellular bacterium from the hepatopancreas of the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 543–549 (2004)
  55. Lamoth F., Aeby S., Schneider A., Jatton-Ogay K., Vaudaux B., Greub G.: *Parachlamydia* and *Rhabdochlamydia* in premature neonates. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 2072–2075 (2009)
  56. Lamoth F., Jatton K., Vaudaux B., Greub G.: *Parachlamydia* and *Rhabdochlamydia*: emerging agents of community – acquired respiratory infections in children. *Clin. Res. Infect. Dis.* **53**, 500–501 (2011)
  57. Lamoth F., Pillonel T., Greub G.: *Waddlia*: an emerging pathogen and a model organism to study the biology of chlamydiae. *Microbes Infect.* **17**, 732–737 (2015)
  58. Leońska-Duniec A.: Pełzaki wolno żyjące jako wektory mikroorganizmów chorobotwórczych. *Probl. Hig. Epidemiol.* **92**, 173–180 (2011)
  59. Lieberman D., Kahane S., Lieberman D., Friedman M.G.: Pneumonia with serological evidence of acute infection with the *Chlamydia*-like microorganism "Z". *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **156**, 578–582 (1997)
  60. Lutz-Wohlgroth L., Becker A., Brugnera E., Huat Z.L., Zimmermann D., Grimm F., Haessig M., Greub G., Kaps S., Spiess B., Pospischil A., Vaughan L.: *Chlamydiales* in guinea-pigs and their zoonotic potential. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* **53**, 185–193 (2006)
  61. Mårdh P.-A., Paavonen J., Puolakkainen M.: Chlamydia. Plenum Publishing corporation, Nowy Jork, 1989
  62. Michel R., Hauröder-Philippczyk B.: *Acanthamoeba* from human nasal mucosa infected with an obligate intracellular parasite. *Eur. J. Protistol.* **30**, 104–110 (1994)
  63. Miyari I., Byrne G.I.: Chlamydia and programmed cell death. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 102–108 (2006)
  64. Mitchell S.O., Steinum T., Rodger H., Holland C., Falk K., Colquhoun D.J.: Epitheliocystis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., farmed in fresh water in Ireland is associated with 'Candidatus Clavochlamydia salmonicola' infection. *J. Fish. Dis.* **33**, 665–673 (2010)
  65. Nascimento-Carvalho C.M., Cardoso M.R., Paldanius M., Barral A., Araújo-Neto C.A., Saukkoriipi A., Vainionpää R., Leinonen M., Ruuskanen O.: *Simkania negevensis* infection among Brazilian children hospitalized with community-acquired pneumonia. *J. Infect.* **58**, 250–253 (2009)
  66. Niemi S., Greub G., Puolakkainen M.: *Chlamydia*-related bacteria in respiratory samples in Finland. *Microbes Infect.* **13**, 824–827 (2011)
  67. Nylund S., Steigen A., Karlsbakk E., Plarre H., Andersen L., Karlsen M., Watanabe K., Nylund A.: Characterization of 'Candidatus Syngnamydia salmonis' (*Chlamydiales*, *Simkaniaceae*), a bacterium associated with epitheliocystis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Arch Microbiol.* **197**, 17–25 (2015)

68. Pawlikowska M., Deptuła W.: Chlamydie i chlamydofile u ludzi i zwierząt. Red. J. Dżaman, Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Szczecińskiego, Szczecin, 2012.
69. Pawlikowska-Warych M., Deptuła W.: Characteristics of chlamydia-like organisms pathogenic to fish. *J. Appl. Genet.* **57**, 135–141 (2016)
70. Pérez L. M., Codony F., Ríos K., Peñuela G., Adrados B., Fittipaldi M., de Dios G., Morató J.: Searching *Simkania negevensis* in environmental waters. *Folia Microbiol.* **57**, 11–14 (2012)
71. Pierlé S.A., Morales C.O., Martínez L.P., Ceballos N.A., Rivero J.J., Díaz O.L., Brayton K.A., Setián A.A.: Novel *Waddlia* intracellular bacterium in *Artibeus intermedius* fruit bats, Mexico. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 2161–2163 (2015)
72. Pilloux L., LeRoy D., Brunel C., Roger T., Greub G.: Mouse model of respiratory tract infection induced by *Waddlia chondrophila*. *PLoS ONE*, **11**, e0150909 (2016)
73. Pizzetti I., Schulz F., Tymł T., Fuchs B.M., Amann R., Horn M., Fazi S.: Chlamydial seasonal dynamics and isolation of '*Candidatus* Neptunochlamydia vexilliferae' from a Tyrrhenian coastal lake. *Environ. Microbiol.* **18**, 2405–2417 (2015)
74. Polkinghorne A., Borel N., Becker A., Lu Z.H., Zimmermann D.R., Brugnera E., Pospischil A., Vaughan L.: Molecular evidence for chlamydial infections in the eyes of sheep. *Vet. Microbiol.* **135**, 142–146 (2009)
75. Polkinghorne A., Schmidt-Posthaus H., Meijer A., Lehner A., Vaughan L.: Novel *Chlamydiales* associated with epitheliocystis in a leopard shark *Triakis semifasciata*. *Dis. Aquat. Org.* **91**, 75–81 (2010)
76. Radek R.: Light and electron microscopic study of a *Rickettsiella* species from the cockroach *Blatta orientalis*. *J. Invert. Pathol.* **76**, 249–256 (2000)
77. Regenscheit N., Holzwarth N., Greub G., Aeby S., Pospischil A., Borel N.: Deer as a potential wildlife reservoir for *Parachlamydia* species. *Vet. J.* **193**, 589–592 (2012)
78. Reid F., Oakeshott P., Kerry S.R., Hay P.E., Jensen J.S.: Chlamydial related bacteria (*Chlamydiales*) in early pregnancy: community-based cohort study. *Clin. Microbiol. Infect.* doi:10.1016/j.cmi.2016.10.011 (2016)
79. Richter M., Matheis F., Gönczi E., Aeby S., Spiess B., Greub G.: *Parachlamydia acanthamoebae* in domestic cats with and without corneal disease. *Vet. Ophthalmol.* **13**, 235–237 (2010)
80. Rockey D.D., Matsumoto A.: The *Chlamydial* developmental cycle. Prokaryotic Development. ASM Press. Washington D.C. 2000, s. 403–425.
81. Rusconi B., Kebbi-Beghdadi C., Greub G.: Trafficking of *Estrella lausannensis* in human macrophages. *Pathog. Dis.* **5**: pii.ftv027 (2015)
82. Schmidt-Posthaus H., Polkinghorne A., Nufer L., Schifferli A., Zimmermann D.R., Segner H., Steiner P., Vaughan L.: A natural freshwater origin for two chlamydial species, *Candidatus* Piscichlamydia salmonis and *Candidatus* Clavochlamydia salmonicola, causing mixed infections in wild brown trout (*Salmo trutta*). *Environ. Microbiol.* **14**, 2048–2057 (2012)
83. Siegl A., Horn M.: Lessons from environmental *Chlamydiae*. (w) Intracellular pathogens I: *Chlamydiales*. Red. Tan M., Bavoil P., ASM Press, Washington D.C. 2012, s. 51–73.
84. Sixt B.S., Kostanjšek R., Mustedanagic A., Toenshoff E.R., Horn M.: Developmental cycle and host interaction of *Rhabdochlamydia porcellionis*, an intracellular parasite of terrestrial isopods. *Environ. Microbiol.* **15**, 2980–2993 (2013)
85. Soto M.G., Vidondo B., Vaughan L., Seth-Smith H.M.B., Nufer L., Segner H., Rubin J.-F., Schmidt-Posthaus H.: The emergence of epitheliocystis in the upper Rhone region evidence for *Chlamydiae* in wild and farmed salmonid populations. *Arch. Microbiol.* doi: 10.1007/s00203-016-1192-x (2016)
86. Steigen A., Nylund A., Karlsbakk E., Akoll P., Fiksdal I.U., Nylund S., Odong R., Plarre H., Semyalo R., Skår C., Watanabe K.: '*Cand. Actinochlamydia clariae*' gen. nov., sp. nov., a unique intracellular bacterium causing epitheliocystis in catfish (*Clarias gariepinus*) in Uganda. *PLoS ONE*, **8**, e66840 (2013)
87. Steigen A., Karlsbakk E., Plarre H., Watanabe K., Øvvegard A.-C., Brevik Ø., Nylund A.: A new intracellular bacterium, *Candidatus* Similichlamydia labri sp. nov. (*Chlamydiaceae*) producing epitheliocysts in ballan wrasse, *Labrus bergylta* (Pisces, Labridae). *Arch. Microbiol.* **197**, 311–318 (2015)
88. Stride M.C., Polkinghorne A., Miller T.L., Groff J.M., LaPatra S.E., Nowak B.F.: Molecular characterization of "*Candidatus* Parilichlamydia carangidicola", a novel *Chlamydia*-like epitheliocystis agent in yellowtail kingfish, *Seriola lalandi* (Valenciennes), and the proposal of a new family, "*Candidatus* Parilichlamydiaceae" fam.nov. (Order *Chlamydiales*). *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 1590–1597 (2013)
89. Stride M.C., Polkinghorne A., Miller T.L., Nowak B.F.: Molecular characterization of "*Candidatus* Similichlamydia latridicola" gen. nov., sp. nov. (*Chlamydiales*: "*Candidatus* Parilichlamydiaceae"), a novel *Chlamydia*-like epitheliocystis agent in the striped trumpeter, *Latris lineata* (Forster). *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 4914–4920 (2013)
90. Stride M.C., Polkinghorne A., Powell M.D., Nowak B.F.: "*Candidatus* Similichlamydia laticola", a novel *Chlamydia*-like agent of epitheliocystis in seven consecutive cohorts of farmed Australian barramundi, *Lates calcarifer* [Bloch]. *PLoS ONE*, **8**, e82889 (2013)
91. Sykes J.E., Greene C.E.: Chlamydial infections. Infectious Diseases of the dog and cat. Elsevier Saunders, USA, 2012, s. 2070–2076
92. Taylor-Brown A., Vaughan L., Greub G., Timms P., Polkinghorne A.: Twenty years of research into *Chlamydia*-like organisms: a revolution in our understanding of the biology and pathogenicity of members of the phylum *Chlamydiae*. *Pathog. Dis.* **73** (2015)
93. Thao M.L., Baumann L., Hess J.M., Falk B.W., Ng J.C., Gullan P.J., Baumann P.: Phylogenetic evidence for two new insect-associated *Chlamydia* of the family *Simkaniaceae*. *Curr. Microbiol.* **47**, 46–50 (2003)
94. Thomas V., Casson N., Greub G.: *Criblamydia sequanensis*, a new intracellular *Chlamydiales* isolated from Seine river water using amoebal co-culture. *Environ. Microbiol.* **8**, 2125–2135 (2006)
95. Verweij S.P., Kebbi-Beghdadi C., Grunt J.A., Ouburg S., Morre S.A., Greub G.: *Waddlia chondrophila* and *Chlamydia trachomatis* antibodies in screening infertile women for tubal pathology. *Microbes Infect.* **17**, 745–748 (2015)
96. Work T.M., Vignon M., Aeby G.S.: Microparasite ecology and health status of common bluestriped snapper *Lutjanus kasmira* from the Pacific Islands. *Aquatic Biology*, **9**, 185–192 (2010)
97. Wheelhouse N., Howie F., Gidlow J., Greub G., Dagleish M., Longbottom D.: Involvement of *Parachlamydia* in bovine abortions in Scotland. *Vet. J.* **193**, 586–588 (2012)
98. Wheelhouse N., Katzer F., Wright F., Longbottom D.: Novel *Chlamydia*-like organisms as cause of bovine abortions, UK. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 1323–1324 (2010)
99. Wheelhouse N., Sait M., Gidlow J., Deuchande R., Borel N., Bailly J., Caldwell G., Longbottom D.: Molecular detection of *Chlamydia*-like organisms in cattle drinking water. *Vet. Microbiol.* **152**, 196–199 (2011)
100. Yamaguchi T., Yamazaki T., Inoue M., Mashida C., Kawagoe K., Ogawa M., Shiga S., Nakagawa Y., Kishimoto T., Kurane I., Ouchi K., Ohzeki T.: Prevalence of antibodies against *Simkania negevensis* in a healthy Japanese population determined by the microimmunofluorescence test. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **43**, 21–27 (2005)

# PODZIEMNA KOMUNIKACJA – NOWE ELEMENTY SZLAKÓW SYGNAŁOWYCH ARBUSKULARNEJ SYMBIOZY MYKORYZOWEJ

Katarzyna Jas<sup>1\*</sup>, Urszula Małolepsza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Fizjologii i Biochemii Roślin, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

Wpłynęło w grudniu 2016 r.  
Zaakceptowano w kwietniu 2017 r.

1. Wstęp. 2. Symbiotyczna natura grzybów arbuskularnych. 3. Wczesne etapy nawiązywania mykoryzy arbuskularnej. 4. Wymiana cząsteczek sygnałowych podczas formowania się mykoryzy arbuskularnej. 5. Kwas mewalonowy – wtórny przekaźnik cząsteczek sygnałowych w mykoryzie arbuskularnej. 6. Kinaza białkowa CCaMK jako kluczowy element w ustanowieniu mykoryzy arbuskularnej. 7. Podsumowanie

## Underground communication – the new elements of signalling pathways of arbuscular mycorrhizal symbiosis

**Abstract:** Mycorrhiza is a symbiotic relationship between living cells of the roots of higher plants and non-pathogenic fungi which inhabit soil and belong to *Glomeromycota* (endomycorrhizae) and *Basidiomycota*, *Ascomycota* (ectomycorrhizae). Although the phenomenon of mycorrhiza was discovered by a Polish botanist F.D. Kamiński already in 1881, various stages of establishing the symbiotic relationship between the partners are still not fully understood and explained. According to the current knowledge, the roots of host plants release strigolactones, which stimulate germination and branching of spores of arbuscular fungi. As a result, the fungi synthesize molecular signals, i.e. chitooligosaccharides (COs) and lipochitooligosaccharides (LCOS), called MycF factors. Thanks to the development of molecular biology techniques the probable cascade of events during the recognition of fungal MycF factor by the host-plant has been outlined. The enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 1 (HMGR1) and also its product, mevalonic acid (MVA), play an essential role in the biosynthesis of sterols and isoprenoids in a plant cell. The recent studies indicate that these compounds may also play a very important role during establishing of the symbiotic mycorrhizal relationship. It is believed that MVA detects and transmits MycF factor to a cell nucleus of a host-plant triggering numerous necessary mechanisms in the plant cell to activate next steps of the mycorrhizal symbiosis. The discovery of HMGR1 and MVA sheds new light on symbiotic nature of mycorrhiza. This paper is a review of the current knowledge on the signal exchange during symbiotic interactions between mycorrhizal fungi and host plants.

1. Introduction. 2. Symbiotic nature of arbuscular fungi. 3. Arbuscular mycorrhiza in early stages. 4. Exchange of signaling molecules during arbuscular mycorrhiza formation. 5. Mevalonic acid – secondary signaling molecule messengers in the arbuscular mycorrhiza. 6. Protein kinase CCaMK as a key element in the establishment of arbuscular mycorrhiza. 7. Summary

**Słowa kluczowe:** kwas mewalonowy, mikoryza, reduktaza 1 3 hydroksy-3-metyloglutarylo koenzymu A, strigolaktony, szlak sygnałowy  
**Key words:** mevalonic acid, mycorrhiza, reductase 1 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A, strigolactones, signaling pathway

## 1. Wstęp

Zjawisko mykoryzy jest jednym z najczęściej spotykanych w świecie roślin symbiotycznym związkiem z grzybami. Nazwa mykoryza pochodzi od greckich słów *mycos* i *rhiza*, które oznaczają odpowiednio grzyb i korzeń [23]. Mykoryza jest relacją symbiotyczną, która tworzy się pomiędzy żywymi komórkami roślin wyższych, a niepatogenicznymi grzybami zasiedlającymi glebę. Mykoryza została odkryta w 1881 roku przez polskiego botanika F.D. Kamińskiego, który zbadał i wyjaśnił zasady symbiozy roślin wyższych z grzybami glebowymi na podstawie życia korzeniówki (*Monoctropa hypopitys*) [2, 34]. Dzisiaj wiemy, że relacja mykoryzowa może być nawiązana pomiędzy symbiotycznymi grzybami i rośliną-gospodarzem praktycznie w każdym ekosystemie na Ziemi, począwszy od pustyń, tj. obszarów pozbawionych zwartej roślinności, lasów tropikalnych bogatych w najróżniejsze gatunki roślin, a skończywszy na gruntach uprawnych, często znisz-

czonych intensywną gospodarką rolną i nadmiernym nawożeniem środkami chemicznymi [5, 35]. W zależności od stopnia kontaktu strzępek grzyba z komórkami korzenia rośliny gospodarza, wyróżnia się dwa główne typy związków mykoryzowych, tj. ektomykoryzę i endomykoryzę. Ektomykoryzę nawiązuje około 2% gatunków roślin naczyniowych. Jest to dominująca forma mykoryzy wśród gatunków leśnych roślin drzewiastych strefy umiarkowanej. Symbiontami grzybowymi tworzącymi związek ektomykoryzowy są grzyby należące do gromady podstawczaków (*Basidiomycota*) i workowców (*Ascomycota*) [11]. Wszeghobecną w przyrodzie symbiozą mykoryzową jest mykoryza arbuskularna, która należy do endomykoryz, to jest do związków mykoryzowych, w których grzyb nie tworzy mufki grzybniowej wokół korzeni i wnika nie tylko do przestrzeni międzykomórkowych, ale także do wnętrza komórek kory pierwotnej korzenia. Prawdopodobnie mykoryza arbuskularna trwa od ponad 400 milionów lat, o czym świadczą znalezione skamieliny roślin kopalnych pochodzące

\* Autor korespondencyjny: Katedra Fizjologii i Biochemii Roślin, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; tel. 42 635 44 19; e-mail: katarzyna.jas@biol.uni.lodz.pl

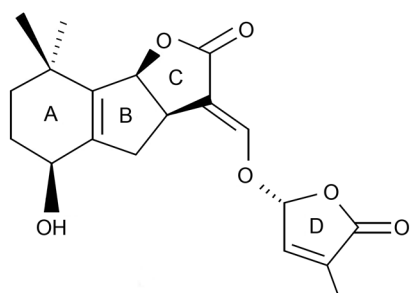
z tamtego okresu, a więc należy do najstarszych związków symbiotycznych na Ziemi. Przypuszcza się, że dzięki tej symbiozie rośliny zasiedliły ląd [20]. Szacuje się, że ok. 80% wszystkich gatunków roślin należących do okrytonasiennych i nagonasiennych wchodzi w relacje mykoryzowe z grzybami zaliczanymi do gromady *Glomeromycota* [31]. Początkowo grzyby arbuskularne były zaliczane do gromady sprzężniowców (*Zygomycota*) [21]. Jednak później na podstawie dokładniejszej obserwacji biologii tych grzybów, a także molekularnej analizy rDNA skamieniałości korzeni mykoryzowych wczesnych dewońskich roślin naczyniowych, udowodniono monofiletyczne pochodzenie grzybów arbuskularnych i podniesiono je do gromady *Glomeromycota*. Na podstawie filogenetycznego drzewa rDNA grzyby należące do *Glomeromycota* prawdopodobnie stanowią odgałęzienie pradawnego przodka, stanowiąc grupę siostrzaną z workowcami i podstawczakami [8, 24, 28]. Strzępki grzybów arbuskularnych wnikają do wnętrza komórek kory pierwotnej korzenia rośliny-gospodarza, tworząc silnie rozgałęziające się struktury (arbuskule), których rolą jest wymiana substancji odżywczych pomiędzy symbiontami. Natomiast od strony gleby strzępki grzybni przerastają podłoże na dalekie odległości uruchamiając niedostępne dla roślin składniki pokarmowe, biorąc udział w krążeniu węgla, azotu i fosforu w środowisku [30, 35]. Związek mykoryzowy jest korzystny dla obu partnerów. Dzięki tej symbiotycznej relacji roślina otrzymuje niezbędne do życia związki mineralne oraz jest lepiej zaopatrywana w wodę, a przez to może być mniej podatna na suszę oraz choroby. Tak więc grzybnia stanowi pomost łączący roślinę z środowiskiem glebowym. Natomiast w zamian, partner grzybowy korzysta z produktów fotosyntezy rośliny-gospodarza [9, 11, 14]. Dla wielu gatunków roślin symbioza mykoryzowa jest relacją fakultatywną, tworzoną w zależności od stężenia substancji odżywczych w glebie, podczas gdy grzyby, aby przejść pełen cykl rozwojowy, potrzebują cukrów od rośliny-gospodarza. Dlatego też związek mykoryzowy jest dla nich niezbędny do życia [3, 23]. Wynikiem symbiotycznej kolonizacji korzeni roślin-gospodarzy przez partnerów grzybowych, jest utworzenie podziemnej sieci wzajemnych połączeń, umożliwiających wymianę substancji odżywczych pomiędzy symbiontami, budując jeden ekosystem [19].

W ostatnich latach rozwój technik biologii molekularnej umożliwił identyfikację nowych elementów symbiotycznej ścieżki sygnałowej niezbędnych dla ustanowienia relacji mykoryzowej pomiędzy grzybami arbuskularnymi i roślinami. W niniejszej pracy przedstawiono najnowsze informacje na temat roli cząsteczek sygnałowych, w tym głównie kwasu miewalonowego (MVA), we wczesnych reakcjach roślin na sygnały wytwarzane przez symbiotyczne grzyby arbuskularne i formowanie się związku mykoryzowego. Proces

nawiązywania symbiotycznej relacji arbuskularnej został przedstawiony na przykładzie *Glomus* (według najnowszej nomenklatury od 2010 roku *Rhizophagus* [27]). Jednak pomimo wprowadzenia nowego nazewnictwa, w literaturze wciąż funkcjonuje podwójna nomenklatura dla pełnej jasności przekazywanych treści.

## 2. Symbiotyczna natura grzybów arbuskularnych

Komórki kiełkujących zarodników *Glomus* zawierają organelle zwane glioksysomami, w których przebiega cykl glioksyłanowy, umożliwiający enzymatyczne przekształcenie lipidów zmagazynowanych w zarodnikach do cukrów [6]. Stanowią one materiał zapasowy do budowy kiełkujących strzępek. Ilość lipidów jest ograniczona i po kilku dniach ulega wyczerpaniu, co działa hamująco na wzrost młodych grzybów. W tym czasie kiełkujące strzępki aktywnie penetrują glebę w celu poszukiwania zielonego partnera, z którym nawiążą symbiotyczną relację mykoryzową. Heterotroficzna natura grzybów arbuskularnych uzależnia je od związków węgla rośliny-gospodarza. Grzyb w przypadku nienawiązania relacji mykoryzowej z rośliną-gospodarzem hamuje swoją aktywność, wstrzymuje wzrost strzępek i wycofuje z nich cytoplazmę z powrotem do zarodników. Pozostaje on w stanie uśpienia aż do momentu, kiedy ponownie spróbuje nawiązać symbiotyczny kontakt z rośliną [3, 22]. Rośliny zapoczątkowują związek mykoryzowy z grzybami wydzielając do gleby specyficzne cząsteczki. Grzyby rozpoznają je jako sygnały informujące o gotowości rośliny do podjęcia kontaktu z nimi i rozwoju symbiozy. Również grzyby komunikują się ze swoimi roślinami-gospodarzami za pomocą chemicznych przekaźników sygnałowych. Wysyłają one informację zwrotną do rośliny-gospodarza, która rozpoznaje grzyby jako potencjalnych partnerów relacji mykoryzowej [30]. Niedobór substancji mineralnych w glebie (głównie fosforanów), może być jednym z czynników stymulujących w roślinie uruchamianie wewnętrznych mechanizmów obronnych prowadzących do syntezy cząsteczek sygnałowych, które odgrywają znaczącą rolę w inicjowaniu relacji symbiotycznych [12, 13]. Podczas pierwszych etapów rozpoznawania rośliny przez *Glomus* obserwuje się intensywny rozwój i rozgałęzianie strzępek grzybowych wokół korzenia gospodarza. W 2005 roku zbadano wydzieliny korzeniowe roślin, które współdziałały z grzybami mykoryzowymi. Wyniki badań ujawniły, że korzenie tych roślin wydzielają do gleby bioaktywne cząsteczki sygnałowe zidentyfikowane jako strigolaktyny, odpowiedzialne za stymulowanie rozgałęziania się strzępek grzybowych [1]. Przez ostatnie 60 lat strigolaktyny były znane jedynie jako stymulatory kiełkowania nasion roślin pasożytniczych z rodzaju *Striga*. Obecnie strigolaktyny to nowa grupa

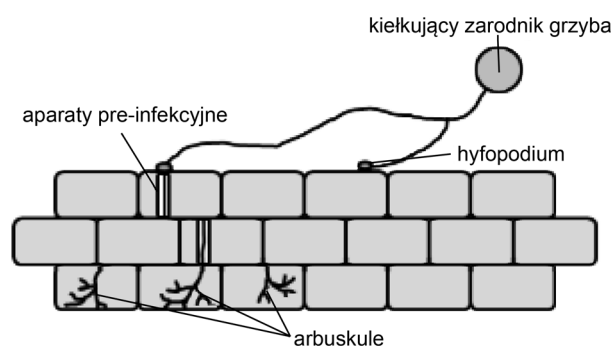


Rys. 1. Wzór strukturalny strigolu  
Na podstawie Tahad i Sijam [34].

hormonów roślinnych pełniąc wiele ważnych funkcji w roślinie. Strigolaktyny oprócz promowania symbiotycznych interakcji pomiędzy roślinami i mikroorganizmami glebowymi kontrolują również rozwój rośliny, jej pokrój i strukturę, wpływając na długość i zagęszczenie włóśników korzeniowych oraz hamowanie rozgałęziania się pędów. Tym samym strigolaktyny mogą uczestniczyć w procesie adaptacji roślin do środowiska, w szczególności kiedy obniża się dostępność substancji odżywczych w glebie, poprzez sterowanie procesem wzrostu części nadziemnej i podziemnej rośliny [29, 38]. Cząsteczka strigolaktynu zbudowana jest z trzech stykających się ze sobą pierścieni laktonowych (A, B, C) połączonych przez ester enolu z grupą butenolidową (pierścień D) [32] (Rys. 1). Synteza strigolaktynów najprawdopodobniej przebiega w plastydach systemu korzeniowego rośliny. Następnie strigolaktyny mogą być wydzielane do ryzosfery, jak również transportowane przez ksylem do wierzchołka pędu. Ścieżka biosyntezy strigolaktynów nie została jeszcze do końca poznana. Wiadomo, że strigolaktyny są produkowane z karotenoidów. Znaną są również trzy enzymy plastydowe katalizujące pierwszy etap transformacji karotenu do karlaktonu. Jednak kolejne etapy przekształcenia karlaktonu do strigolaktynów są słabo poznane i wymagają dalszych badań [13]. Skuteczność ustanowienia relacji mykoryzowej jest również uzależniona od rozpoznania przez roślinę-gospodarza specyficznych cząsteczek sygnałowych pochodzących od symbiotycznych grzybów, którymi są lipochitooligosacharydy (LCOs) oraz krótko łańcuchowe chitooligosacharydy (COs) nazywane czynnikami mykoryzacji (MycF). Wymiana i odbiór cząsteczek sygnałowych stanowi specyficzny rodzaj komunikacji pomiędzy symbiontami, przygotowując obu partnerów do późniejszej kolonizacji korzenia [33].

### 3. Wczesne etapy nawiązywania mykoryzy arbuskularnej

Niska dostępność fosforu w glebie jest czynnikiem inicjującym pierwsze etapy formowania się symbiozy mykoryzowej. Roślina-gospodarz pozbawiona zwią-



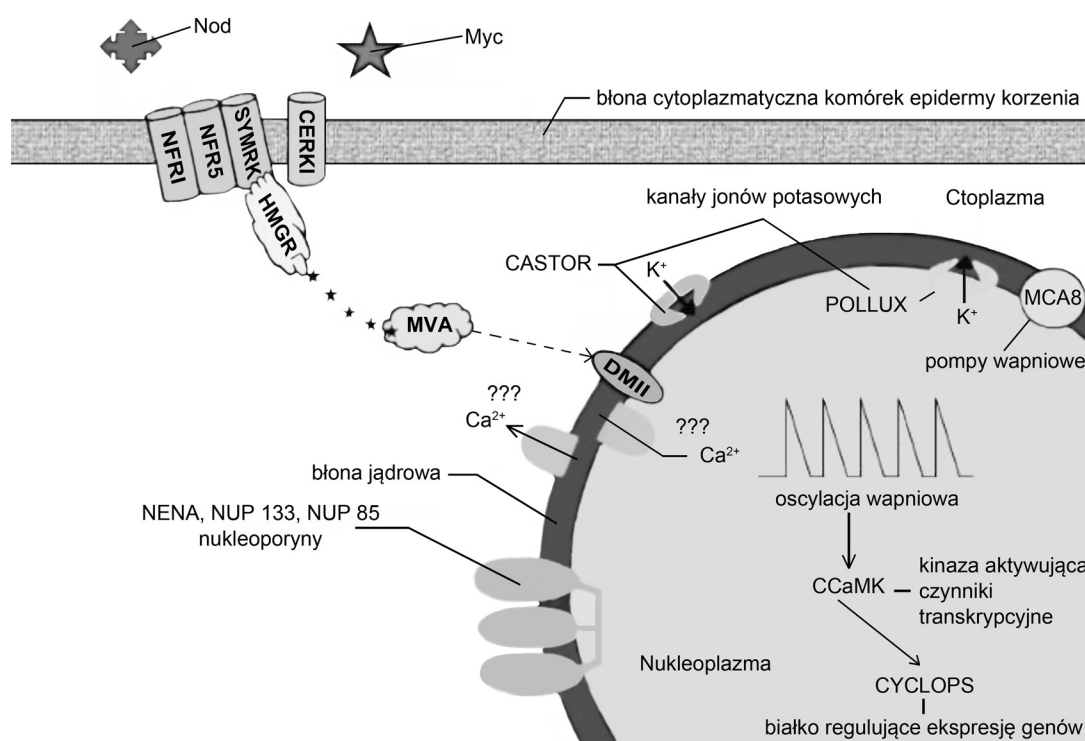
Rys. 2. Droga wnikania kielkujących strzępek grzybowych do wnętrza korzenia rośliny gospodarza

Kielkujący zarodnik grzyba wytwarza hyfopodium za pomocą którego przyczepia się do powierzchni epidermy korzenia rośliny-gospodarza. Kontakt hyfopodium z powierzchnią korzenia stymuluje w roślinie tworzenie się aparatów pre-infekcyjnych (AP), które wytyczają drogę wnikania strzępki grzybowej do wnętrza kory pierwotnej korzenia gospodarza [25].

ków fosforu uwalnia do ryzosfery strigolaktyny, które stymulują kiełkowanie zarodków i wzrost strzępek grzybów mykoryzowych. W początkowej fazie formowania się mykoryzy wierzchołki strzępek grzyba przemieszczają się wzdłuż powierzchni młodych korzeni bocznych rośliny-gospodarza poszukując odpowiedniego miejsca na infekcję. Po około trzech dniach strzępki grzyba powiększają swoją objętość i spłaszczają się tworząc na powierzchni komórek epidermy korzenia struktury zwane hyfopodiami [25] (Rys. 2). Kontakt hyfopodium z zewnętrzną warstwą komórek skórki korzenia gospodarza oraz rozpoznanie grzybowych cząsteczek sygnałowych uruchamia w roślinie ekspresję genów ENOD11. Prawdopodobnie kodują one białka bogate w prolinę biorące udział w procesie gromadzenia cytoplazmy podczas tworzenia aparatów pre-infekcyjnych (AP). Wyznaczają one drogę wnikania strzępki grzybowej z powierzchni do wnętrza komórek kory pierwotnej korzenia gospodarza, bez przerywania ciągłości błony plazmatycznej rośliny [3, 20]. Hyfopodia najprawdopodobniej stanowią formę przejściową dojrzałych appressoriów, z których po pewnym czasie wyrasta strzępka infekcyjna wnikająca do tkanek rośliny-gospodarza. Wewnątrz komórek kory pierwotnej korzenia strzępki grzyba tworzą silnie rozgałęzione arbuskule umożliwiające wymianę substancji odżywczych pomiędzy symbiontami [26].

### 4. Wymiana cząsteczek sygnałowych podczas formowania się mykoryzy arbuskularnej

Grzybowy czynnik MycF zostaje rozpoznany przez białkowe receptory NFR1 i NFR5 zlokalizowane w błonie plazmatycznej komórek włóśników korzeniowych (Rys. 3). Należą one do grupy zewnątrz błonowych kinaz receptorowych z motywem lizyny (LysM).



Rys. 3. Wspólny szlak sygnałowy w oddziaływaniach mikoryzowych i symbiotycznych relacjach bakterii *Rhizobium* z roślinami bobowatymi

Białka receptorowe NFR1, NFR2, SYMRK oraz CERK1 rozpoznają grzybowe (Myc) oraz bakteryjne (Nod) lipochitoooligosacharydy. SYMRK dodatkowo może oddziaływać z reduktazą 1 3-hydroksy-3-metyloglutarylo koenzymu A (HMGR1), co ma prawdopodobnie decydujące znaczenie dla procesu formowania się mikoryzy arbuskularnej oraz symbiozy *Rhizobium* i roślin bobowatych. Kwas mewalonowy (MVA) wytwarzany przy udziale reduktazy HMGR1 wydaje się, że może pełnić rolę wtórnego przekaźnika informacji pomiędzy błoną plazmatyczną i kanałem DMI1 zlokalizowanym w otoczce jądrowej rośliny-gospodarza [23, 39].

Wzajemne rozszyfrowanie sygnałów wysyłanych przez partnerów symbiozy aktywuje w roślinie-gospodarzu szlak sygnałowy nazywany powszechną ścieżką symbiotyczną (CSP), która przeprogramuje procesy zachodzące w roślinie i ma zasadnicze znaczenie dla ustanowienia mykoryzy oraz symbiozy bakterii *Rhizobium* z roślinami bobowatymi [4, 9]. NFR1 i NFR5 współdziałają z receptorową kinazą białkową SYMRK bogatą w powtórzenia leucynowe (LRR) zlokalizowaną w błonie komórki roślinnej. SYMRK jest również znana jako DMI2 znaleziona w *Medicago truncatula* oraz jako NORK odkryta w *Medicago sativa* [3, 7]. Badania genetyczne przeprowadzone na mutantach roślin pozbawionych kinazy SYMRK wykazały, że jest ona zdolna do rozpoznania grzybowych cząsteczek sygnałowych i przekazywania ich do wnętrza komórki. W cytoplazmie komórek włosników korzeniowych mutantów symrk traktowanych czynnikiem MycF nie odnotowano wzrostu stężenia jonów wapnia ( $Ca^{2+}$ ), jak to miało miejsce w roślinach typu dzikiego. Sygnatura wapniowa pełni kluczową rolę w szlaku transdukcji sygnału prowadzącego do ustanowienia symbiozy mykoryzowej. Jednak, jak dotąd, nie udało się zidentyfikować liganda kinazy SYMRK odpowiedzialnego za rozpoznanie, wiązanie i przenoszenie czynnika MycF

przez błonę komórki roślinnej do cytoplazmy. Prawdopodobnie SYMRK jest również kluczowym elementem wspierającym formowanie się symbiozy mykoryzowej poprzez ułatwienie grzybowi adaptacji do nowych warunków siedliskowych wewnątrz korzenia rośliny-gospodarza [16, 23]. Kolejnym elementem ścieżki sygnalizacyjnej niezbędnym w procesie kształtowania się symbiozy mykoryzowej jest receptorowa kinaza 1 elicytora chityny z motywem LysM (CERK1). Kinaza CERK1 zlokalizowana w błonie komórkowej atrichoblastów skórki korzenia rośliny-gospodarza rozpoznaje cząsteczki oligomerów chityny, tj. tetra-acetyl chito-tetraozę (CO4) uwalnianą przez grzyby mykoryzowe. CERK1 pełni rolę molekularnego przełącznika, który w zależności od rozszyfrowania rozpoznanych cząsteczek sygnałowych pochodzących od mikroorganizmów niepatogenicznych (MAMPs – Microbial Associated Molecular Patterns), jak również patogenów (PAMPs – Pathogen Associated Molecular Patterns), aktywuje w roślinie odpowiednio szlak reakcji symbiotycznych lub obronnych [18, 20, 33]. Błonowe kinazy receptorowe NFR1, NFR5, SYMRK oraz CERK1 działają wspólnie stanowiąc system monitorujący chemiczne i fizyczne cząsteczki sygnałowe docierające do powierzchni komórki. Wykrycie i ich właściwa identy-



fikacja umożliwia włączenie w roślinie odpowiednich mechanizmów prowadzących do aktywacji ekspresji genów zaangażowanych w przebieg odpowiedzi symbiotycznych lub obronnych [10, 37].

### 5. Kwas mewalonowy – wtórny przekaźnik częsteczek sygnałowych w mykoryzie arbuskularnej

Cytoplazmatyczna domena SYMRK dodatkowo oddziałuje z reduktazą 1 3-hydrokso-3-metyloglutarylo koenzymu A (HMGR1), kluczowym enzymem regulującym ścieżkę biosyntezy kwasu mewalonowego (MVA). Interakcja SYMRK z HMGR1, jak się obecnie wydaje, jest niezbędna do ustanowienia mykoryzowej relacji symbiotycznej oraz symbiozy bakterii brodawkowych i roślin bobowatych. Badania przeprowadzone na roślinach lucerny *M. truncatula* traktowanych odpowiednio czynnikiem MycF oraz Nod ujawniły, że MVA indukuje w ich jądrach komórkowych oscylacje jonów  $Ca^{2+}$  oraz ekspresję genów symbiotycznych. Wykonane analizy potwierdzają znaczącą rolę szlaku MVA w molekularnych mechanizmach kontrolujących ustanowienie wczesnych symbiotycznych odpowiedzi w komórkach korzeniowych roślin-gospodarzy. Choć wyniki badań nie są do dziś w pełni jednoznaczne, to jednak przypuszcza się, iż MVA może stanowić brakujący element CSP łączący początkowe etapy rozpoznania grzybowych cząsteczek sygnałowych przez kompleks błonowych białek receptorowych z późniejszą indukcją wzrostu cytoplazmatycznego stężenia jonów  $Ca^{2+}$  i ekspresją odpowiednich genów symbiotycznych w jądrze [10, 37] (Rys. 3). Rozpoznane czynniki MycF są przenoszone do kanału jonowego DMI1 zlokalizowanego w błonie jądrowej komórki rośliny-gospodarza. Pomimo przeprowadzenia licznych badań wciąż nie jest jasne, w jaki sposób następuje transport tych cząsteczek sygnałowych do DMI1. Prawdopodobna wydaje się więc być hipoteza, że w symbiotycznych szlakach transdukcji sygnału to właśnie MVA pełni rolę wtórnego przekaźnika informacji pomiędzy błoną komórki rośliny i kanałem DMI1. W ten sposób MVA byłby bezpośrednio odpowiedzialny za kontrolowanie komórkowego mechanizmu generującego cytoplazmatyczny sygnał wapniowy w odpowiedzi na grzybowe cząsteczki sygnałowe. Ponadto odbierane przez receptory sygnały mogą być wzmacniane, a następnie przekazywane do jądra za pomocą wewnątrzkomórkowych białek regulatorowych i efektorowych. Ich aktywność jest regulowana przez potranslacyjne modyfikacje, które mogą być przeprowadzane m.in. dzięki kinazom MAPKK (plant mitogen-activated protein kinase) [15, 36]. Detekcja przeniesionego przez MVA sygnału MycF do DMI1 prowadzi do aktywacji kanałów potasowych CASTOR i POLLUX zlo-

kalizowanych w błonie jądrowej (Rys. 3). W następstwie ich wzbudzenia jony potasowe ( $K^+$ ) wypływają z nukleoplazmy do cytoplazmy komórki powodując depolaryzację błony jądrowej. Nierównomierne rozmieszczenie jonów  $K^+$  pomiędzy zewnętrzną i wewnętrzną powierzchnią błony jądrowej reguluje aktywność, jak dotąd, nie zidentyfikowanych kanałów wapniowych bramkowanych napięciem powodując ich otwarcie i napływ jonów  $Ca^{2+}$  do nukleoplazmy. Białka CASTOR i POLLUX, jako przeciwne kanały jonowe, regulują zaburzenia równowagi elektrycznej ładunków jonów, dzięki czemu podtrzymują mechanizm uwalniania jonów  $Ca^{2+}$  z magazynów wapniowych, tj. przestrzeni otoczki jądrowej i retikulum endoplazmatycznego do wnętrza jądra komórkowego podczas sygnatury wapniowej [15, 23, 37]. Z kanałami jonowymi CASTOR i POLLUX, w procesie generowania cytoplazmatycznego sygnału wapniowego, współdziałają pompy wapniowe MCA8 zasilane ATP, umiejscowione w otoczce jądrowej. Sugeruje się, że MCA8 odpowiadają za wychwyt zwrotny jonów  $Ca^{2+}$  na końcu każdej fazy wzrostu w sygnaturze wapniowej i przywrócenie ich podstawowego stężenia w komórce jakie jest obserwowane przed jej stymulacją [10].

### 6. Kinaza białkowa CCaMK jako kluczowy element w ustanowieniu mykoryzy arbuskularnej

Następnym poznanym elementem szlaku CSP są trzy białka nazywane nukleoporynami: NUP133, NUP85 i NENA, należące do kompleksu porów jądrowych (Rys. 3). Obecnie nie jest precyzyjnie określona ich funkcja w symbiotycznej ścieżce transdukcji sygnału, jednak przypuszcza się, że odgrywają one znaczącą rolę w procesie generowania sygnatury wapniowej. Prawdopodobnie nukleoporyny mogą być zaangażowane w transport nieznanych jak do tej pory białek oraz przenikanie jeszcze niezidentyfikowanych wtórnych przekaźników niezbędnych do wzrostu stężenia jonów  $Ca^{2+}$  w nukleoplazmie. Wewnątrz jądra komórkowego jony  $Ca^{2+}$  wiążą się z kinazą białkową CCaMK (calcium-calmodulin-dependent protein kinase), która jest kluczowym elementem symbiotycznej ścieżki sygnałowej niezbędnym dla ustanowienia mykoryzy. Badania przeprowadzone na mutantach *M. truncatula* pozbawionych genu CCaMK wykazały, że rośliny te były niezdolne do formowania relacji mykoryzowej. Aktywność kinazowa CCaMK jest stymulowana stężeniem jonów  $Ca^{2+}$  występującym w nukleoplazmie. Białko to ma unikatową strukturę pozwalającą mu na wiązanie jonów  $Ca^{2+}$  poprzez dwa różne mechanizmy, tj. w sposób bezpośredni za pomocą motywu trzech dłoni EF wiążących wolne jony  $Ca^{2+}$  oraz pośredni dzięki domenie wiążącej kalmodulinę (CaM). CCaMK rozszyfrowuje

symbiotyczną sygnaturę wapniową i przekazuje odczytaną informację do jądrowego białka CYCLOPS. CcAMK w interakcji z CYCLOPS powoduje jego fosforylację. W jądrze komórkowym fosforylowane białko CYCLOPS jest odpowiedzialne za bezpośrednie regulowanie ekspresji genów, lub pośrednie poprzez oddziaływanie na czynniki transkrypcyjne NSP1, NSP2 oraz RAM1, promując kolonizację korzenia rośliny-gospodarza i proces mykoryzacji [10, 15, 17].

## 7. Podsumowanie

Ostatnie 20 lat badań prowadzonych nad symbiotycznymi związkami mutualistycznymi przyniosło częściowe wyjaśnienie mechanizmu nawiązywania kontaktu przez grzyby mykoryzowe z rośliną-gospodarzem. Jednak dopiero niedawno zidentyfikowano wspólne elementy szlaków sygnałowych regulujących mykoryzę oraz symbiozę roślin bobowatych z bakteriami *Rhizobium*. Analiza molekularnych podstaw symbiotycznego dialogu między partnerami pozwala na coraz lepsze poznanie różnych genów, białek i hormonów roślinnych odpowiedzialnych za ustanawianie relacji mykoryzowej. Strigolaktyny uwalniane przez korzenie roślin oraz chitoligosacharydy (COs) i lipochitoligosacharydy (LCOS), nazywane grzybowymi czynnikami MycF, wskazywane są jako najważniejsze cząsteczki zaangażowane w proces nawiązywania mykoryzy. Wymiana i odbiór tych cząsteczek sygnałowych stanowi specyficzny rodzaj komunikacji między partnerami i reguluje początkowy etap formowania się symbiozy mykoryzowej. Nowo odkryty enzym reduktaza 1, 3-hydroksy-3-metyloglutarylo koenzymu A (HMGR1) współdziała z receptorową kinazą białkową SYMRK i reguluje szlak biosyntezy kwasu mewalowego (MVA). Prawdopodobnie MVA jest brakującym wtórnym przekaźnikiem w symbiotycznej ścieżce sygnałowej oddziałującym z kanałem jonowym DMI1. Odkrycie nowych elementów ścieżki sygnałowej poszerza dotychczasową wiedzę i umożliwia lepsze zrozumienie molekularnych podstaw procesu mykoryzy. Obecne badania koncentrują się nad poszukiwaniem kolejnych elementów symbiotycznej ścieżki sygnałowej, którymi są kompleksy czynników transkrypcyjnych regulujące ekspresję genów w jądrze komórkowym rośliny-gospodarza podczas różnych etapów mykoryzy.

## Piśmiennictwo

- Akiyama K., Matsuzaki K., Hayashi H.: Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, **435**, 824–827 (2005)
- Berch S.M., Massicotte H.B., Tackaberry L.E.: Re-publication of a translation of 'The vegetative organs of *Monotropa hypopitys* L.' published by F. Kamiński in 1882, with an update on *Monotropa mycorrhizas*. *Mycorrhiza*, **15**, 323–332 (2005)
- Bonfante P., Genre A.: Mechanisms underlying beneficial plant – fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nat. Commun.* **1**, doi 10.1038/ncomms1046 (2010)
- Buendia L., Wang T., Girardin A., Lefebvre B.: The LysM receptor-like kinase SLYK10 regulates the arbuscular mycorrhizal symbiosis in tomato. *New Phytol.* **210**, 184–195 (2016)
- Ch.W. Dunk., Lebel T., Keane P.J.: Characterisation of ectomycorrhizal formation by the exotic fungus *Amanita muscaria* with *Nothofagus cunninghamii* in Victoria, Australia. *Mycorrhiza*, **22**, 135–147 (2012)
- Douds Jr.D.D., Pfeffer P.E., Shachar-Hill Y.: Carbon partitioning, cost, and metabolism of arbuscular mycorrhizas (w) Arbuscular mycorrhizas physiology and function, red. Y. Kapulnik, Jr.D.D. Douds, Springer Netherlands, Dordrecht, 2000, s. 107–129
- Endre G., Kereszt A., Kevei Z., Mihacea S., Kaló P., Kiss G.B.: A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature*, **417**, 962–966 (2002)
- Field K.J., Rimington W.R., Bidartondo M.I., Allinson K.E., Beerling D.J., Cameron D.D., Duckett J.G., Leake J.R., Pressel S.: First evidence of mutualism between ancient plant lineages (Haplomitriopsida liverworts) and Mucoromycotina fungi and its response to simulated Palaeozoic changes in atmospheric CO<sub>2</sub>. *New Phytol.* **205**, 743–756 (2015)
- File A.L., Klironomos J., Maherali H., Dudley S.A.: Plant kin recognition enhances abundance of symbiotic microbial partner. *PLoS ONE*, **7**, e45648 (2012)
- Genre A., Russo G.: Does a common pathway transduce symbiotic signals in plant-microbe interactions? *Front. Plant Sci.* **7**, doi 10.3389/fpls.2016.00096 (2016)
- Hawkins B.J., Jones M.D., Kranabetter J.M.: Ectomycorrhizae and tree seedling nitrogen nutrition in forest restoration. *New Forests*, **46**, 747–771 (2015)
- Helber N., Wippel K., Sauer N., Schaarschmidt S., Hause B., Requena N.: A versatile monosaccharide transporter that operates in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus* sp is crucial for the symbiotic relationship with plants. *Plant Cell*, **23**, 3812–3823 (2011)
- Kapulnik Y., Koltai H.: Strigolactone involvement in root development, response to abiotic stress, and interactions with the biotic soil environment. *Plant Physiol.* **166**, 560–569 (2014)
- Kheyrodin H.: Plant and Soil Relationship between Fungi. *IJRBS*, **2**, 42–49 (2014)
- Luginbuehl L., Oldroyd G.E.D.: Calcium signaling and transcriptional regulation in arbuscular mycorrhizal symbiosis (w) Molecular mycorrhizal symbiosis, red. F. Martin, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2016, s. 125–140
- Madsen E.B., Stougaard J.: Receptor Kinases Mediating Early Symbiotic Signalling (w) Receptor-like kinases in plants, red. F. Tax., B. Kemmerling, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2012, s. 93–107
- Miller J.B., Pratap A., Miyahara A., Zhou L., Bornemann S., Morris R.J., Oldroyd G.E.D.: Calcium/calmodulin-dependent protein kinase is negatively and positively regulated by calcium, providing a mechanism for decoding calcium responses during symbiosis signaling. *The Plant Cell*, **25**, 5053–5066 (2013)
- Miyata K., Nakagawa T. i wsp.: The bifunctional plant receptor, OsCERK1, regulates both chitin-triggered immunity and arbuscular mycorrhizal symbiosis in rice. *Plant Cell Physiol.* **55**, 1864–1872 (2014)
- Mohanta T.K., Bae H.: Functional genomics and signaling events in mycorrhizal symbiosis. *J. Plant Interact.* **10**, 21–40 (2015)

20. Nakagawa T., Imaizumi-Anraku H.: Rice arbuscular mycorrhiza as a tool to study the molecular mechanisms of fungal symbiosis and a potential target to increase productivity. *Rice (NY)*, **8**, doi 10.1186/s12284-015-0067-0 (2015)
21. Oehl F., Da Silva G.A., Goto B.T., Maia L.C., Sieverding E.: *Glomeromycota*: two new classes and a new order. *Mycotaxon*, **116**, 365–379 (2011)
22. Olsson P.A., van Aarle I.M., Gavito M.E., Bengtson P., Bengtson G.: <sup>13</sup>C Incorporation into signature fatty acids as an assay for carbon allocation in arbuscular mycorrhiza. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 2592–2599 (2005)
23. Parniske M.: Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbiosis. *Microbiology*, **6**, 763–775 (2008)
24. Patreze C.M., Moreira M., Tsai S.M.: Advances in molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi (phylum *Glomeromycota*) in forest ecosystems (w) Forest ecosystem – more than just trees, red. J.A. Blanco, Y.H. Lo, InTech, Rijeka, 2012, s. 53–80
25. Pawlowski M.L., Hartman G.L.: Infection mechanisms and colonization patterns of fungi associated with soybean (w) Fungal pathogenicity, red. S. Sultan, InTech, Rijeka, 2016, s. 25–43
26. Ramos A.C., Okorokova-Façanha A.L. i wsp.: An outlook on ion signaling and ionome of mycorrhizal symbiosis. *Braz. J. Plant Physiol.* **23**, 79–89 (2011)
27. Schüßler A., Walker C.: The Glomeromycota: a species list with new families and new genera. Gloucester, UK, 2010
28. Schüßler A., Walker Ch.: Evolution of the ‘Plant-Symbiotic’ fungal phylum (w) Evolution of fungi and fungal-like organisms, red. S. Pöggeler, J. Wöstemeyer, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2011, s. 163–185
29. Seto Y., Kameoka H., Yamaguchi S., Kyojuka J.: Recent advances in strigolactone research: chemical and biological aspects. *Plant Cell Physiol.* **53**, 1843–1853 (2012)
30. Smith A.M., Coupland G., Dolan L., Harberd N., Jones J., Martin C., Sablowski R., Amey A.: Plant biology. Garland Science, New York, 2009
31. Smith S.E., Read D.J.: Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, New York, 2008
32. Smith S.M.: What are strigolactones and why are they important to plants and soil microbes? *BMC Biol.* **12**, doi 10.1186/1741-7007-12-19 (2014)
33. Sun J., Oldroyd G.E.D. i wsp.: Activation of symbiosis signaling by arbuscular mycorrhizal fungi in legumes and rice. *Plant Cell*, **27**, 823–838 (2015)
34. Tahad M.M., Sijam K.: Mycorrhizal fungi and abiotic environmental conditions relationship. *Res. J. Environ. Sci.* **6**, 125–133 (2012)
35. Van der Heijden M.G.A., Martin F.M., Selosse M.A., Sanders I.R.: Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytol.* **205**, 1406–1423 (2015)
36. Van Ness L.K., Jayaraman D., Maeda J., Barrett-Wilt G.A., Sussman M.R., Ané J.M.: Mass spectrometric-based selected reaction monitoring of protein phosphorylation during symbiotic signaling in the model legume, *Medicago truncatula*. *PLoS ONE*, **11**, e0155460 (2016)
37. Venkateshwaran M., Ané J.M. i wsp.: A role for the mevalonate pathway in early plant symbiotic signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 9781–9786 (2015)
38. Zwanenburg B., Pospíšil T., Čavar Zeljkovic S.: Strigolactones: new plant hormones in action. *Planta*, **243**, 1311–1326 (2016)

Dominika Grondalska<sup>1\*</sup>, Wioletta Kmiecik<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej i Diagnostyki Mikrobiologicznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Wpłynęło w grudniu 2016 r.  
Zaakceptowano w maju 2017 r.

1. Wprowadzenie. 2. Zakażenia *Candida* spp. 3. Nowy patogen grzybiczy – *Candida auris*. 3.1. Epidemiologia i chorobotwórczość. 3.2. Problemy identyfikacyjne. 3.3. Czynniki chorobotwórczości. 3.4. Lekooporność szczepów *C. auris*. 4. Działania prewencyjne. 5. Podsumowanie

### *Candida auris* – emerging fungal pathogen

**Abstract:** In recent years, the incoming information about the emergence of new superbacteria and superviruses has been causing growing anxiety. However, also fungi are with increasing frequency reported as the sources of intercontinental microbiological hazards. According to the latest reports, quickly spreading, multidrug-resistant and difficult to identify yeast *Candida auris* may soon become the center of attention for clinicians, laboratory diagnosticians and the groups of advisers on the hospital-acquired infections, also in Poland. Unfortunately, the methods employed in routine microbiological diagnostics in the Polish medical laboratories cannot reliably identify this dangerous species. It is, therefore, necessary to implement measures to develop this field.

1. Introduction. 2. *Candida* spp. infections. 3. New fungal pathogen – *Candida auris*. 3.1. Epidemiology and pathogenicity. 3.2. Difficulties with identification. 3.3. Virulence factors. 3.4. Drug resistance of *C. auris*. 4. Preventive actions. 5. Summary

**Słowa kluczowe:** *Candida auris*, grzybnice, kandydozy

**Key words:** *Candida auris*, fungemia, candidiasis

## 1. Wprowadzenie

Wirus świńskiej grypy A/H1N1 [20], wirusy ptasiej grypy (H5N1, H7N9, H5N8) [16, 44], wirus Ebola [43, 44], wirus Zika [17], *Klebsiella pneumoniae* New Delhi [30], powrót *Bacillus anthracis* na Syberii [45] – to o tych patogenach coraz częściej słyszymy w ostatnim czasie w kontekście nowych, globalnych zagrożeń, którym stawić czoła muszą lekarze klinicyści, ale także diagnostycy laboratoryjni. W Polsce szczególnie niepokój wzbudziły zwłaszcza niedawne doniesienia o pojawieniu się i rozprzestrzenianiu odpornej na antybiotyki superbakterii *K. pneumoniae* New Delhi [12]. Ostatnimi czasy do szczególnie niebezpiecznych mikroorganizmów o istotnym klinicznie znaczeniu coraz częściej zalicza się także grzyby.

W Polsce wśród najczęstszych czynników etiologicznych zakażeń grzybiczych człowieka zalicza się najczęściej grzyby z rodzajów *Trichophyton* oraz *Microsporum*, a także *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Trichosporon*, *Geotrichum*. Zwykle zakażenia te charakteryzują się uciążliwym przebiegiem, ale w większości przypadków gatunki grzybów stanowiące ich przyczynę nie dorównują swoją zjadliwością szczepom bakteryjnym, dlatego też zakażenia grzybicze niejednokrotnie są postrzegane jako mniejsze zagrożenie w porównaniu z bakteryjnymi, a czasem wręcz lekceważone. Tymczasem ostatnio, zwłaszcza w środowisku szpitalnym, mamy do czy-

nienia z zakażeniami wywoływanymi grzybami wielolekoopornymi, które stanowią bezpośrednie zagrożenie życia pacjentów. Do najczęściej spotykanych czynników etiologicznych fungemii należą *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* [9].

## 2. Zakażenia *Candida* spp.

Grzyby z rodzaju *Candida* stanowią element mikrobioty jelit i jamy ustnej, jednak w sprzyjających okolicznościach, w przypadku wystąpienia określonych czynników mogą stać się źródłem grzybic o skomplikowanym przebiegu [43]. Grupę ryzyka najbardziej narażoną na kandydozy stanowią pacjenci poddawani długotrwałej hospitalizacji, w szczególności na oddziałach zabiegowych i intensywnej terapii (OIT). Pacjentami predysponowanymi do rozwoju tego typu infekcji są także osoby po lub w trakcie długotrwałej i szeroko-widmowej antybiotykoterapii przeciwbakteryjnej, ale także leczenia przeciwgrzybiczego czy po przebytych zakażeniach wirusowych, osoby z obniżoną odpornością, przewlekłymi chorobami towarzyszącymi, pacjenci w immunosupresji, z HIV/AIDS, poddawani inwazyjnym zabiegom leczniczym czy diagnostycznym [2, 11, 26, 40]. Gdy równowaga mikrobiologiczna organizmu zostaje zaburzona, otwierając wrota dla kolonizacji organizmu przez patogeny, często dochodzi do rozwoju zakażeń grzybiczych, które mogą przebiegać bezobja-

\* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej i Diagnostyki Mikrobiologicznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Pomorska 137, 90-235 Łódź; tel. 42 677 93 00; e-mail: dominika.grondalska@umed.lodz.pl

wowo lub powodować zróżnicowane manifestacje kliniczne – począwszy od zakażeń powierzchniowych, po układowe czy ogólnoustrojowe [41], zagrażające życiu pacjenta. Najczęstszym źródłem zakażeń grzybami z rodzaju *Candida* w Polsce jest gatunek *C. albicans*. Śmiertelność kandydoz nim wywołanych plasuje się na wysokim poziomie, np. u pacjentów z immunosupresją sięga ona rzędu 30–70% [40]. Coraz częściej z przypadków klinicznych izolowane są również inne gatunki, m.in. odporne na flukonazol *C. glabrata* i *C. krusei*, a także *C. parapsilosis* czy *C. tropicalis* [28, 31, 40].

### 3. Nowy patogen grzybiczy – *Candida auris*

Grzyby z gatunku *Candida auris* są filogenetycznie spokrewnione z gatunkami *C. haemulonii* oraz *C. guilliermondii*. Po raz pierwszy *C. auris* został zidentyfikowany w 2009 r. w Japonii, obecnie natomiast kolejne przypadki zakażeń wywołanych tym gatunkiem pojawiają się już na całym świecie. Nazwa gatunkowa tego taksonomu (łac. *auris* – ucho) odnosi się do miejsca izolacji, bowiem pierwsze izolaty pochodziły z przypadków infekcji ucha zewnętrznego u ludzi [36].

#### 3.1. Epidemiologia i chorobotwórczość

Ekspansja na kolejne tereny *C. auris* rozpoczęła się od Azji Wschodniej, a konkretnie Japonii i do 2014 r. szczepy tego gatunku izolowane były wyłącznie na terenach azjatyckich: w Korei Południowej jako czynnik etiologiczny grzybic układowych u chorych z zapaleniem płuc i pacjentów onkologicznych, poddawanych inwazyjnym zabiegom i długotrwałej antybiotykoterapii [26], kandydemii u pacjentów ze współistniejącymi schorzeniami przewlekłymi [11]. W Indiach opisano zakończony zgonem przypadek grzybiczego zapalenia osierdzia u pacjenta z przewlekłym schorzeniem wątroby [22]. W 2014 r. pojawiło się doniesienie o izolacji *C. auris* w Afryce Południowej, gdzie zidentyfikowany został w przypadkach inwazyjnej kandydemii [27] oraz w Azji Mniejszej (Kuwejt), gdzie stał się źródłem kandydemii w przewlekłej niewydolności nerek [14]. Rok 2015 przyniósł kolejne doniesienia izolacji *C. auris* z Pakistanu [7] i Indii, gdzie szczepy te powodowały zakażenia pochwy i sromu [24]. Do Ameryki Północnej (Stany Zjednoczone) *C. auris* dotarł w 2015 r. i izolowany był z przypadków inwazyjnej kandydemii u dzieci i dorosłych po inwazyjnych zabiegach i długotrwałej antybiotykoterapii [4]. W tym samym roku zakażenia wywołane tym gatunkiem grzyba zostały opisane również w Ameryce Południowej (Kolumbia, Wenezuela) [7]. Kathuria i wsp. sugerują, że infekcje wywoływane przez *C. auris* występowały na tych terenach już wcześniej, ale ze względu na trudności diag-

nostyczne grzyby te mogły być niewłaściwie zidentyfikowane [21]. W Europie pierwsze przypadki zakażeń *C. auris* stwierdzono w 2016 r. w Wielkiej Brytanii [34]. W związku z przebywaniem w tym kraju licznej mniejszości narodowości polskiej, może to stwarzać ryzyko szybkiej transmisji tego patogenu z Wysp Brytyjskich do Polski. Czynnikiem predestynującym do rozpowszechnienia tych zakażeń w naszym kraju będą też z pewnością: nadużywanie w leczeniu antybiotyków i chemioterapeutyków, szczególnie szerokowidmowych, a także podobnie jak w całej Europie – starzenie się społeczeństwa.

Grzyby gatunku *C. auris* mogą być przyczyną poważnych zakażeń ran oraz układów moczowego czy oddechowego, zakażeń ogólnoustrojowych, zwłaszcza u pacjentów cewnikowanych, a także u pacjentów ze współistniejącymi chorobami przewlekłymi (np. HIV/AIDS, cukrzyca) [26, 31].

Szczególne uwagę należy zwrócić na fakt szerokiego zakresu patogenności *C. auris*, gdyż szczepy tego gatunku, pierwotnie odpowiedzialne za infekcje uszu, w zaskakująco szybkim tempie zaczęły być izolowane także z przypadków poważnych grzybic układowych, zagrażających życiu pacjenta. Śmiertelność tych zakażeń jest wysoka, jednak ocena jej rzeczywistego wymiaru wydaje się trudna do określenia ze względu na inne schorzenia, często współistniejące u tych chorych. Jak podają Chawdry i wsp. śmiertelność w wyniku zakażeń *C. auris* wynosić może nawet 66% [11].

#### 3.2. Problemy identyfikacyjne

Identyfikacja mikologiczna nowego patogenu grzybiczego, jakim jest *C. auris*, stanowi ogromne wyzwanie diagnostyczne. W związku z niewystarczającą specyfikacją testów, może dochodzić do błędnej identyfikacji patogenu, a co za tym idzie, także niewłaściwej terapii. W tej sytuacji potrzebne jest zaktualizowanie wiedzy na ten temat, zarówno personelu medycznego (lekarze, diagnostów laboratoryjnych), jak również producentów testów diagnostycznych. Klasyczne metody dedykowane grzybom z rodzaju *Candida* mogą w tym przypadku okazać się niewystarczające. W testach biochemicznych fenotyp *C. auris* w znacznej mierze przypomina *C. haemulonii* [36], a szeroko dostępne, stosowane do rutynowej identyfikacji komercyjne testy jak dotąd nie pozwalają na wyodrębnienie gatunku *C. auris*, który jest błędnie zidentyfikowany jako *C. haemulonii*, *C. famata*, *Rhodotorula glutinis* czy *Saccharomyces cerevisiae* [21].

Makroskopowo na agarze Sabourauda z dekstrozą (SDA) *C. auris* wzrasta w postaci gładkich, kremowych kolonii, zaś na podłożu chromogennym CHROMagar Candida Medium (BD) kolonie przyjmują barwę różową. W preparatach mikroskopowych *C. auris* ma postać jajowatych, lekko wydłużonych komórek,

układających się pojedynczo lub parami. Na podłożu ryżowym z Tween 80 gatunek ten nie wytwarza pseudostrzępek po 96–192-godzinnej hodowli w temperaturze 28°C. *C. auris* wzrasta również w hodowli prowadzonej w temperaturze 37°C i 42°C. Te cechy odróżniają go od *C. haemulonii* i *C. duobshaemulonii*, które z kolei wytwarzają pseudostrzępki z blastokonidiami w temperaturze 28°C i nie wykazują wzrostu w temperaturze 42°C [21, 36].

Hodowla drobnoustroju oraz określenie jego cech fenotypowych stanowiące podstawę identyfikacji wymagają czasu, którego bardzo często brakuje w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej, zwłaszcza przy uwzględnieniu pogarszającego się stanu zdrowia pacjenta. Ze względu na brak szeroko dostępnych, wiarygodnych metod fenotypowych do szybkiej identyfikacji *C. auris*, jak również braku powszechnego dostępu do metod molekularnych, uzasadnione wydaje się przypuszczenie, że rzeczywista wykrywalność izolatów tego gatunku jest znacznie zaniżona. Lee i wsp. opisali przypadki błędnej identyfikacji *C. auris* przez systemy VITEC-2 i API 20c. W systemie VITEC-2 szczepy *C. auris* określane są jako *C. haemulonii* [26], natomiast system API 20c również nie jest w stanie sprostać prawidłowej identyfikacji gatunku *C. auris*, który jest błędnie oznaczany jako *Rhodotorula glutinis* [23]. Jak zauważono, cechami biochemicznymi, które mogą być pomocne w prawidłowej identyfikacji *C. auris* są asymilacja d-melecytozy (MLZ) i N-acetyloglukozaminy (NAG). U *C. auris* próba przyswajania MLZ jest dodatnia, zaś NAG ujemna, podczas gdy np. w przypadku *C. pseudohaemulonii* próby te dają odwrotne wyniki (próba MLZ jest ujemna, a NAG dodatnia) [26]. Podobnie przedstawia się próbę asymilacji bursztynianu i glukonianu (dodatnia dla *C. auris*, ujemna dla *C. haemulonii* i *C. duobshaemulonii* [21]. Na podstawie danych przedstawionych w tabeli I nie można jednoznacznie stwierdzić, aby cechy te (pokazane w oznaczonych wierszach) stanowiły wyróżniki warunkujące wiarygodną identyfikację *C. auris*. Autorzy publikacji dotyczących identyfikacji i różnicowania *C. auris* oraz gatunków podobnych nie są bowiem zgodni w kwestii wielu cech oznaczanych u analizowanych gatunków grzybów.

Producenci, wychodząc naprzeciw oczekiwaniom lekarzy i diagnostów, proponują coraz bardziej zaawansowane metody identyfikacji drobnoustrojów. Techniki biologii molekularnej (PCR, sekwencjonowanie RNA rybosomalnego) w coraz większym wymiarze znajdują zastosowanie w diagnostyce mikrobiologicznej. Według najnowszych doniesień prawidłowa identyfikacja gatunku *C. auris* jest możliwa z zastosowaniem metody MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight Analysis) [18, 19, 33] oraz technik molekularnych [4, 13, 33], które mimo wysokiej czułości i swoistości oraz coraz szerszego zastosowania

ciągle nie stanowią stałego elementu procedur rutynowej diagnostyki mikologicznej. MALDI-TOF wprowadzona po raz pierwszy w 1988 r. stanowi połączenie jonizacji próbki z pomiarem jej masy przy użyciu spektrometru masowego. Umożliwia identyfikację drobnoustroju, określenie jego wrażliwości na antybiotyki, jak również ocenę czynników wirulencji poprzez określenie profilu białkowego badanego drobnoustroju – niepowtarzalnego i charakterystycznego dla gatunku – a następnie porównanie go z bazą danych aparatu. Bazy danych dotyczące analizy białek, na których oparta jest metoda MALDI-TOF MS, są stale aktualizowane i poszerzane, aby wykonywana diagnostyka była nie tylko szybka, ale i jak najbardziej wiarygodna, co stanowi dodatkowy argument przemawiający za skutecznością aparatury wykorzystującej ten system identyfikacji [29]. Automatyczne spektrometry masowe produkowane przez Biomerieux i Bruker, przeznaczone do szybkiej identyfikacji drobnoustrojów, wykorzystujące technologię MALDI-TOF, jak donoszą Girard i wsp. oraz Prakash i wsp., mogą umożliwiać prawidłowe oznaczenie *C. auris* [19, 33]. Warunkiem prawidłowej identyfikacji szczepów tego gatunku jest jednak odpowiednia baza danych tych analizatorów obejmująca profil białkowy swoisty dla *C. auris*. W Polsce tylko nieliczne laboratoria diagnostyczne mające pracownię mikologiczną czy mikrobiologiczną prowadzącą diagnostykę mikologiczną są wyposażone w ten sprzęt.

### 3.3. Czynniki chorobotwórczości

Problemy, jakie nastroczają klinicyzom inwazyjne kandydozy (IC) zmuszają do dokładnego poznania mechanizmów rozwoju tych zakażeń. Grzyby z gatunku *C. auris* prezentują szereg cech umożliwiających skuteczną inwazję organizmu gospodarza, jak i ochronę komórek przed stosowaną terapią. Do głównych czynników warunkujących chorobotwórczość *C. auris* oraz sprzyjających rozwojowi zakażenia zalicza się enzymy hydrolityczne: proteazy aspartylowe, fosfolipazy oraz hemolizyny [24]. Chatterjee i wsp., analizując genom *C. auris* metodą sekwencjonowania jego fragmentów, ujawnili szereg innych czynników: lipaz, transporterów oligopeptydów, transferaz mannozylowych, czynników transkrypcyjnych czy białek rybosomalnych, które mogą mieć istotny wpływ na jego zjadliwość i oporność na leki [10]. Pozostała jeszcze nie scharakteryzowana część genomu może kryć jeszcze więcej informacji stanowiących o jej zjadliwości. Sharma i wsp. w swoich badaniach dotyczących porównania opisanej części genomu *C. auris* i genomu *C. albicans* wykazali obecność wspólnych dla obu gatunków czynników wirulencji. Zaliczają się do nich ortologi kodujące enzymy hydrolityczne, transportery jonowe, przenośniki aminokwasów i metabolitów oraz liczne adhezyny [38].

Tabela I  
Cechy fenotypowe *Candida auris* i gatunków podobnych

Cecha	<i>C. auris</i>	<i>C. haemulonii</i>	<i>C. duobshae- mulonii</i>	<i>C. pseudo- haemulonii</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. ruelliae</i>
Pseudostrzępki	- [36] [21]	+ [36] [21]	+ [21]	+ [36]	+ [1] [25]	+ [36]
Wzrost w 40°C	+ [36]	- [35]	BD	- [35] [5]	+ [1] NW <sup>[25]</sup>	+ [35] [5]
Wzrost w 42°C	+ [36] [21]	- [21] [35]	- [21]	- [35]	NW <sup>[1]</sup>	+ [35]
Wzrost w 37°C	+ [5] [36] [21]	OD <sup>[5]</sup>	+ [5]	+ [5]	+ [25]	BD
Wzrost w obecności 0.01% cykloheksimidu	- [36]	+ [35]	BD	NW <sup>[35]</sup>	+ [1] [25]	- [35]
Fermentacja cukrów						
Glukoza	+ [36]	+ [25]	BD	BD	+ [1] [25]	BD
Sacharoza	S <sup>[36]</sup> + [5]	+ [5] [25]	+ [5]	- [5]	Z <sup>[1]</sup> [25]	BD
Trehaloza	S <sup>[36]</sup>	+/S/OD <sup>[35]</sup> [25]	BD	- [35]	Z <sup>[1]</sup> [25]	- [35]
Galaktoza	- [36]	- [25]	BD	BD	Z <sup>[1]</sup> [25]	BD
Maltoza	- [36]	-/S/OD <sup>[35]</sup> [25]	BD	- [35]	+ [1] [25]	- [35]
Laktoza	- [36]	- [25]	BD	BD	- [1] [25]	BD
Rafinoza	- [36] [5]	- [5] [25] S/OD <sup>[35]</sup>	+ [5]	- [35] [5]	- [25]	- [35]
Asymilacja						
Glukoza	+ [36]	+ [25]	BD	BD	+ [1] [25]	BD
Sacharoza	+ [36]	+ [25]	BD	BD	+ [1] Z <sup>[25]</sup>	BD
Maltoza	+ [36]	+ [25]	BD	BD	+ [1] [25]	BD
D-trehaloza	+ [36]	+ [35] [25]	BD	- [35]	+ [1] Z <sup>[25]</sup>	+ [35]
D-rafinoza	+ [36]	+ [35]	BD	+ [35]	- [1] [25]	- [35]
D-melecytoza (MLZ)	+ [36] [5] [26]	+/O <sup>[5]</sup> + [25]	+ [5]	+ [5] - [26]	- [1] Z <sup>[25]</sup>	NW
Inulina	S <sup>[36]</sup> [5]	-/S <sup>[5]</sup> [25]	+ [5]	- [5]	- [25]	BD
Skrobia rozpuszczalna	+ [36]	- [35] [25]	BD	+ [35]	+ [1] [25]	- [35]
Rybitol	S <sup>[36]</sup>	OD <sup>[35]</sup> + [25]	BD	+ [35]	Z <sup>[1]</sup> [25]	+ [35]
Galaktytol	+ [36]	+/OD <sup>[35]</sup> - [25]	BD	BD	- [1] [25]	BD
D-mannitol	+ [36]	+ [25]	BD	BD	+ [1] [25]	BD
Sorbitol	+ [36]	BD	BD	BD	+ [1]	BD
Cytrynian	+ [36]	BD	BD	BD	+ [25]	BD
D-galaktoza	- [36] [5]	+ [5] [25]	+ [5]	+ [5]	+ [1] [25]	BD
L-sorboza	- [36] [5]	- [5] [25] V <sup>[35]</sup>	+ [5]	OD <sup>[35]</sup> + [5]	Z <sup>[25]</sup>	+ [35]
D-celobioza	- [36]	- [35] [25]	BD	- [35]	- [1] [25]	+ [35]
Laktoza	- [36]	- [25]	BD	BD	- [1] [25]	BD
Melibioza	- [36]	- [25]	BD	BD	- [25]	BD
D-ksyloza	- [36]	OD <sup>[35]</sup> - [25]	BD	OD <sup>[35]</sup>	+ [1] [25]	- [35]
L-arabinoza	- [36] [5]	- [35] [5] [25]	S <sup>[5]</sup>	Z <sup>[5]</sup>	Z <sup>[1]</sup> [25]	BD
D-arabinoza	- [36] [5]	- [5] [25]	Z <sup>[5]</sup>	Z <sup>[35]</sup> - [5]	Z <sup>[1]</sup> [25]	+ [35]
Ryboza	- [36]	OD <sup>[35]</sup> [25]	BD	+ [35]	Z <sup>[1]</sup> [25]	+ [35]
L-mannoza	- [36]	BD	BD	BD	- [1]	BD
D-glukozamina	- [36]	+ [35] [5] - [21]	BD	+ [35] [5]	Z <sup>[1]</sup> [25]	- [35]
N-acetyloglukozamina (NAG)	- [36] [26] + [21]	- [21]	- [21]	+ [26]	+ [1] Z <sup>[25]</sup>	NW
Metanol	- [36] [5]	S/- <sup>[5]</sup> - [25]	S/- <sup>[5]</sup>	- [5]	- [25]	BD
Etanol	- [36] [5]	+/NW <sup>[5]</sup> + S/OD <sup>[35]</sup> - [25]	S/NW <sup>[5]</sup>	OD <sup>[35]</sup> [5]	+ [25]	+ [35]
Glicerol	- [36] [5]	+ [5] [25]	+ [5]	+ [5]	Z <sup>[1]</sup> [25]	BD
Erytrytol	- [36]	- [25]	BD	BD	- [25]	BD
A-metyl-D-glukoza	- [36]	- [25]	BD	BD	Z <sup>[1]</sup> [25]	BD

Tabela I c.d.

Cecha	<i>C. auris</i>	<i>C. haemulonii</i>	<i>C. duobshae- mulonii</i>	<i>C. pseudo- haemulonii</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. ruelliae</i>
Salicyn	– [36]	Z <sup>[35]</sup> [25]	BD	– [35]	– [25]	+ [35]
D-glukonian	– [36] [5] + [21]	+ [5] – [21]	+ [5] – [21]	+ [5]	– [1] Z [25]	BD
DL-mleczan	– [36]	BD	BD	BD	NDA	BD
Bursztynian	– [36] [5] + [21]	+ [5] – [21]	+ [5] – [21]	+ [5]	+ [25]	NW
Inozytol	– [36]	BD	BD	BD	– [1] [25]	BD
Heksadekan	– [36]	BD	BD	BD	Z <sup>[25]</sup>	BD
2-keta-D-glukonian	– [36] [5]	BD	BD	BD	+ [1] [25]	BD
Ksylitol	– [36] [5]	S/+ /NW <sup>[5]</sup> OD <sup>[35]</sup>	+ [5]	+ [35] [5]	+ [1] Z [25]	+ [35]
Arbutyna	NW <sup>[5]</sup>	– [5]	+ [5]	NW <sup>[35]</sup> [5]	BD	+ [35]
L-ramnoza	– [5]	+ [5] [25]	S [5]	+ [5]	– [25]	BD
Źródło N						
Siarczan amonu	+ [36]	BD	BD	BD	BD	BD
Kadaweryna	+ [36]	BD	BD	BD	BD	BD
L-lizyna	+ [36]	BD	BD	BD	+ [25]	BD
Azotan sodu	– [36]	BD	BD	BD	BD	BD
Azotan potasu	– [36]	BD	BD	BD	BD	BD
Etylamina	– [36]	BD	BD	BD	+ [25]	BD

NW – nieustalony wynik, S – słaba reakcja, O – reakcja opóźniona, Z – reakcja zmienna, S/O – reakcja słaba i opóźniona, OD – opóźniona reakcja dodatnia, BD – brak danych

Wymienione elementy stanowią ważne ogniwo procesu kolonizacji i rozwoju zakażenia. Ich obecność wpływa także, jak uważają autorzy, na zdolność *C. auris* do tworzenia struktury biofilmu. Bytowanie w organizmie *C. auris* w postaci biofilmu może stanowić kolejny istotny problem terapeutyczny. Komórki *Candida* spp. otoczone matrix/słuzem są dodatkowo chronione przed działaniem antybiotyków, jak i komórek układu odpornościowego gospodarza. Oh i wsp. [32] w swoich badaniach nie potwierdzili wyników Chatterjee i wsp. [10], bowiem nie stwierdzili w badaniach *in vitro* wytwarzania struktury biofilmu przez *C. auris*. Porównywali oni szczepy od pacjentów hospitalizowanych w szpitalach w Korei Południowej: *C. haemulonii* i *C. pseudohaemulonii* izolowane z przypadków bakteriemii, które charakteryzowała wysoka zdolność do tworzenia biofilmu, ze szczepami *C. auris* izolowanymi z ucha zewnętrznego [32]. Dokładne poznanie biologii biofilmów tego gatunku z pewnością wymaga jednak dalszych analiz.

### 3.4. Lekooporność szczepów *C. auris*

Gatunek *C. auris* stanowi poważne wyzwanie dla lekarzy klinicyistów także ze względu na brak skutecznych metod leczenia. Wykazuje on oporność na dostępne preparaty przeciwgrzybicze nie tylko pierwszego rzutu, ale również „ostatniej szansy” – echinokandyny. Wiele szczepów tego gatunku cechuje wielo-

lekowa oporność (multidrug resistance, MDR), zaś wartości minimalnego stężenia hamującego (minimal inhibitory concentration, MIC) dla *C. auris* są podwyższone dla wszystkich trzech klas leków przeciwgrzybiczych [3, 4, 10, 11, 21, 33, 37]. Lee i wsp. w swoich badaniach wykazali u badanych szczepów *C. auris* wyższą oporność na flukonazol w porównaniu z innymi szczepami *Candida* spp. [26]. Podobnych spostrzeżeń dokonał Prakash i wsp. [33] oraz Khillan i wsp. [22]. Chowdhary i wsp. w przeprowadzonych przez siebie oznaczeniach obejmujących 15 szczepów określili lekooporność szczepów *C. auris* na następujących poziomach: flukonazol – 100%, worykonazol – 73%, flucytozyna – 47%. Wykazali przy tym dla 40% szczepów MIC dla kaspofunginy na poziomie  $\geq 1$   $\mu\text{g/ml}$  [11]. Mimo to echinokandyny wciąż są lekami z wyboru w terapii zakażeń wywołanych *C. auris*, natomiast w skrajnych przypadkach (zgodnie z zaleceniami CDC) stosowane są koktajle z różnych klas leków przeciwgrzybiczych w dawkach większych niż stosowane rutynowo [8]. Według Sharma i wsp. jedną z przyczyn oporności *C. auris* na szereg antybiotyków może być obecność transporterów ABC (ATP-binding cassette) i MFS (major facilitator superfamily) [38].

Zgodnie z wytycznymi CDC w przypadku zakażeń grzybiczych wywołanych przez *C. auris* przed podjęciem terapii zaleca się wykonanie mykogramu. Rekomenduje się także ponowne jego wykonanie w przypadku



braku skuteczności leczenia przeciwgrzybiczego w celu ewentualnej modyfikacji stosowanej terapii. Niepokojące są jednak doniesienia Khillan i wsp. o trudnościach w oznaczaniu lekooporności *C. auris*. Podobnie, jak w przypadku identyfikacji patogenu, oznaczanie lekooporności grzybów tego gatunku przy użyciu aparatu VITEC-2 oraz metodą wg zaleceń CLSI (The Clinical & Laboratory Standards Institute) może generować różne wyniki. Stanowi to realne zagrożenie dla pacjentów poddawanych terapii celowanej na podstawie różnych metod oznaczenia [22]. Kathurla i wsp. także wskazują na rozbieżności w wynikach oznaczania lekooporności uzyskanych trzema metodami: referencyjną CLSI, E-testem i przy użyciu aparatu VITEC-2 [21].

#### 4. Działania prewencyjne

W świetle ostatnich doniesień epidemiologicznych na temat nowego gatunku *C. auris* pojawia się konieczność pogłębienia badań dotyczących rozprzestrzeniania się szczepów tego gatunku w placówkach medycznych oraz w środowisku [4, 11], a także opracowanie w jak najbliższym czasie strategii działań prewencyjnych prowadzących do eliminacji zagrożeń mikrobiologicznych ze szczególnym uwzględnieniem patogenów mikrobiologicznych w środowisku szpitalnym oraz wśród personelu. W krajach, gdzie *C. auris* jest już obecny, grzyb ten stanowi poważny problem, a procedury ulegają zaostrzeniu. W Wielkiej Brytanii wprowadzone zostały zalecenia dla placówek służby zdrowia dotyczące prewencji i monitorowania zakażeń szpitalnych wywołanych przez *C. auris* [34]. Również w USA Centra Kontroli i Prewencji Chorób (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) wydały specjalne zalecenia mające na celu zwiększenie czujności wobec zakażeń wywołanych szczepami tego gatunku. Nacisk położony jest na izolację pacjentów zakażonych *C. auris*, minimalizację kontaktów z personelem medycznym oraz innymi pacjentami [6].

#### 5. Podsumowanie

Zakażenia grzybicze, mimo iż obarczone są często wysoką śmiertelnością [15], nadal nie są postrzegane jako istotne klinicznie czynniki etiologiczne chorób zakaźnych oraz przyczyna zgonów z nimi związanych. Mimo ogromnych postępów współczesnej medycyny zjawisko rozpowszechniających się zakażeń grzybiczych wciąż stanowi poważny problem, zarówno w kontekście zdrowotnym, epidemiologicznym, jak i ekonomicznym. *C. auris* jest tego najświeższym przykładem jako gatunek łatwo rozprzestrzeniający się, charakteryzujący się szeroką opornością na dostępne środki przeciwgrzybi-

cze oraz wyposażony w liczne czynniki chorobotwórczości. W tym kontekście pojawia się rzadko dotąd rozpatrywane ryzyko przekazywania genów oporności innym patogenom grzybiczym. Wszystkie te czynniki sprawiają, że *C. auris* stanowi znaczące zagrożenie dla zdrowia i życia ludzi. Wraz z odkryciem tego patogenu równolegle pojawił się problem skutecznej z nim walki. Ze względu na szybkie, międzykontynentalne rozprzestrzenianie się *C. auris*, należy wziąć pod uwagę prawdopodobne ryzyko jego transmisji także do Polski.

#### Piśmiennictwo

1. API 20c AUX, bioMerieux, instrukcja zestawu do identyfikacji drożdżaków (2007)
2. Ben-Ami R., Giladi M. i wsp.: Antibiotic exposure as a risk factor for fluconazole-resistant *Candida* bloodstream infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 2518–2523 (2012)
3. Britz E., Govender N.P.: Global emergence of a multi-drug resistant fungal pathogen. *South. African J. Infect. Dis.* **31**, 69–70 (2016)
4. Calvo B., Melo A.S.A., Perozo-Mena A., Hernandez M., Francisco E.C., Hagen F., Meis J.F., Colombo A.L.: First report of *Candida auris* in America: Clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia. *J. Infect.* **73**, 369–374 (2016)
5. Cendejas-Bueno E., Kolecka A., Alastruey-Izquierdo A., Theelen B., Groenewald M., Kostrzewa M., Cuenca-Estrella M., Gómez-López A., Boekhout T.: Reclassification of the *Candida haemulonii* complex as *Candida haemulonii* (*C. haemulonii* Group I), *C. duobushaemulonii* sp. nov. (*C. haemulonii* Group II), and *C. haemulonii* var. *vulnera* var. nov.: Three multiresistant human pathogenic yeasts. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 3641–3651 (2012)
6. Centers for Disease Control and Prevention. *Candida auris* Interim Recommendations for Healthcare Facilities and Laboratories., 08.12.2016, <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/recommendations.html> (20.12.2016)
7. Centers for Disease Control and Prevention. Clinical Alert to U.S. Healthcare Facilities-June 2016 – Global Emergence of Invasive Infections Caused by the Multidrug-Resistant Yeast *Candida auris*. 24.06.2016, <http://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/candida-auris-alert.html> (20.12.2016)
8. Centers for Disease Control and Prevention: *Candida auris* Questions and Answers. 04.11.2016, <http://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/candida-auris-qanda.html> (20.12.2016)
9. Chang A., Neofytos D., Horn D.: Candidemia in the 21<sup>st</sup> century. *Future Microbiol.* **3**, 463–472 (2008)
10. Chatterjee S., Alampalli S.V., Nageshan R.K., Chettiar S.T., Joshi S., Tatu U.S.: Draft genome of a commonly misdiagnosed multidrug resistant pathogen *Candida auris*. *BMC Genomics*, **16**, 686 (2015)
11. Chowdhary A., Meis J. F. i wsp.: Multidrug-resistant endemic clonal strain of *Candida auris* in India. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **33**, 919–926 (2014)
12. Czekał T., Ciszewski M.: *Klebsiella pneumoniae* NDM – nowa superbakteria. *Med. Rodz.* **1**, 23–27 (2015)
13. De Almeida J. N., Bernard G. i wsp.: *Candida haemulonii* complex species, Brazil, January 2010–March 2015. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 561–563 (2016)
14. Emara M., Ahmad S., Khan Z., Joseph L., Al-obaid I., Purohit P., Bafna R.: *Candida auris* candidemia in Kuwait, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 1091–1092 (2015)

15. Enoch D.A., Yang H., Aliyu S.H., Micallef C.: The changing epidemiology of invasive fungal infections: new threats. *Int. J. Antimicrob. Ag.* **27**, 3–6 (2006)
16. Fan S., Zhou L., Wu D., Gao X., Pei E., Tianhou W., Yuwei G., Xianzhu X.: A novel highly pathogenic H5N8 avian influenza virus isolated from a wild duck in China. *Influenza Other Respi. Viruses*, **8**, 646–653 (2014)
17. Fauci A.S., Morens D.M.: Zika virus in the Americas – yet another arbovirus threat. *N. Engl. J. Med.* **363**, 1–3 (2010)
18. Ghosh A.K., Paul S., Sood P., Rudramurthy S.M., Rajbanshi A., Jillwin T.J., Chakrabarti A.: Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the rapid identification of yeasts causing bloodstream infections. *Clin. Microbiol. Infect.* **21**, 372–378 (2015)
19. Girard V., Mailler S., Chetry M., Vidal C., Durand G., Girard V., VanBelkum A., Colombo A.L., Hagen F., Meis J.F., Chowdhary A.: Identification and typing of the emerging pathogen *Candida auris* by matrix-assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry. *Mycoses*, **59**, 535–538 (2016)
20. Ilyicheva T., Abdurashitov M., Durymanov A., Suslopov I., Goncharova N., Kolosova N., Mikheev V., Ryzhikov A.: Herd immunity and fatal cases of influenza among the population exposed to poultry and wild birds in Russian Asia in 2013–2014. *J. Med. Virol.* **88**, 35–44 (2016)
21. Kathuria S., Singh P. K., Sharma C., Prakash A., Masih A., Kumar A., Meis J.F., Chowdhary A.: Multidrug-resistant *Candida auris* misidentified as *Candida haemulonii*: Characterization by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and DNA sequencing and its antifungal susceptibility profile variability by Vitek 2, CLSI Broth Microdilution, and E-test method. *J. Clin. Microbiol.* **53**, 1823–1830 (2015)
22. Khillan V., Rathore N., Kathuria S., Chowdhary A.: A rare case of breakthrough fungal pericarditis due to fluconazole-resistant *Candida auris* in a patient with chronic liver disease. *JMM Case Reports*, **1**, 1–5 (2014)
23. Kim M., Ryang D.W. i wsp.: *Candida haemulonii* and closely related species at 5 university hospitals in Korea: identification, antifungal susceptibility, and clinical features. *Clin. Infect. Dis.* **48**, e57–61 (2009)
24. Kumar D., Banerjee T., Pratap C.B., Tilak R.: Itraconazole-resistant *Candida auris* with phospholipase, proteinase and hemolysin activity from a case of vulvovaginitis. *J. Infect. Dev. Ctries.* **9**, 435–437 (2015)
25. Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T.: Summary of species characteristics (w) The yeasts: a taxonomic study, Elsevier, 2011, s. 223–278
26. Lee W.G., Shin J.H., Uh Y., Kang M.G., Kim S.H., Park K.H., Jang H.: First three reported cases of nosocomial fungemia caused by *Candida auris*. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 3139–3142 (2011)
27. Magobo R.E., Corcoran C., Seetharam S., Govender N.P.: *Candida auris* – associated candidemia, South Africa. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 1250–1251 (2014)
28. Marchlik W.D., Kurnatowski P.: Grzyby jako czynniki etiologiczne zakażeń szpitalnych. *Otolaryngologia*, **9**, 50–54 (2010)
29. Mimica M.J., Martino M.D.V., Pasternak J.: MALDI-TOF MS in the clinical microbiology laboratory. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* **49**, 256–259 (2013)
30. Mochon A.B., Garner O.B., Hindler J.A., Krogstad P., Ward K.W., Lewinski M.A., Rasheed J.K., Anderson K.F., Limbago B.M., Humphries R.M.: New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM-1)-producing *Klebsiella pneumoniae*: Case report and laboratory detection strategies. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 1667–1670 (2011)
31. Nigar I., Tarafder S., Razzak Khan R., Ahmed S.M.A., Abu Saleh A.: Species identification of *Candida* isolated from clinical specimens in a tertiary care hospital. **9**, 20–25 (2016)
32. Oh B.J., Shin J.H., Kim M.N., Sung H., Lee K., Joo M.J., Shin M.G., Suh S.P., Ryang D.W.: Biofilm formation and genotyping of *Candida haemulonii*, *Candida pseudohaemulonii*, and a proposed new species (*Candida auris*) isolates from Korea. *Med. Mycol.* **49**, 98–102 (2011)
33. Prakash A., Sharma C., Singh A., Kumar Singh P., Kumar A., Hagen F., Govender N. P., Colombo A.L., Meis J.F., Chowdhary A.: Evidence of genotypic diversity among *Candida auris* isolates by multilocus sequence typing, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and amplified fragment length polymorphism. *Clin. Microbiol. Infect.* **22**, e1–9 (2016)
34. Public Health England, Research and analysis – HPR. *Candida auris* identified in England., 01.07.2016, <http://www.gov.uk/government/publications/candida-auris-emergence-in-england/candida-auris-identified-in-england> (20.12.2016)
35. Saluja P., Prasad G.S.: *Candida rueliae* sp. nov. a novel yeast species isolated from flowers of *Ruellia* sp. (*Acanthaceae*). *FEMS Yeast Res.* **8**, 660–666 (2008)
36. Satoh K., Makimura K., Hasumi Y., Nishiyama Y., Uchida K., Yamaguchi H.: *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol. Immunol.* **53**, 41–44 (2009)
37. Sharma C., Kumar N., Meis J.F., Pandey R., Chowdhary A.: Draft genome sequence of a fluconazole-resistant *Candida auris* strain from a candidemia patient in India. *Genome Announc.* **3**, e00722–715 (2015)
38. Sharma C., Kumar N., Pandey R., Meis J.F., Chowdhary A.: Whole genome sequencing of emerging multidrug resistant *Candida auris* isolates in India demonstrates low genetic variation. *New Microbes New Infect.* **13**, 77–82 (2016)
39. Spengler J.R., Ervin E.D., Towner J.S., Rollin P.E., Nichol S.T.: Perspectives on West Africa Ebola virus disease outbreak, 2013–2016. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 956–963 (2016)
40. Staniszevska M., Bondaryk M., Kowalska M., Magda U., Łuka M., Ochal Z., Kurzątkowski W.: Patogeneza i leczenie zakażeń *Candida* spp. *Post. Mikrobiol.* **53**, 229–240 (2014)
41. Traboulsi R, Ghannoum M.A.: Antifungal therapy, CRC Press Book, 2009, s. 278–292
42. Ullmann A.J., Cuenca-Estrella M. i wsp.: ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: adults with haematological malignancies and after haematopoietic stem cell transplantation (HCT). *Clin. Microbiol. Infect.* **18**, 53–67 (2012)
43. Vallabhaneni S., Mody R.K., Walker T., Chiller T.: The global burden of fungal diseases. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **30**, 1–11 (2016)
44. Wu J., Liu L., Wang G., Lu J.: One Health in China. *Infect. Ecol. Epidemiol.* **1**, 1–8 (2016)
45. “Zombie” anthrax outbreak in Siberia: How does it kill? 02.08.2016, <http://www.livescience.com/55621-zombie-anthrax-kills-in-siberia.html> (20.12.2016)

Alicja Wysocka<sup>1</sup>, Agata Olszyna<sup>1</sup>, Iga Komorowska<sup>1</sup>, Magdalena Popowska<sup>1\*</sup>

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

Wpłynęło w styczniu 2017 r.  
Zaakceptowano w marcu 2017 r.

1. Wprowadzenie. 2. Charakterystyka nitrozwiązków aromatycznych. 2.1. Właściwości chemiczne i synteza nitroarenów. 2.2. Syntetyczne nitrozwiązki aromatyczne. 3. Nitrozwiązki aromatyczne w środowisku. 4. Zagrożenia związane z nitrozwiązkami aromatycznymi. 5. Biodegradacja nitrozwiązków aromatycznych. 5.1. Mikrobiologiczna degradacja związków aromatycznych. 5.1.1. Degradacja tlenowa (aerobowa). 5.1.2. Redukcyjny rozkład nitroarenów. 5.1.2.1. Rozkład beztlenowy (anaerobowy). 5.1.3 Degradacja nitrobenzenu – przykład alternatywnych ścieżek rozkładu. 6. Bioremediacja. 6.1 Bioremediacja związków nitroaromatycznych – przykłady realizacji. 6.1.1. Bioremediacja inżynierska *in situ*. 6.1.2. Bioremediacja inżynierska *ex situ*. 6.2. Ograniczenia procesu bioremediacji i strategię ich przewyższania. 7. Podsumowanie

#### Nitroaromatic compounds – characteristics and methods of biodegradation

**Abstract:** Nitroaromatic compounds are present in the environment mainly as industry products. They pose a serious risk to our health (often exhibiting strong mutagenic and carcinogenic effect) as well as to the environment. Most of the nitroaromatic compounds are stable due to considerable resistance to degradation and they persist in the environment for a long time. In this review, we present the current state of knowledge concerning biodegradation of nitroaromatic compounds. In the first part, general information regarding their properties, synthesis and sources as well as pathways of microbial aerobic or anaerobic degradation are described. In some cases microorganisms have evolved several pathways of degradation specific nitrocompound, for instance nitrobenzene, which we describe in detail. The second part of the publication focuses on environmental bioremediation of nitrocompounds.

1. Introduction. 2.2. Characteristics of aromatic nitrocompounds. 2.1. Chemical properties and synthesis nitroarenes. 2.2. Synthetic aromatic nitrocompounds. 3. The aromatic nitrocompounds in the environment. 4. Risks related to aromatic nitrocompounds. 5. Biodegradation of aromatic nitrocompounds. 5.1. Microbial degradation of aromatic compounds. 5.1.1. Aerobic degradation. 5.1.2. Reductive degradation nitroarenes. 5.1.2.1. Anaerobic digestion. 5.1.3 Degradation of nitrobenzene – an example of alternative distribution pathway. 6. Bioremediation. 6.1. Bioremediation of aromatic nitro compounds – examples of implementation. 6.1.1. Bioremediation engineering *in situ*. 6.1.2. Bioremediation engineering *ex situ*. 6.2. Limitations of the bioremediation process and strategies to overcome them. 7. Summary

**Słowa kluczowe:** nitrozwiązki aromatyczne, środowisko naturalne, mikroorganizmy, biodegradacja, bioremediacja

**Key words:** aromatic nitrocompounds, the natural environment, microorganisms, biodegradation, bioremediation

## 1. Wprowadzenie

Występowanie związków nitroaromatycznych (nitroarenów) w środowisku jest w znacznej mierze konsekwencją działalności człowieka. Powstają one w wyniku niepełnego spalania paliw kopalnych oraz reakcji nitrowania. Stanowią ważną klasę chemikaliów przemysłowych, są powszechnie stosowane w produkcji m.in. barwników, polimerów, środków ochrony roślin, farmaceutyków, materiałów wybuchowych i innych [18]. Związkom tym nadano 3. stopień ryzyka, najwyższy stopień zagrożenia i toksyczności [87]. Wykazano, że większość z nich wykazuje właściwości mutagenne i kancerogenne dla człowieka oraz stanowi poważne zagrożenie dla środowiska [97]. Niestety, szerokie spektrum zastosowań nitroarenów w połączeniu z odpornością na degradację doprowadziły do ich akumulacji w środowisku naturalnym prowadząc do skażeniem gleby, wód gruntowych oraz atmosfery [60].

Wykorzystanie zdolności żywych organizmów do asymilacji i rozkładu ksenobiotyków, w tym nitroare-

nów, jest obecnie najbardziej skuteczną i ekonomicznie opłacalną metodą usuwania tych zanieczyszczeń ze środowiska. Mikroorganizmy (zwłaszcza bakterie) odgrywają w tym procesie decydującą rolę [86]. Bakterie z zanieczyszczonych środowisk szybko adoptują się do obecności chemikaliów poprzez modyfikację już istniejących bądź wykształcenie nowych dróg ich metabolizmu.

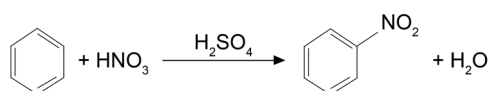
W niniejszej pracy przedstawiono charakterystykę związków nitroaromatycznych, dokonano przeglądu technik bioremediacyjnych wykorzystywanych do oczyszczenia wód i gruntów nimi skażonych oraz przedstawiono przykłady ich wykorzystania.

## 2. Charakterystyka nitrozwiązków aromatycznych

### 2.1. Właściwości chemiczne i synteza nitroarenów

Związki nitroaromatyczne posiadają co najmniej jedną grupę nitrową (-NO<sub>2</sub>) dołączoną do pierścienia aromatycznego. W zdecydowanej większości są to

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



Rys. 1. Reakcja nitrowania benzenu z wykorzystaniem mieszaniny nitrującej

związki otrzymywane syntetycznie, chociaż zidentyfikowano kilka produktów biologicznych, które można zaliczyć do grupy nitroarenów [46].

Nitrowanie jest głównym typem reakcji wykorzystywanym w przemysłowej syntezie tych związków. Polega ono na wprowadzeniu grupy nitrowej do pierścienia aromatycznego. W tym celu używana jest mieszanina nitrująca, w skład której wchodzi dwa kwasy – azotowy oraz siarkowy. W ich obecności dochodzi do wytworzenia kationu nitroniowego ( $+\text{NO}_2$ ) o silnych właściwościach elektrofilowych. Ulega on substytucji elektrofilowej do pierścienia aromatycznego [59]. Przebieg reakcji przedstawiono na przykładzie nitrowania benzenu (rys. 1).

Reakcji nitrowania na skalę przemysłową poddawane są m.in. benzen, chlorobenzen, anilina, fenol, toluen, naftalen. W zależności od warunków prowadzenia procesu można otrzymać mono-, di- oraz polinitropochodne arenów, gdzie grupa nitrowa znajduje się w pozycji *orto*, *meta* lub *para* [42].

## 2.2. Syntetyczne nitrozwiązki aromatyczne

Właściwości chemiczne grupy nitrowej sprawiły, że związki nitroaromatyczne wykorzystywano do produkcji wysokoenergetycznych **materiałów wybuchowych** (1,3,5-trinitrofenol, 2,4,6-trinitrotoluen). Wykorzystywane są również do produkcji szerokiej gamy **pestycydów** (insektycydów, herbicydów, fungicydów itp.). Ponadto, wiele **leków** wywodzi się od nitrozwiązków aromatycznych. Przykładowo, paracetamol sprzedawany bez recepty jako środek przeciwbólowy i przeciwgorączkowy, produkowany jest na drodze jednostopniowej redukcji acetamidacji *p*-nitrofenolu [9]. Związki nitroaromatyczne (głównie aniliny) znalazły zastosowanie w produkcji szerokiej gamy **środków chemicznych** (pianki poliuretanowe, gumy, barwniki azowe, chemikaliów fotograficzne, lakiery) [101]. W Tabeli I przedstawiono przemysłowe zastosowanie głównych klas nitrozwiązków aromatycznych z uwzględnieniem ich wpływu na organizmy żywe oraz w Tabeli II wpływ nitroarenów na wybrane organizmy na przykładzie nitrobenzenu.

## 3. Nitrozwiązki aromatyczne w środowisku

Nitroareny mogą powstawać w wodach, powietrzu atmosferycznym i glebach. W środowiskach wodnych, światło słoneczne katalizuje reakcje nitrowania i halogenowania naturalnie występujących związków.

Naświetlanie wody morskiej zawierającej fenol prowadzi do produkcji nie tylko 2- i 4-nitrofenolu, ale również chlorofenoli i bromofenoli [15]. W powietrzu, węglowodory uwolnione na skutek procesów spalania i niepełnego spalania paliw kopalnych służą jako substraty do nitrowania w reakcji z atmosferycznym dwutlenkiem azotu [72].

Większość ze znanych nitrozwiązków aromatycznych stanowią syntetycznie otrzymane związki chemiczne. Zidentyfikowano również nitroareny będące produktami aktywności metabolicznej różnych grup bakterii, grzybów i roślin. Podobnie jak w przemyśle, biosynteza nitroarenów może zachodzić na drodze substytucji elektrofilowej (rozdz. 2.1) bądź przy udziale wyspecjalizowanych enzymów N-oksygenaz na drodze bezpośredniego utlenienia [110].

Mikroorganizmy produkują związki z tej grupy na drodze metabolizmu wtórnego. Wiele bakterii z rodzaju *Streptomyces* jest znanych z produkcji antybiotyków. Niektóre z nich zawierają nitroaromatyczne komponenty (np. chloramfenikol produkowany przez *Streptomyces venezuelae*). Wybrane bakterie Gram-ujemne (m.in. szczepy *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Coralloccoccus exiguus*, *Cystobacter ferrugineus*, *Myxococcus fulvus*, *Enterobacter agglomerans*) produkują pyrrolnitrin, chloronitroaromatyczny metabolit o aktywności przeciwgrzybiczej [46]. Badania trufli *Stephanospora caroticolor* ujawniły, że syntetyzują one chloronitroaromatyczne związki. Pełnią one funkcję repelentów, gdyż warunkują intensywną barwę grzyba [63]. Nitrowanie aminokwasów aromatycznych jest też mechanizmem modyfikacji funkcjonalnej białek u ssaków [82].

## 4. Zagrożenia związane z nitrozwiązkami aromatycznymi

Związki nitroaromatyczne stanowią zagrożenie dla ludzi i innych organizmów (patrz tabela I i II). Na drodze metabolizmu nitroarenów często dochodzi do powstawania bardziej toksycznych pochodnych – hydroksyloamin. Wykazują one właściwości toksyczne oraz mutagenne wobec DNA. Podczas gdy toksyczność jest konsekwencją elektrofilowych właściwości tych związków, mutagenność to wynik reakcji z guaniną (mutacje punktowe) [19]. U ssaków, za transformację ksenobiotyków odpowiada flora bakteryjna przewodu pokarmowego. W zależności od enzymów uczestniczących w modyfikacji tych związków, pochodne mają właściwości bardziej toksyczne (rola bakteryjnych nitroreduktaz) lub mutagenne (acetylotransferaz) [1]. Ponadto, właściwości toksyczne są konsekwencją oddziaływania z innymi cząsteczkami np. aryloamin z oksyhemoglobina [67]. Związki nitroaromatyczne mogą oddziaływać z grupami tiolowymi białek, przez

Tabela I  
Charakterystyka wybranych grup nitrozwiązków aromatycznych – zastosowanie przemysłowe  
oraz wpływ na organizmy żywe

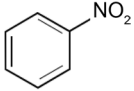
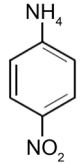
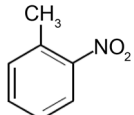
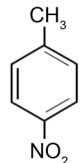
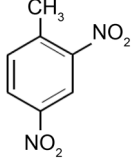
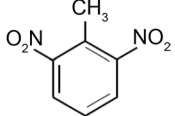
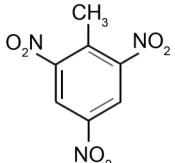
Nazwa związku	Struktura chemiczna	Zastosowanie przemysłowe	Wpływ na organizmy żywe
<b>Nitrobenzen</b> [C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> ]		<ul style="list-style-type: none"> <li>• produkcja 1,3-dinitrobenzenu, synteza innych związków organicznych</li> <li>• wyjściowy materiał do produkcji aniliny (min. 95% produkcji) [11]</li> <li>• rozpuszczalnik w rafinacji ropy naftowej oraz produkcji eterów celulozy, octanu celulozy [108]</li> <li>• główny półprodukt w syntezie: poliuretanów, lakierów, barwników, farb, kosmetyków oraz farmaceutyków</li> </ul> <p><u>Dawne wykorzystanie:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• przemysł spożywczy – substytut esencji migdałowych</li> <li>• rozpuszczalnik m.in. w: farbach drukarskich, atramencie, przyborach piśmienniczych</li> <li>• dodatek do środków dezynfekujących, perfum, mydeł, past do butów</li> <li>• zamiennik „aromatu kwiatowego”, intermediat barwników</li> <li>• stosowany w rafinacji olejów smarowych itd. [108]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• prowadzi do methemoglobinemii – upośledzenie przenoszenia tlenu [107]</li> <li>• uszkodzenie organów wewnętrznych m.in. śledziony i wątroby przy bezpośredniej ekspozycji</li> <li>• silne działanie neurotoksyczne [53]</li> </ul>
<b>p-nitroanilina</b> [C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]		<ul style="list-style-type: none"> <li>• półprodukt w produkcji barwników</li> <li>• zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym – produkcja Nitroquanilu (lek antymalariyczny) [11]</li> <li>• synteza azotowego barwnika Para Red [111]</li> <li>• przemysł włókienniczy – barwnik, trwale wiążący się z włóknem [70]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• methemoglobinemia</li> <li>• działanie rakotwórcze – podwyższone ryzyko zapadalności na raka pęcherza moczowego, gruczołu krokowego oraz cewki moczowej [51]</li> </ul>
<b>2-nitrotoluen</b>  <b>4-nitrotoluen</b> [C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> ]	 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• przemysł włókienniczy – produkcja barwników i wybielaczy</li> <li>• <b>2-nitrotoluen:</b> intermediat w przemyśle agrochemicznym [11]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2-nitrotoluen – methemoglobinemia</li> <li>• działanie mutagenne – indukcja dziedzicznych wad genetycznych</li> <li>• działanie kancerogenne – podwyższona zachorowalność na raka ludzi narażonych na długotrwały kontakt [21]</li> </ul>
<b>Dinitrotolueny</b> 2,4-dinitrotoluen  2,6-dinitrotoluen [C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> (NO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> ]	 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• produkcja elastycznych pianek poliuretanowych wykorzystywanych w przemyśle meblarskim i pościelowym</li> <li>• produkcja amunicji, materiałów wybuchowych, barwników, samochodowych poduszek powietrznych [21, 52]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• stwierdzono podwyższony poziom śmiertelności na choroby serca i układu naczyniowego u pracowników narażonych na bezpośredni kontakt z DNT</li> <li>• niekorzystny wpływ na układ nerwowy przy bezpośredniej ekspozycji organizmu [21, 52]</li> </ul>
<b>2,4,6-trinitrotoluen (TNT)</b> [C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> (NO <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> ]		<ul style="list-style-type: none"> <li>• materiał wybuchowy stosowany w amunicji wojskowej i cywilnej, górnictwie, kopalnictwie</li> <li>• substrat wieloskładnikowych materiałów wybuchowych [34]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• uszkodzenie wątroby oraz niedokrwistość</li> <li>• podrażnienie błon śluzowych</li> <li>• leukocytoza lub leukopenia, bóle mięśni, nieprawidłowości pracy serca i podrażnienie nerek [23]</li> </ul>

Tabela I c.d.

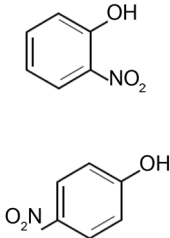
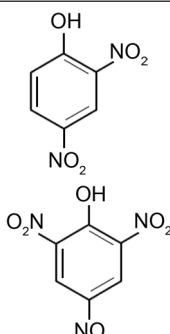
Nazwa związku	Struktura chemiczna	Zastosowanie przemysłowe	Wpływ na organizmy żywe
<b>Mononitrofenole</b> 2-nitrofenol (o-nitrofenol)  4-nitrofenol (p-nitrofenol) [C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>3</sub> ]		<ul style="list-style-type: none"> <li>• synteza barwników</li> <li>• wykorzystanie w produkcji wywoływarza fotograficznego</li> <li>• <b>p-nitrofenol</b> – produkcja środków owadobójczych oraz herbicydów (zwłaszcza w uprawach ryżu) [11]</li> <li>• synteza leków (acetaminofenu – substytut aspiryny) [78]</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• methemoglobinemia</li> <li>• podrażnienie dróg oddechowych (przy wdychaniu)</li> <li>• podrażnienie błon śluzowych jamy nosowej, gardła, przełyku, przewodu pokarmowego itd.</li> <li>• niebezpieczeństwo kumulacji w organizmie</li> <li>• działanie szkodliwe na organizmy wodne – długotrwałe niekorzystne zmiany w środowisku wodnym [54, 55]</li> </ul>
<b>Polinitrofenole</b> 2,4-dinitrofenol  2,4,6-trinitrofenol [C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ]		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>2,4-dinitrofenol</b> – substrat do produkcji antyseptyków i barwników</li> <li>• dodatek do materiałów wybuchowych</li> <li>• pestycyd [11]</li> <li>• <b>2,4,6-trinitrofenol</b> (tzw. kwas pikrynowy) – materiał wybuchowy stosowany w amunicji wojskowej oraz jako żółty barwnik jedwabiu (dawne zastosowanie)</li> <li>• pikrynian amonu – stosowany do trawienia szlifów na elementach stalowych [59]</li> </ul>	

Tabela II  
Toksyczność nitrobenzenu wobec organizmów

Organizm	Badany efekt	Czas ekspozycji [godz.]	Stężenie [mg/l]	Referencje
<i>Selenastrum capricornutum</i> (algi)	inhibicja wzrostu	96	43	[108]
<i>Scenedesmus obliquus</i> (sinice)	inhibicja wzrostu	48	67,7	[28]
<i>Ceriodaphnia dubia</i> (wioślarki)	śmiertelność	24	54	[28]
<i>Lymnaea stagnalis</i> (ślímak)	śmiertelność	24	116 (98–139)	[108]
<i>Brachydanio rerio</i> (ryby)	śmiertelność	96	113	[108]
<i>Culex pipiens</i> (komar)*	śmiertelność	48	70	[108]

W badaniach posłużono się testem EC<sub>50</sub> (half maximal effective concentration)

\* w tym eksperymencie wykorzystano test LD<sub>50</sub> (ang. median lethal dose)

co doprowadzają do ich inaktywacji [29]. Znane są przypadki bezpośredniego zakłócania procesów metabolicznych. 2,4-dinitrofenol czy kwas pikrynowy rozprzegają szlak przekazu elektronów w trakcie fosforylacji oksydacyjnej, czego konsekwencją jest inhibicja wytwarzania siły protonomotorycznej, a co z tym związane – produkcji ATP [40]. Ponadto, w trakcie ich rozkładu emitowane są toksyczne gazy m.in. tlenki azotu (NO<sub>x</sub>) [60]. Niektóre z nitrozwiązków aromatycznych zostały wymienione na liście zanieczyszczeń priorytetowych Amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska [24]. Są to m.in. *m*-, *p*-, *o*-nitroanilina, pochodne nitrobenzenu (chlorek nitrobenzoylu, nitrobenzotriazol, kwas siarkowy 3-nitrobenzenu, trifluorek 3-nitrobenzenu), 2-nitrofluoren.

Skutkiem powszechnego stosowania nitroarenów jest skażenie gleb i wód gruntowych. Rocznie do środowiska dostaje się 10 tys. ton nitrobenzenu [89]. W 2009 roku na terenie Stanów Zjednoczonych odnotowano 70 składników odpadów zawierających nitroaromatyczne materiały wybuchowe lub ich chemiczne prekursorzy [23]. Wytwarzanie, magazynowanie i używanie amunicji skażyło środowisko nitro arenami. Do wykrywania materiałów zalęgających w gruntach, mających specyficzne chemiczne właściwości spektralne, można wykorzystać urządzenia teledetekcyjne tj. lidar. Nitroaromatyczne materiały wybuchowe absorbują silnie promieniowanie ultrafioletowe, ale wykazują niską fluorescencję, więc bezpośrednio ich wykrywanie nie jest możliwe. Związki te można wykryć w glebie przy pomocy syn-

tetycznych polimerów, które wykazują zmiany fluorescencji w obecności materiałów wybuchowych.

Potencjalne zagrożenie dla środowiska stanowią również awarie w zakładach produkcyjnych wytwarzających lub/i wykorzystujących związki nitroaromatyczne. Najbardziej znany przypadek skażenia środowiska tymi chemikaliami, miał miejsce 13 listopada 2005 r., gdy eksplodowała jednostka nitrowania (stosowana w pierwszym etapie produkcji aniliny) w fabryce chemicznej w Chinach. Szacuje się, że około 100 ton benzenu i nitrobenzenu zostało przy tej okazji uwolnione do rzeki Songhua [62].

## 5. Biodegradacja nitrozwiązków aromatycznych

Zwiększony poziom świadomości organów zarządzających oraz społeczeństwa na temat zagrożeń związanych z wytwarzaniem, przetwarzaniem i składowaniem nitrozwiązków aromatycznych doprowadziły do wzrostu zainteresowania oraz rozwoju badań nad opracowaniem bezpiecznych technologii ich unieszkodliwiania i usuwania ze środowiska.

Znanych jest kilka konwencjonalnych metod neutralizacji omawianej klasy substancji: (foto-) utlenianie, hydroliza, parowanie, spalanie, adsorpcja itd. [48]. Metody fizykochemiczne posiadają jednak liczne wady i ograniczenia. Przykładowo, spalanie i procesy pogłębionego utleniania (AOPs) nie są ekonomicznie opłacalne ani bezpieczne ekologicznie [60]. Podczas filtracji, ekstrakcji i adsorpcji na żywicy, niepożądane związki są jedynie odseparowywane, jednak procesy te nie prowadzą to do ich degradacji.

Techniki biologiczne, takie jak bioremediacja i fitoremediacja stanowią alternatywę dla tradycyjnych metod usuwania ksenobiotyków ze środowiska [113]. Poszukiwania skutecznej biotechnologii usuwania nitrozwiązków (badania w szczególności skupiały się na TNT) zostały rozpoczęte już w latach 70. XX wieku.

### 5.1. Mikrobiologiczna degradacja związków aromatycznych

Związki nitroaromatyczne wykazują dużą stabilność w środowisku. Wynika to z faktu, że w dużych ilościach pojawiły się w nim wraz z rozpoczęciem przez człowieka działalności przemysłowej. Z ewolucyjnego punktu widzenia jest to wydarzenie stosunkowo niedawne. W konsekwencji, metaboliczne ścieżki ich rozkładu nie są bardzo powszechne w przyrodzie [79]. Opisano stosunkowo niewiele drobnoustrojów, które posiadają zdolność wykorzystywania nitroaromatycznych związków jako źródło azotu i/lub węgla i energii. Ponadto, wykazują one niskie tempo wzrostu, co jest

prawdopodobnie konsekwencją wysokiej toksyczności i słabej rozpuszczalności tych związków [83].

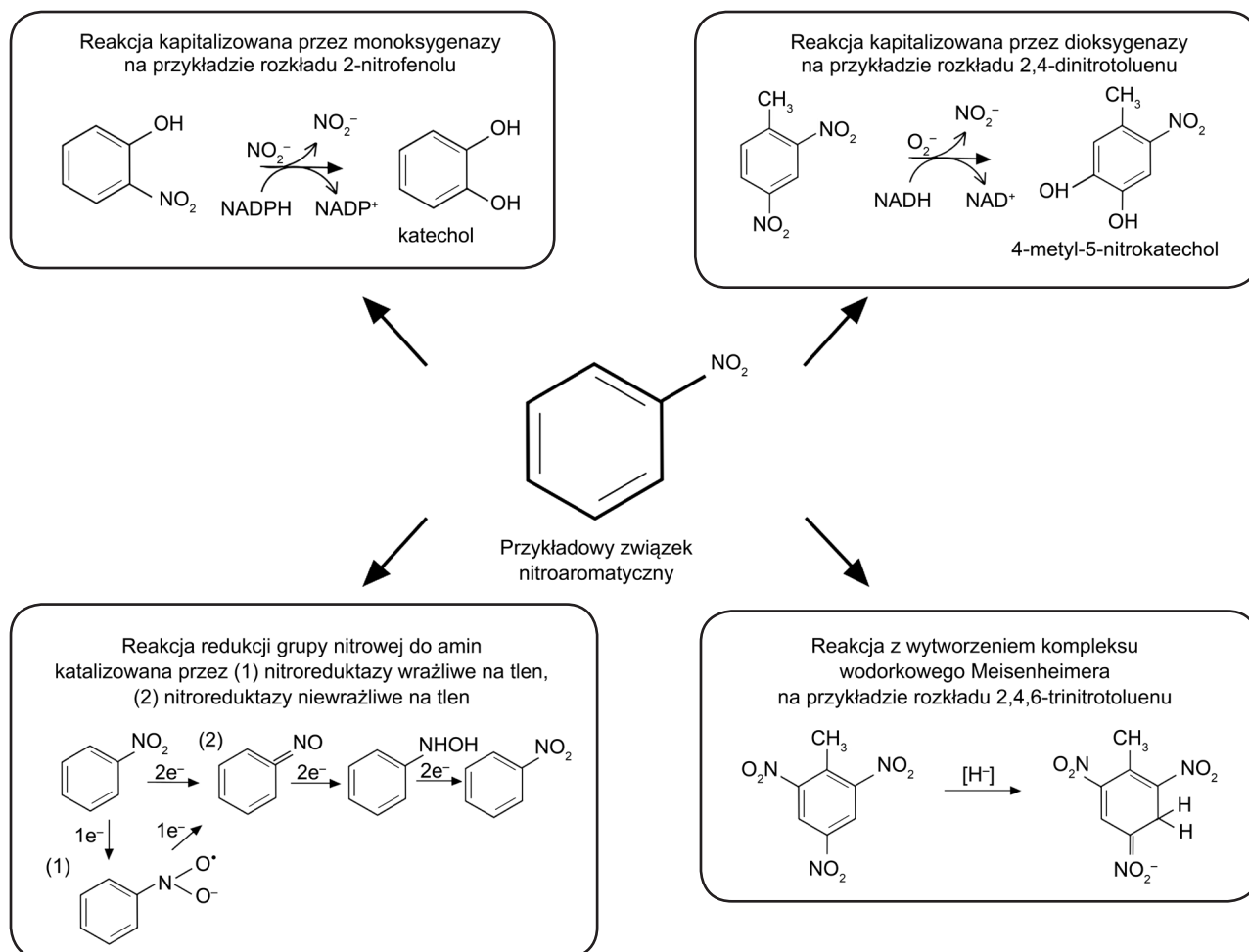
Wykazano, że odporność nitrozwiązków na biodegradację jest związana z obecnością w ich strukturze grup nitrowych. Utrudniają one elektrofilowy, atak tlenu na pierścień aromatyczny. Dodatkowy wpływ na stopień degradacji znitrowanych związków aromatycznych ma pozycja i rodzaj podstawników (*orto*-, *meta*-, *para*-) [60]. Jak w przypadku wszystkich arenów, problem stanowi również rozerwanie stabilnej struktury aromatycznej. Im więcej pierścieni, tym mniej podatny na degradację jest związek.

Asymilacja zanieczyszczeń organicznych obecnych w środowisku bytowania mikroorganizmów wpływa w istotny sposób na ich metabolizm. Pierwszy etap degradacji mikrobiologicznej związany jest indukcją syntezy i aktywacją aparatu enzymatycznego biorącego bezpośredni udział w procesie rozkładu lub modyfikacji zanieczyszczenia. Kluczowymi enzymami zaangażowanymi w degradację i przemiany ksenobiotyków aromatycznych są mono- oraz dioksygenazy [95]. W konsekwencji aktywności tych enzymów może dojść do rozszczepienia pierścienia aromatycznego, na skutek czego związki hydrofobowe przekształcane są w formy łatwiej przyswajalne przez mikroorganizmy [113]. Pierwotnie uważano, że katabolizm takich związków jest wyłącznie procesem tlenowym, w którym tlen molekularny jest substratem towarzyszącym, wykorzystywanym do zainicjowania ataku i rozerwania cyklicznej struktury. Wraz z rozwojem badań nad mechanizmami mikrobiologicznego rozkładu arenów, zaobserwowano iż istnieją mikroorganizmy zdolne do przeprowadzania tych procesów w warunkach anaerobowych [36]. Na rysunku 2. przedstawiono różne strategie rozkładu związków nitroaromatycznych.

W literaturze nadal opisywane są nowe ścieżki degradacji związków nitroaromatycznych. Z reguły różnią się od znanych szlaków katabolicznych rodzajem produktów pośrednich powstających w trakcie procesu biodegradacji. Identyfikowane są również bakterie zdolne do rozkładu związków dotąd uznawanych za niedegradowane. Przykładem może być szczep *Pseudomonas* sp. JHN wykazujący zdolność do rozkładu fungicydu 4-chloro-3-nitrofenolu (CNP) z wytworzeniem intermediatu w postaci 4-chlororezorcyny. Jak donoszą autorzy pracy jest to pierwszy szczep bakteryjny wykazujący zdolność do mineralizacji CNP [5].

#### 5.1.1. Degradacja tlenowa (aerobowa)

W warunkach aerobowych degradacji podlegają głównie związki mono- i dinitroaromatyczne. Ogólna strategia wykorzystywana przez drobnoustroje w celu degradacji nitrozwiązków aromatycznych jest anaboliczna do tej stosowanej w oksydacyjnej ścieżce



Rys. 2. Schematyczne przedstawienie przebiegu enzymatycznych reakcji rozkładu związków nitroaromatycznych

Na podstawie: [60, 86, 99, 106, 115].

rozkładu aminokwasów i węglowodorów aromatycznych. Polega ona na konwersji substratu do fenoli, chinonów i katecholi, które w dalszej kolejności rozkładane są do intermediatów cyklu kwasów trójkarboksylowych (cykl Krebsa) [48].

Nitroareny z jednym podstawnikiem hydroksylowym w pierścieniu, np. nitrofenole czy chlorofenole, są modyfikowane przez NAD(P)H-zależne monoooksygenazy [38]. Są to enzymy indukcyjne, pochodne cytochromu P-450. Wykorzystują NAD(P)H by rozbić tlen cząsteczkowy, który w kolejnym kroku wprowadzany jest do pierścienia aromatycznego [75, 60]. Na skutek ich aktywności grupa nitrowa odłącza się od pierścienia.

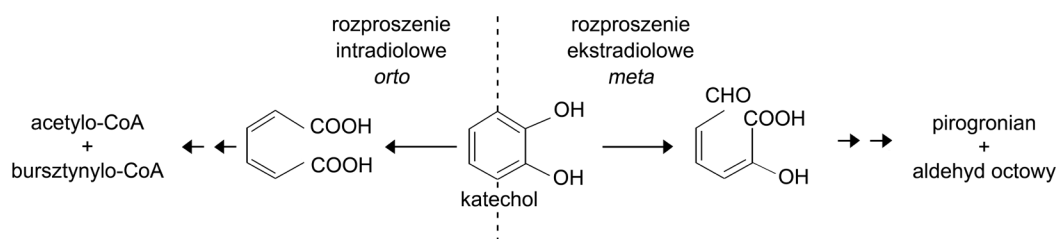
W przypadku 4-nitrofenolu (4-NP) poznano dwa alternatywne szlaki rozkładu tego związku różniące się rodzajem produktu pośredniego powstającego po hydroksylacji. Pierwsza ścieżka degradacji 4-NP, opisana w 1991 roku przez Gibsona i Spaina dla szczepu *Moraxella* sp., zakłada hydroksylację 4-nitrofenolu przez zależną od NADPH monoooksygenazę z jednoczesnym uwolnieniem azotynu i akumulacją benzochinonu, który jest niestabilnym inetrmediatem

przekształcanym w dalszej kolejności w hydrochinon, ulegający dalej rozkładowi do produktów pośrednich cyklu kwasów trójkarboksylowych.

Alternatywny szlak degradacji 4-nitrofenolu charakteryzuje szczep *Arthrobacter* sp., w przypadku którego produktem początkowego etapu degradacji z udziałem monoooksygenazy jest 4-nitrokatechol, podlegający następnie hydroksylacji w pozycji 3 lub 4, co prowadzi do powstania 1,2,4-benzenotriolu. W dalszej kolejności dochodzi do rozszczepienia pierścienia aromatycznego benzenotriolu w pozycji *orto* i kolejnych przekształceń których efektem jest wytworzenie intermediatów cyklu Krebsa [60]. Jest to jeden z przykładów obrazujących złożoność szlaków rozkładu nitroarenów (patrz. Rozdział 5.1.3).

Związki aromatyczne, które nie posiadają w swej strukturze grupy OH, ulegają reakcji hydroksylacji, która katalizowana jest przez enzymy z grupy dioksygenaz hydroksylujących. Wprowadzają one dwie grupy hydroksylowe do struktury pierścienia aromatycznego z uwolnieniem jonu azotynowego. Produkt reakcji przekształcani jest do katecholu [105]. Przykładem





Rys. 3. Reakcje rozszczepienia pierścienia aromatycznego węglowodorów aromatycznych Droga *orto* i *meta*, wg Vaillancourt i wsp. [105], zmodyfikowany.

jest rozkład nitrobenzenu przeprowadzany przez *Comamonas* sp. [73].

Kolejnym istotnym etapem jest rozerwanie struktury aromatycznej. Wyróżnia się dwie główne rodziny dioksygenaz rozszczepiających zaangażowanych w degradację związków aromatycznych. Są to dioksygenazy intradiolowe oraz ekstradiolowe [14]. W przypadku pierwszej grupy, geny tych enzymów zlokalizowane są na chromosomie. Katalizują one rozerwanie wiązania między dwoma hydroksylovanymi atomami węgla leżącymi w pozycji *orto* w pierścieniu aromatycznym (rozszczepienie typu *orto*). Produktem tych przemian jest kwas *cis,cis*-mukonowy bądź jego pochodne (Rys. 2). Dioksygenazy ekstradiolowe, które katalizują otwarcie pierścienia typu *meta*, kodowane są przez geny zlokalizowane w większości przypadków na plazmidzie. W tym przypadku pęka wiązanie między węglem hydroksylovanym i sąsiednim węglem bez grupy hydroksylowej [38]. Produktem aktywności tych enzymów jest semialdehyd kwasu 2-hydroksymukonowego lub pochodne tego związku (Rys. 3).

W ostatnim etapie mikrobiologicznej degradacji arenów, alifatyczne łańcuchy kwasowe są utleniane do związków wchodzących do centralnych szlaków metabolicznych [6]. Kwas *cis,cis*-mukonowy, produkt reakcji rozszczepienia typu *orto*, ulega przemianom do substratów cyklu Krebsa m.in. bursztynylo-CoA oraz acetylo-CoA. W szlaku ekstradiolowym (*meta*) produktem otwarcia pierścienia jest semialdehyd 2-hydroksymukonowy lub jego pochodne. Związki te przekształcane są do intermediatów różnych szlaków (np. aldehyd octowy, pirogronian, szczawiooctan, fumaran) [38].

### 5.1.2. Redukcyjny rozkład nitroarenów

Tak jak opisano powyżej, związki nitroaromatyczne mogą ulegać rozkładowi na skutek ataku tlenu na pierścień aromatyczny i następujących po nim reakcjach. W przypadku związków o większej liczbie podstawników rozkład następuje drogą redukcji, co może zachodzić zarówno w warunkach anaerobowych jak i aerobowych. Wraz ze wzrostem liczby podstawników nitrowych, elektrony z pierścienia silniej odciągane są na tlen grup nitrowych. Struktura cykliczna wykazuje

deficyt elektronów, co uniemożliwia atak katalizowany przez oksygenazy [86].

Sposób rozkładu zależy również od rodzaju podstawników, w szczególności tych w pozycji *para*. Wzrost potencjału do redukcji grupy nitrowej jest uzależniony od grupy funkcyjnej wg następującego porządku:  $\text{NH}_2 < \text{OH} < \text{CH} < \text{H}_3\text{COOH} < \text{NO}_2$  [69]. Oznacza to, że redukcja pierwszej grupy nitrowej do grupy aminowej zachodzi łatwiej niż kolejnych podstawników. Zredukowanie wszystkich trzech podstawników w trinitrotoluenie możliwe jest wyłącznie w ściśle beztlenowych warunkach (warunki silnie redukcyjne). Proces przeprowadzają *Clostridium* sp. i *Desulfovibrio* sp. [97]. W wielu przypadkach do przeprowadzenia reakcji wymagane jest egzogenne źródło węgla, które pozwala utrzymać odpowiedni potencjał redoks [86].

Bardzo często, produktem tej reakcji jest związek azotu wykorzystywany przez mikroorganizmy jako źródło tego pierwiastka [86]. Zaobserwowano również, że bakterie *Pseudomonas putida* szczepu JLR11 wyspecjalizowały się w wykorzystywaniu trinitrotolenu jako ostatecznego akceptora elektronów. Przeprowadzają redukcję TNT w celu wytwarzania siły protonomotorycznej [26–27].

Redukcyjny rozkład nitroarenów następuje w dwójki sposób: (1) poprzez rozerwanie pierścienia aromatycznego przy udziale transferaz, które dołączają do niego dwa atomy wodoru ( $\text{H}^-$ ), (2) na skutek redukcji grup azotowych przez nitroreduktazy do hydroksyloamin lub amin (typu I niewrażliwych na tlen oraz typu II wrażliwych na tlen). W pierwszym przypadku ze związków di- i trinitroaromatycznych (np. TNT czy kwas pikrynowy) powstaje tzw. kompleks wodorkowy Meisenheimera (*Hydride-Meisenheimer Complex*) [97]. Po odłączeniu grupy azotowej ulega on rearomatyzacji [85]. Tą drogę rozkładu zaobserwowano m.in. u drożdży *Geotrichum candidum* AN\_Z4. Kompleks ulega konwersji do dinitroarenów, które są łatwiej biodegradowalne niż wyjściowy związek [73, 93].

Nitroreduktazy typu I katalizują reakcję redukcji na drodze stopniowego pobierania z NAD(P)H dwóch elektronów i przenoszenia ich na związek, który ulega transformacji. Enzymy należące do II typu przeprowadzają redukcję, w której pierwszym etapem jest addycja

jednego elektronu. Na skutek tego powstaje rodnik anionu nitrowego. Zidentyfikowano je u szczepów *Escherichia coli* i *Clostridium* sp. [4, 68, 80]. Bakterie mogą posiadać oba typy nitroreduktaz. Przykładowo, z zasiedlających nasze jelita *Bacteroides fragilis* wyizolowano aż cztery nitroreduktazy [56]. W przyrodzie częściej identyfikowane są enzymy należące do typu I [86].

Nitroreduktazy są bardzo rozpowszechnione w świecie mikroorganizmów. Zostały zidentyfikowane u bakterii Gram-ujemnych, Gram-dodatnich jak i u przedstawicieli *Archea*. Jest to prawdopodobnie konsekwencją zdarzeń horyzontalnego transferu ich genów [45] i świadczy o istotnej roli jaką te enzymy pełnią w adaptacji do środowiska. Enzymy te mają szeroki wachlarz substratów – związki aromatyczne, flawiny, chinony, jony żelaza i anion chromianowy. Jest to prawdopodobnie konsekwencją dużej plastyczności miejsca aktywnego i dużej zmienności aminokwasowej uczestniczących w interakcji z substratem [86].

#### 5.1.2.1. Rozkład beztlenowy (anaerobowy)

W warunkach beztlenowych nitrozwiązki aromatyczne redukowane są do nitrozo-pochodnych, hydroksyloamin lub amin, które są często bardziej toksyczne niż związków wyjściowy. Redukcja grupy nitrowej przebiega na drodze stopniowej addycji par elektronowych pobranych z ko-substratów. Reakcje te katalizowane są enzymatycznie przez nitroreduktazy [7].

Bakterie beztlenowe rzadko przeprowadzają pełną konwersję związków nitroaromatycznych do dwutlenku węgla czy metanu [84]. Zdolne są do tego bakterie metanogenne (degradacja nitrofenolu) jak *Methanobacterium formicium* [35, 39]. Przeprowadzenie całkowitej degradacji np.: dinitrotoluenów, mononitrofenoli, trinitrotolenu możliwe jest dzięki współdziałaniu z bakteriami tlenowymi w konsorcjach [2, 43]. Niektóre grzyby (np. *Phanerochaete chrysosporium*) są zdolne do mineralizacji TNT. Wykorzystują zewnątrzkomórkowe, niespecyficzne peroksydazy, dzięki którym mogą degradować szeroką gamę związków nitroaromatycznych [25, 96].

#### 5.1.3. Degradacja nitrobenzenu

##### – przykład alternatywnych ścieżek rozkładu

Tak jak wspomiano wcześniej, rozkład związków aromatycznych może zachodzić wieloma drogami. Nawet w przypadku jednej substancji mamy do czynienia ze ścieżkami alternatywnymi przeprowadzanymi przez różne grupy mikroorganizmów. Dobrym przykładem tego zjawiska jest degradacja nitrobenzenu. Jego rozkład może przebiegać według dwóch alternatywnych ścieżek: częściowej redukcji bądź oksydacji (Rys. 3). Pierwszy szlak opisany został dla szczepu *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45 wyizolowanego z gleb i wód gruntowych zanieczyszczonych nitrobenzenem. Początkowym etapem degradacji nitrobenzenu jest częściowa

redukcja grupy nitrowej przy udziale nitroreduktazy nitrobenzenu, w wyniku której dochodzi do powstania hydroksyaminobenzenu. Ulega on transformacji enzymatycznej do 2-aminofenolu, będącego charakterystycznym intermediatem tej ścieżki katabolicznej. W kolejnym etapie dochodzi do rozszczepienia pierścienia aromatycznego 2-aminofenolu, co katalizowane jest przez dioksygenazy. Powstały w wyniku tej reakcji produkt – semialdehyd 2-aminomukonowy ulega dalszym przekształceniom, aż do wytworzenia produktów pośrednich wchodzących w cykl kwasów trójkarboksylowych [94]. Kolejne badania potwierdziły istnienie wielu szczepów bakteryjnych degradujących nitrobenzen według przedstawionej powyżej ścieżki. Należą do nich m.in. zidentyfikowane w ostatnich latach mikroorganizmy takie jak: *Rhodococcus* sp. NB5, zdolny do całkowitej degradacji 1000 mg nitrobenzenu w ciągu 144 h [65] oraz *Pseudomonas* sp. a3, którego immobilizowane komórki są w stanie degradować 300 mg nitrobenzenu w czasie 10 godzin w obecności dodatkowych związków aromatycznych w postaci aniliny i fenolu [114].

Drugi szlak degradacji nitrobenzenu poznany został w 1995 roku przez Nishino i Spain'a, którzy wyizolowali bakterie z rodzaju *Comamonas* sp. szczepu JS765. Bakterie wykorzystują ścieżkę oksydacyjną degradacji nitrobenzenu. Reakcję inicjują dioksygenazy poprzez wprowadzenie dwóch grup hydroksylowych do pierścienia aromatycznego (patrz. Rys. 4). Skutkiem tego jest uwolnienie azotynu oraz powstanie katecholu, degradowanego w dalszej kolejności według szlaku *meta* z udziałem 2,3-dioksygenazy katecholowej. Nishino i Spain zauważyli, że ścieżka częściowej redukcji jest częściej spotykana wśród mikroorganizmów, niż ścieżka oksydacyjna. Tylko jeden spośród 155 przebadanych szczepów wytwarzał enzymy i intermediaty specyficzne dla szlaku oksydacyjnego.

## 6. Bioremediacja

Metabolizm ksenobiotyków przez mikroorganizmy zależy w znacznej mierze od rodzaju i właściwości danej substancji oraz dostępnego aparatu enzymatycznego. Mogą ulegać całkowitej degradacji do wody i dwutlenku węgla (mineralizacja), bądź też być przekształcane w produkty o mniejszej lub większej toksyczności niż związków wyjściowy, co określane jest mianem biotransformacji [41].

Bioremediacja jest definiowana jako proces, w którym odpady ulegają biologicznej degradacji lub transformacji do nieszkodliwych pochodnych lub do poziomu poniżej wartości granicznych ustalonych przez organy regulacyjne [60]. Wyróżnia się dwie grupy



zabiegów. W procesie bioremediacji podstawowej bierze udział wyłącznie autochtoniczna mikrobiota skażonego terenu. Wykorzystując zanieczyszczenie jako źródło węgla i/lub energii, przyczynia się do obniżenia stężenia toksycznych związków. Bioremediacja inżynieryjna obejmuje technologie biostymulacji i bioaugmentacji.

Biostymulacja ma na celu pobudzenie autochtonicznej mikrobioty środowiska do degradacji zanieczyszczeń. Podejmowane działania ukierunkowane są na stworzenie optymalnych warunków do wzrostu i aktywności mikroorganizmów. Przykładowo, dostępność tlenu jest częstym czynnikiem limitującym degradację zanieczyszczeń. Obecnie znanych jest wiele metod umożliwiających napowietrzanie np. wentylacja z wykorzystaniem układu drenów, mechaniczna uprawa gruntu (spulchnianie) oraz wtłaczanie rozcieńczonych roztworów nadtlenu wodoru i innych środków utleniających [10]. Proces rozkładu zanieczyszczeń może być limitowany przez stężenie pierwiastków biogennych tj. azotu czy fosforu, których niedobór może być uzupełniony poprzez zaaplikowanie odpowiednich pożywek [12].

Wprowadzenie do skażonego środowiska bakterii o wysokim potencjale do degradacji ksenobiotyków określane jest jako bioaugmentacja. Metoda bioaugmentacji wykorzystywana jest w przypadku gdy naturalna mikrobiota nie wykazuje pożądanej aktywności neutralizacyjnej wobec zanieczyszczeń [10]. Mikroorganizmy w postaci inokulum dostarczane są w miejsce skażenia. Drobnoustroje izolowane są z innych stanowisk bądź pochodzą z miejsca zanieczyszczonego i po okresie adaptacji są ponownie do niego wprowadzone.

Często stosuje się strategię łączącą biostymulację z bioaugmentacją. Przykładowo Kao i wsp. (2016) testowali efektywność rozkładu TNT przez *Achromobacter* sp. BC09 i *Citrobacter* sp. YC4 wyizolowane z gleby zanieczyszczonej tym związkiem. Wydajność nie była zadowalająca, dlatego dostarczono egzogenne źródła węgla w postaci sacharozy (0.25%) co zoptymalizowało proces. Analogiczny eksperyment przeprowadzono dla *Klebsiella* sp. i *Achromobacter* sp. (wyizolowanych z gleby i osadu ściekowego). Mikroorganizmy również wykorzystywały TNT jako źródło azotu i doprowadziły do jego całkowitej degradacji w ciągu 10 dni. W tym przypadku jako źródło węgla wykorzystano melasę (8 g/l) [90].

Nie wyklucza się również rozwiązań opartych na genetycznie modyfikowanych mikroorganizmach (GMM), co wciąż budzi jednak wiele obaw i kontrowersji. Wykorzystanie GMM w bioremediacji ma służyć zwiększeniu efektywności rozkładu związków trudno degradowalnych [3]. Przykładowo, Cho i wsp. (2002) otrzymali szczep *E. coli* 22A11 z fosforoorganiczną hydrolazą (OPH) o aktywności hydrolazy parationu metylowego, która przeprowadza reakcję rozkładu związku nitroaromatycznego 25 razy szybciej niż enzym

wyjściowy. Kadiyala i wsp. (2003) uzyskali rekombinowane wektory, w których sklonowano geny nitroreduktazy (*nfs1*) z *Enterobacter cloacae*, nitroreduktazy nitrobenzenu (*nbzA*) i mutazy hydroksylaminobenzenu (*habA*) z *P. pseudoalcaligenes* JS 45. Wydajność procesu biokonwersji z wykorzystaniem transformowanych komórek *E. coli* szczepów JS 995 i JS 996 była wysoka, a reakcja zachodziła szybko (wydajność reakcji powyżej 64% w ok. 20 minut). Bakterie mogą być wykorzystane do przeprowadzania reakcji przekształcenia nitrozwiązków aromatycznych do *o*-aminofenoli. Związki te znajdują zastosowanie w przemyśle aeronautycznym i farmaceutycznym. Ich synteza chemiczna jest skomplikowana dlatego poszukiwana jest inna, prostsza strategia ich wytwarzania. Ponadto, pochodne fenolowe wykazują większą podatność na biodegradację, co jest istotne z uwagi na aspekty oczyszczania środowiska.

### 6.1. Bioremediacja związków nitroaromatycznych – przykłady realizacji

Wybór strategii bioremediacji uzależniony jest od rodzaju i poziomu zanieczyszczenia oraz od charakteru terenu poddawanego rekultywacji. Dekontaminacja zanieczyszczeń metodą bioremediacji inżynieryjnej może być prowadzona *in situ* bądź *ex situ* [58]. Technologie *in situ* odnoszą się do usuwania zanieczyszczeń w miejscu skażenia bez konieczności transportu materiału. Wykorzystywana jest w przypadku rozległych skażeń lub terenów, z których niemożliwe jest usunięcie zanieczyszczonego materiału. W drugim przypadku zanieczyszczony materiał jest usuwany z pierwotnej lokalizacji i przenoszony do specjalnie przygotowanych instalacji, w których poddawany jest zabiegom oczyszczania [60].

#### 6.1.1. Bioremediacja inżynieryjna *in situ*

Znane jest wiele metod mikrobiologicznego oczyszczaniu gruntów *in situ*. Jednak w przypadku związków nitroaromatycznych niewiele z nich znalazło zastosowanie w oczyszczaniu w dużej skali. Przykładowo kompostowanie, choć w większości wypadków stosowane jest jako strategia *ex situ*, zostało wykorzystane w testach wielkoskalowych na miejscu skażenia. Jest to proces, w którym dochodzi do mikrobiologicznej degradacji związków organicznych w warunkach podwyższonej temperatury (40–50°C). Istotna jest również dostępność ko-metabolitów, czyli łatwo przyswajalnych substratów wzrostowych. Metoda ta okazała się być skuteczna w przypadku gleby i osadów zanieczyszczonych związkami ropopochodnymi, chlorofenolami, wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi, herbicydami, pestycydami oraz związkami nitroaro-

matycznymi. Przykładem wielkoskalowej realizacji jest kompostowanie gleb zawierających związki wybuchowe – TNT, RDX i HDX [116]. Autorzy podkreślają, że w eksperymencie doszło do degradacji biotycznej jak i abiotycznej.

Inna metoda to landfarming. Jest to metoda *ex situ*, gdyż zanieczyszczona gleba jest oddzielona od gruntu nieprzepuszczalną folią. Jej podobieństwo do metod *in situ* wynika z możliwości przeprowadzania procesu w dużej skali oraz blisko terenu skażenia, co znacznie obniża koszty przedsięwzięcia. Przyspieszenie naturalnego procesu oczyszczania jest możliwe dzięki dodawaniu nawozów (stymulacja wzrostu mikroorganizmów) oraz zaorywaniu gruntu (poprawa struktury i warunków powietrznych gleby). W pracy Widrig i wsp. (1997) zastosowano omawianą strategię wobec terenu zanieczyszczonego TNT (badania pilotażowe). Glebę wzbogacano w bogatą w związki odżywcze melasę. Autorzy zaznaczają, że przeprowadzone przez testy mogą znaleźć zastosowanie w wielkoskalowym oczyszczaniu terenów zanieczyszczonych nitrozwiazkami.

Na uwagę zasługuje również ryzoremediacja. W przypadku tej technologii efektywność degradacji zależy od współpracy roślin i bakterii, które zasiedlają wewnątrz ich korzeni (mikroorganizmy z grupy endofitów). Zauważono, że poszczególne gatunki roślin mogą promować występowanie konkretnych genotypów w zależności od rodzaju zanieczyszczenia. Przykładowo, w glebach zanieczyszczonych związkami nitro- aromatycznymi zaobserwowano wzrost liczby kopii genu reduktazy 2-nitrotoluenu *ntdAa* u bakterii zamieszkujących korzenie trawy. Nie zauważono tego w analogicznym eksperymencie badającym mikroorganizmy zasiedlające kostrzewę trzcinową (*Festuca arundinacea*) [91].

W przypadku oczyszczania wód na uwagę zasługuje technologia przepuszczalnych barier reaktywnych (*permeable reactive barriers – PRBs*). Zanieczyszczenia przepływają przez filtr, na którym mogą zostać zimmobilizowane mikroorganizmy. Jest to możliwe dzięki porowatej konstrukcji tej instalacji. Ulegają one precypitacji bądź sorpcji, a następnie biodegradacji na filtrze. W pracy przetestowano skuteczność rozkładu nitrobenzenu i aniliny przez konsorcjum związane na nośniku przy pomocy perlitu i torfu. Substancje zostały zmineralizowane po mniej niż 3 dniach, podczas gdy wolnym komórkom zajęło to od 3 do 5 dni. Kluczowe dla powodzenia procesu jest odpowiedni poziom natlenienia, co zostało uzyskane dzięki zastosowaniu technologii napowietrzania. Bakterie zostało wyizolowane z terenów chłodnych (średnia roczna temperatura wynosi 10°C), na których znajdowała się fabryka aniliny i poligon. W jego skład wchodziło 19 gatunków z rodzaju *Pseudomonas*, które stanowiły 98% populacji mikroorganizmów oraz przedstawiciele *Achromobacter*, *Acidovorax*, *Afipia*, *Chryseobacterium*, *Delftia* i *Stenotrophomonas* [66].

### 6.1.2. Bioremediacja inżynierska *ex situ*

Technologie *ex situ* znajdują zastosowanie, gdy w zanieczyszczonym środowisku istnieje zagrożenie migracji zanieczyszczeń do wód podziemnych. Ta strategia umożliwia lepszą kontrolę procesu, a degradacja następuje szybciej niż w strategiach *in situ* [58]. Jest ona jednak bardziej kosztowna, gdyż wymagają przetransportowania zanieczyszczonego materiału oraz wytworzenia odpowiedniej infrastruktury laboratoryjnej, w której odbywać się będzie rozkład zanieczyszczeń.

Technologie *ex situ* obejmują wiele metod w zależności od charakteru zanieczyszczeń poddawanych neutralizacji. Do najpopularniejszych z nich należą: metoda bioreaktorowa, filtrów zraszanych (dotyczy oczyszczania z zanieczyszczeń ciekłych), pryzmowania, kompostowania, przeorywania (stosowana wobec odpadów stałych) oraz biopłuczki i biofiltry do oczyszczania emisji gazowych [12].

Bioremediacja *ex situ* z zastosowaniem bioreaktorów jest wykorzystywana przy oczyszczaniu gleby silnie skażonej np. zanieczyszczonej TNT. Materiał przenoszony jest ze źródła do bioreaktorów, gdzie w kontrolowanych warunkach (temperatura, pH, napowietrzanie itd.) następuje jego dekontaminacja. W procesie tym, gleba mieszana jest z wodą w stosunku 1:1 (w/w) [26]. Do homogennej zawiesiny dodawany jest ko-substrat, np. skrobia, który jest wykorzystywany przez autochtoniczne bakterie. Dochodzi tu do zjawiska ko-metabolizmu, co w tym przypadku oznacza degradację ksenobiotyków przy równoczesnym wykorzystywaniu związków stanowiących łatwo przyswajalne źródło węgla i energii [64]. Ko-substrat jest dawcą elektronów wykorzystywanych do redukcji grup nitrowych. Funk i współpracownicy (1993) opublikowali wyniki badań potwierdzające wysoką skuteczność tej metody. Odnotowano redukcję stężenia TNT z 3000 mg do 1 mg/kg gleby po 5 miesiącach. Równie wydajne oczyszczanie gleby przeprowadzono przy użyciu *R. pyridinivorans* NT2 do degradacji mieszaniny 4-nitrotoluenu (4-NT), 2,4-dinitrotoluenu (2,4-DNT) i 2,6-dinitrotoluenu (2,6-DNT). Zawartość zanieczyszczeń spadła o 86–88% w ciągu 60 dni [61].

W przypadku TNT procesy mikrobiologicznej transformacji najwydajniej przebiegają, gdy zanieczyszczony materiał poddawany jest warunkom tlenowym i beztlenowym naprzemiennie. Na skutek dodania łatwo przyswajalnego źródła węgla zużywany jest tlen obecny w bioreaktorze, a z czasem w reaktorze wytwarza się środowisko beztlenowe. Również metoda kompostowania pryzmowego, w której naprzemiennie występują warunki tlenowe i beztlenowe, okazała się być skuteczna w dekontaminacji gleb zanieczyszczonych materiałami wybuchowymi [13, 83].

Schrader i Hess [88] (2004) zaproponowali postępowanie, które zakłada połączenie degradacji biotycznej

z abiotyczną. Działania te obejmują zmieszanie skażonej gleby z wysoką koncentracją nadtlenu wodoru. W reakcji powstają kwasy organiczne, które ulegają transformacji przez mikroorganizmy dodane do bioreaktora w postaci osadu czynnego. W porównaniu z zastosowaniem wyłącznie metody chemicznej, metoda łączona jest bardziej wydajna – nastąpił wzrost mineralizacji TNT z 41 i 34% do 73 i 64% (warianty różniły się ilością dodanej gnojowicy).

## 6.2. Ograniczenia procesu bioremediacji i strategii ich przewyżczenia

Pomimo identyfikacji wielu taksonów wykazujących zdolność do degradacji nitroarenów i poznania warunków optymalizujących ten proces, zakres rozkładanych substancji jest ograniczony. Bioremediacja tej grupy związków napotyka kilka problemów:

- związki nitroaromatyczne są toksyczne względem mikroorganizmów. Zaobserwowano zróżnicowanie wrażliwości na TNT w zależności od budowy ściany komórkowej bakterii – bakterie Gram-dodatnie są bardziej wrażliwe niż Gram-ujemne [30, 31, 57],
- charakteryzują się niską biodostępnością – są słabo rozpuszczalne i łatwo ulegają sorpcji na cząstkach gleby,
- często w środowisku obecne są mieszaniny wielu związków, co spowalnia proces degradacji. W eksperymencie prowadzonym przez Karlová i wsp. (2016) zaobserwowano dwukrotny spadek degradacji 4-nitrotoluenu (4-NT) po dodaniu 4-nitrofosforanu (4-NP). Wydajność degradacji 4-NP nie uległa zmianie w stosunku do warunków kontrolnych (bez 4-NT). 4-NP wpływał bezpośrednio na spowolnienie degradacji 4-NT (inhibicja kompetywna) i pośrednio, poprzez obniżanie zdolności adaptacyjnych mikroorganizmów,
- systemy enzymatyczne drobnoustrojów nie są przystosowane do przeprowadzenia pełnej mineralizacji zanieczyszczeń, gdyż szlaki rozkładu nie są wystarczająco złożone [60]. Dlatego bardziej efektywnie proces ten przeprowadzają konsorcja bakteryjne niż pojedyncze szczepy [77].
- w środowisku zanieczyszczonym nitroarenami występują również inne związki toksyczne w tym inhibitory procesu bioremediacji jak np. metale ciężkie czy farmaceutyki [22, 76].

W poniższych akapitach rozwinięto niektóre z wyżej wymienionych problemów.

Istotnym problemem w przypadku bioaugmentacji jest spadek liczby mikroorganizmów wprowadzanych do skażonego środowiska na co wpływ ma szereg czynników biotycznych i abiotycznych m.in. wahania tem-

peratury, zmiany poziomu wilgotności, niski poziom pierwiastków biogenych, niewystarczająca zawartość tlenu, drapieżnictwo (*Protozoa*) czy zbyt wysokie stężenie toksycznych zanieczyszczeń. W celu zabezpieczenia mikroorganizmów przed szkodliwym wpływem środowiska, podejmowane są próby immobilizacji drobnoustrojów na różnego typu nośnikach. Powszechnie stosowanymi materiałami są: agar, agaroz, alginian, poliuretan, żelatyna, guma gellan czy żele z dodatkiem alkoholu poliwinylowego [103].

Wu i współpracownicy (2012) sprawdzili efektywność rozkładu zanieczyszczeń przez immobilizowane bakterie. Wykorzystano szczep *Pseudomonas* sp. a3 zdolny do degradacji nitrobenzenu. Jako nośnik zastosowano alginian sodu w połączeniu z alkoholem poliwinylowym, których stężenie wynosiło kolejno 3 i 9%. Wyniki przeprowadzonych badań dowiodły, że immobilizowane komórki *Pseudomonas* sp. a3 są zdolne do bardziej wydajnego rozkładu wieloskładnikowych mieszanin zanieczyszczeń aromatycznych niż komórki wolne. Bakterie zamknięte w nośniku całkowicie usuwają z podłoża nitrobenzen (stężenie początkowe wynosiło 300 mg/l) oraz anilinę i fenol (150 mg/l) w czasie 10 godzin. Zaobserwowano również ich podwyższoną tolerancję na niesprzyjające warunki środowiska takie jak wysokie zasolenie (10% NaCl) i kwasowość (pH 4–5) [114].

Zwiększenie dostępności związków możliwe jest dzięki wykorzystaniu metod fizykochemicznych. Islam i współpracownicy (2015) usunęli TNT i heksogen (RDX) z gleb wykorzystując metodę ekstrakcji przegrzaną wodą w temperaturze 175°C (*subcritical water extraction*). Wadą takich metod jest jednak zagrożenie degradacji gleby (utrata struktury gruzelkowej, wypłukanie biogenów i zabicie większości mikroorganizmów). Metodą bardziej przyjazną środowisku jest stosowanie biosurfaktantów. Są to związki, które zmniejszają napięcie powierzchniowe, dzięki czemu kontakt bakterii z hydrofobowym zanieczyszczeniem jest ułatwiony. Niektóre bakterie są zdolne do wytwarzania związków o takich właściwościach. Szczep *Rhodococcus pyridinivorans* NT2 wyizolowany z gleby zanieczyszczonej pestycydami, zaczyna produkować biosurfaktanty (są to pochodne trehalozy m.in. glikolipidy) w trakcie metabolizmu 4-nitrotoluenu. Są to związki zdolne do emulsyfikacji zanieczyszczenia. Co ciekawe, takie emulsje są stabilne nawet przez 24 godziny, co pozwala bakteriom przeprowadzać „ułatwioną” degradację zanieczyszczeń dłużej. Wytwarzanie biosurfaktantów jest skorelowane z cyklem komórkowym bakterii – zaczynają być produkowane, gdy komórki wkraczają w stacjonarną fazę wzrostu [61].

Otoczki wspomnianego szczepu mają charakter silnie hydrofobowy. Zawierają kwasy mykolowe, glikolipidy, kwasy tłuszczowe i wielocukry. To również jest

mechanizm adaptacji bakterii do obecności związków aromatycznych w środowisku. Dochodzi wówczas do zmiany nasycenia i długości kwasów tłuszczowych oraz mykoloowych błony komórkowej, zawartości kwasów rozgałęzionych i wzrostu lipofiliowości [16]. Takie adaptacje są powszechne wśród bakterii żyjących w warunkach wysokiej hydrofobowości środowiska. Podobne zmiany zaobserwowano u *Staphylococcus haemolyticus* po ekspozycji na toluen [71] czy *Arthrobacter chlorophenolicus* na m.in. 4-nitrofenol [104].

Jedną ze strategii zwiększających efektywność oczyszczania jest stosowanie biopreparatów. Są to konsorcja mikroorganizmów, które „współpracują” przy rozkładzie zanieczyszczeń. Bakterie umożliwiają rozkład związków poprzez przeprowadzanie poszczególnych etapów szlaku. Współdziałanie może być również oparte na promocji rozwoju innych grup bakterii w konsekwencji dostarczania im niezbędnych do wzrostu substratów. Biopreparaty znajdują zastosowanie w warunkach oczyszczania *in situ* jak i *ex situ*.

Istnieje wiele mikroorganizmów wykorzystanych jako komponenty biopreparatów zwiększających efektywność degradacji nitrozwiązków aromatycznych. Jako przykład mogą posłużyć dwa szczepy *Pseudomonas* oznaczone symbolami S1 i S2, które zmieszano w stosunku 5:1 tworząc konsorcjum. Preparat został zastosowany do biodegradacji 4-nitrofenolu (PNP) zawartego w glebie skażonej pestycydami fosforanowymi. Wyniki badań potwierdziły synergistyczne działanie wyizolowanych szczepów bakteryjnych, które prowadzi do przekształcenia PNP w 4-nitrokatchol. Całkowitą degradację związku osiągnięto już po upływie 120 godzin od inokulacji medium hodowlanego [81].

Inny przykład to konsorcjum zawierające cztery gatunki bakterii z rodzaju *Bacillus* (*Bacillus subtilis* RSE165, *Bacillus megaterium* RSA32, *Bacillus cereus* RSB80 i *Bacillus lexus* RSD127) zdolne do rozkładu 2,4-DNT. Nie zidentyfikowano dotychczas szczepu bakterii zdolnego do jego samodzielnej degradacji. Konsorcjum wykazywało lepszy wzrost na podłożu wzbogaconym w ksenobiotyk, niż szczepy hodowane oddzielnie. Bakterie są zdolne do jego degradacji przy najwyższym dotychczas odnotowanym w literaturze stężeniu tego związku (0,3 mg/ml) [92].

Wykorzystanie konsorcjum znalazło zastosowanie przy oczyszczaniu wspomnianego wcześniej heksogenu (RDX). Zaobserwowano, że bakterie szczepu *Gordonia* sp. KTR9 wykorzystują ten związek jako źródło azotu. Produktem końcowym ich metabolizmu jest 4-nitro-2,4-diazabutanal (NDAB). Aby się go pozbyć, do hodowli tych bakterii dodano *Methylobacterium* sp. JS178. W efekcie doszło do mineralizacji zanieczyszczenia, gdyż dwa szczepy rozłożyły związek przeprowadzając różne etapy szlaku degradacji. Autorzy wnioskują,

że dwuskładnikowe konsorcjum może zostać wykorzystane do całkowitej degradacji heksogenu [20].

Innym przykładem konsorcjum bakteryjnego jest bioprodukt BACTREM. W opisie patentowym PL 219151 B1 jest opisany jako szczepionka bioremediacyjna zawierająca kompozycję 11 szczepów, wyselekcjonowanych z terenów zanieczyszczonych (gleby i wody) jedno- i wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi, nitrozwiązkami, pestycydami, metalami ciężkimi i farmaceutykami. BACTREM jest produktem organiczno-mineralnym zawierającym kompozycję szczepów tlenowych bakterii saprofitycznych, pożywkę oraz nośnik sprzyjające rozwojowi tych bakterii. Według producenta tego preparatu, spółki BACTrem typu spin-off Uniwersytetu Warszawskiego, przeznaczony jest do bioremediacji gleby, hałd, wycieków, składowisk skażonych węglowodorami aromatycznymi, związkami nitrowymi, metalami ciężkimi w warunkach tlenowych i względnie beztlenowych oraz wspomagania procesów biodegradacji przy kompostowaniu, w przydomowych oczyszczalniach ścieków oraz w glebie pod uprawy. Preparat osadzony na złożu biologicznym może zostać również wykorzystany do oczyszczania wód odciekowych, przemysłowych i innych [8]. Kompozycja, zastosowanie szczepionki bioremediacyjnej do usuwania zanieczyszczeń i sposób oczyszczania zostały opatentowane również w USA, Rosji, Ukrainie, Chinach i krajach Unii Europejskiej. Zespół badawczy BACTrem Sp. o.o. wykazał bardzo wysoką skuteczność biopreparatu na terenach byłej rafinerii w Gorlicach co zostało potwierdzone przez Regionalną Dyрекcję Ochrony Środowiska w Krakowie. Analiza skażenia wykazała obecność w tej glebie WWA, BTX, olejów mineralnych, nitrozwiązków jak również wysokich stężeń metali ciężkich: ołowiu, miedzi, niklu, cynku i chromu. W zanieczyszczonej glebie podanej działaniu biopreparatu w określonym stosunku objętościowym już po 7 dniach odnotowano redukcję zanieczyszczeń o ponad 80% w stosunku do stanu wyjściowego, która utrzymywała się także po upływie miesiąca oraz kolejnych 6 miesięcy od dnia rozpoczęcia bioremediacji wyznaczonego terenu.

## 7. Podsumowanie

O konieczności oczyszczania środowiska decydują nie tylko względy zdrowotne ale również gospodarcze i ekonomiczne. Składowiska odpadów niebezpiecznych bądź tereny nimi zanieczyszczone generują ogromne koszty, stąd zainteresowanie wielu podmiotów gospodarczych ich neutralizacją. Ponadto, z roku na rok rośnie społeczna świadomość dotycząca ochrony środowiska. Obowiązek oczyszczania środowiska z określonych ksenobiotyków jest regulowany licznymi

rozporządzeniami Ministra Zdrowia i Ministra Środowiska, pozostającymi w zgodzie z aktualnymi dyrektywami Unii Europejskiej (UE). Obecnie obowiązują następujące Rozporządzenia Ministra Środowiska: (i) z dnia 9 września 2002 r. w sprawie standardów jakości gleby oraz standardów jakości ziemi (ii) z dnia 9 listopada 2011 r. w sprawie sposobu kwalifikacji stanu jednolitych części wód powierzchniowych oraz środowiskowych norm jakości dla substancji priorytetowych (wdrożenie dyrektywy Parlamentu Europejskiego 2000/60/WE; 2008/105/WE; 2009/90/WE) (iii) 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 oraz (iv) Ustawa z dnia 27 kwietnia 2001 r. Prawo ochrony środowiska po zmianach, po zmianach obowiązująca od 1 stycznia 2017. Niniejsza ustawa dokonuje w zakresie swojej regulacji wdrożenia następujących dyrektyw Unii Europejskiej: 87/217/EWG; 91/692/EWG; 92/43/EWG; 96/59/WE; 1999/94/WE; 2000/53/WE; 2002/49/WE; 2004/107/WE; 2008/50/WE; 2008/56/WE; 2008/98/WE; 2009/147/WE; 2010/75/UE; 2009/28/WE; 2012/18/UE; 166/2006/WE. Każde z tych rozporządzeń czy ustaw podlega nowelizacji zgodnie ze zmieniającymi się dyrektywami UE. Wprowadzane zmiany czynią przepisy coraz bardziej restrykcyjne w stosunku do poprzednich. Przykładem mogą być zmiany, które weszły w życie od 1 stycznia 2017 roku w procedurze ocen oddziaływania na środowisko (OOŚ), m.in. są nowe wytyczne w zakresie karty informacyjnej przedsięwzięcia oraz raportów OOŚ. Zgodnie z nowymi regulacjami prawnymi na inwestora będzie mogła zostać nałożona kara pieniężna w wysokości od 500 zł do 1.000.000 zł. Kara będzie grozić inwestorowi zarówno w sytuacji, kiedy przedsięwzięcie będzie w trakcie realizacji, jaki i wtedy, kiedy będzie już zrealizowane. Zmiany, wynikające wprost z dyrektywy 2010/75/UE, dotyczą również zmniejszania poziomu emisji zanieczyszczeń z instalacji przemysłowych. Dodatkowo uporządkowano system prawny: dotyczący ochrony i rekultywacji powierzchni ziemi. Doprecyzowano przepisy dotyczące dokonywania oceny wystąpienia zanieczyszczenia powierzchni ziemi oraz określenia sposobów prowadzenia rekultywacji terenów zanieczyszczonych. Wszystkie proponowane zmiany mają przyczynić się do osiągnięcia wysokiego poziomu ochrony zdrowia ludzi i środowiska.

W związku z powyższym, przywrócenie pierwotnego stanu wód, powietrza i gleby to problem priorytetowy. Spośród metod stosowanych do neutralizacji zanieczyszczeń występujących w glebie, hałdach czy odpadach, techniki bioremediacji są zazwyczaj bardziej ekonomicznie opłacalne niż tradycyjne metody dekontaminacji. Poza tym, większość zanieczyszczeń

przedostających się do środowiska może być unieszkodliwiane na miejscu skażenia (*in situ*) co czyni procedurę oczyszczania prostszą i bezpieczniejszą. Warto zauważyć, że bioremediacja oparta na naturalnej zdolności mikroorganizmów do degradacji toksycznych zanieczyszczeń zyskała większą akceptację ze strony społeczeństwa niż inne technologie umożliwiające ich usuwanie. Należy pamiętać, że pełna mineralizacja zanieczyszczeń jest zjawiskiem rzadkim. Efektywność bioremediacji gruntów zanieczyszczonych nitrozwiązkami aromatycznymi może być wspomagana przez współdziałanie konsorcjów mikroorganizmów zdolnych do rozkładu różnych związków lub przeprowadzających poszczególne etapy często bardzo złożonych szlaków rozkładu. Takie biopreparaty mogą być również wykorzystane do neutralizacji skutków awarii systemów przesyłowych ropy i jej pochodnych, a także w przypadku katastrof ekologicznych.

W niniejszej pracy przedstawiono przegląd technik stosowanych w bioremediacji związków nitroaromatycznych w większości reprezentujących badania pilotażowe. Pomimo wielu lat badań, w literaturze nadal braknie doniesień o wielkoskalowych eksperymentach. Z drugiej strony istnieje wiele doniesień o nowych systemach usprawniających ten proces. Można się zatem spodziewać, że eksperymenty w większej skali niebawem zostaną przeprowadzone.

## Piśmiennictwo

1. Aiub C.A.F., Mazzei J.L., Pinto L.F.R., Felzenszwalb I.: Evaluation of nitroreductase and acetyltransferase participation in n-nitrosodiethylamine genotoxicity. *Chem. Biol. Interact.* **161**, 146–154 (2006)
2. Alexander M.: Bioremediation and biodegradation. *J. Environ. Qual.* **32**, 1126–1133 (1999)
3. Ang E.L., Zhao H., Obbard J.P.: Recent advances in the bioremediation of persistent organic pollutants via biomolecular engineering. *Enzyme Microb. Technol.* **37**, 487–496 (2005)
4. Angermaier L., Simon H.: On nitroaryl reductase activities in several Clostridia. *Biol. Chem.* **364**, 1653–1664 (1983).
5. Arora P.K., Srivastava A., Singh V.P.: Degradation of 4-chloro-3-nitrophenol via a novel intermediate, 4-chlororesorcinol by *Pseudomonas* sp. *JHN. Sci. Rep.* **4**, DOI: 10.1038/srep04475 (2014)
6. Baj J., Markiewicz Z.: *Biologia molekularna bakterii*. PWN, Warszawa, 2006
7. Backhaus T., Froehner K., Altenburger R., Grimme L.H.: Toxicity testing with *Vibrio fishcheri*: a comparison between the long term (24 h) and the short term (30 min) bioassay. *Cheraospher.* **35**, 2925–2938 (1997)
8. BACTrem Sp. z o.o., <http://www.bactrem.pl/> (29-12-2016)
9. Bhattacharya A., Purohit V.C., Suarez V., Tichkule R., Parmer G., Rinaldi F.: One-step reductive amidation of nitro arenes: application in the synthesis of acetaminophen tm. *Tetrahedron Lett.* **47**, 1861–1864 (2006)
10. Bojanowska I.: Bioremediacja metali ciężkich i innych zanieczyszczeń z gleby. Materiały Wykładowe – Zakład Inżynierii Środowiska Wydziału Chemicznego Uniwersytetu Gdańskiego, [www.parasit.ump.edu.pl/seminars/1WL-2/W-3.pdf](http://www.parasit.ump.edu.pl/seminars/1WL-2/W-3.pdf) (04-03-2017)



11. Booth G.: Nitro Compounds, Aromatic (w) Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, red. G. Booth, John Wiley & Sons, New York, 2007, s. 302–349
12. Błaszczak M.K.: Mikroorganizmy w ochronie środowiska. PWN, Warszawa, 2007
13. Bruns-Nagel D., Knicker H., Drzyzga O., Butehorn U., Steinbach K., Gemsa D., Low E.: Characterization of 15 n-TNT residues after an anaerobic/aerobic treatment of soil/molasses mixtures by solid-state 15n nmr spectroscopy.2.systematic investigation of whole soil and different humic fractions. *Environ. Sci. Technol.* **34**, 1549–1556 (2000)
14. Bugg T.D.H.: Dioxygenase enzymes: catalytic mechanisms and chemical models. *Tetrahedron.* **59**, 7075–7101 (2003)
15. Calza P., Massolino C., Pelizzetti E., Minero C.: Solar driven production of toxic halogenated and nitroaromatic compounds in natural seawater. *Sci. Total Environ.* **398**, 196–202 (2008)
16. de Carvalho C.C.: Adaptation of *Rhodococcus* to organic solvents (w) Biology of *Rhodococcus*, red. H.M. Alvarez, Springer, Berlin Heidelberg, 2010, s. 109–131
17. Cho C.M., Mulchandani A., Chen W.: Bacterial cell surface display of organophosphorus hydrolase for selective screening of improved hydrolysis of organophosphate nerve agents. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2026–2030 (2002)
18. Coates J.D., Anderson R.T.: Emerging techniques for anaerobic bioremediation of contaminated environments. *Trends Biotechnol.* **18**, 408–412 (2000)
19. Corbett M.D., Corbett B.R.: Bioorganic chemistry of the aryl-hydroxylamine and nitrosoarene functional groups (w) Biodegradation of nitroaromatic compounds, red. J.C. Spain, Springer US., New York, 1995, s. 151–182
20. Crocker F., Blakeney G., Jung C.: Complete degradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) by a co-culture of *Gordonia* sp. KTR9 and *Methylobacterium* sp. JS178. *Remediation*, DOI: 10.1002/rem.21457 51 (2016)
21. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej 31.05.2008. Komunikat Komisji w sprawie wyników analizy ryzyka i strategii ograniczenia ryzyka stwarzanego przez następujące substancje: 2-nitrotoluen i 2,4-dinitrotoluen (2008/C 134/02).
22. Edwards S.J., Kjellerup B.V.: Applications of biofilms in bioremediation and biotransformation of persistent organic pollutants, pharmaceuticals/personal care products, and heavy metals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 9909–9921 (2013)
23. Environmental Protection Agency's Integrated Risk Information System (IRIS): [https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@na+@rel+Trinitrotoluene \(04-03-2017\)](https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@na+@rel+Trinitrotoluene (04-03-2017))
24. Environmental Protection Agency: Attachment G -list of priority pollutants. [www.waterboards.ca.gov/rwqcb7/board\\_decisions/adopted\\_orders/orders/2005/05\\_0082g.pdf+&cd=1&hl=pl&ct=clnk&gl=pl&client=firefox-b-ab, \(26-12-2016\)](http://www.waterboards.ca.gov/rwqcb7/board_decisions/adopted_orders/orders/2005/05_0082g.pdf+&cd=1&hl=pl&ct=clnk&gl=pl&client=firefox-b-ab, (26-12-2016))
25. Esteve-Núñez A., Caballero A., Ramos J.L.: Biological degradation of 2, 4, 6-trinitrotoluene. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 335–352 (2001)
26. Esteve-Núñez A., Lucchesi G., Philipp B., Schink B., Ramos J.L.: Respiration of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. strain JLR11. *J. Bacteriol.* **182**, 1352–1355 (2000)
27. Esteve-Núñez A., Ramos J.L.: Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. JLR11. *J. Bacteriol.* **32**, 3802–3808 (1998)
28. European Union Risk Assessment Report: Nitrobenzene (2007): [http://ecb.jrc.ec.europa.eu/documents/existing-chemicals/risk\\_assessment/report/nitrobenzenereport305.pdf \(05-03-2017\)](http://ecb.jrc.ec.europa.eu/documents/existing-chemicals/risk_assessment/report/nitrobenzenereport305.pdf (05-03-2017))
29. Eyer P.: Reactions of nitrosobenzene with reduced glutathione. *Chemico-biological interactions*, **24**, 227–239 (1979)
30. Fuller M.E., Manning J.E.J.: Evidence for differential effects of 2,4,6-trinitrotoluene and other munitions compounds on specific subpopulations of soil microbial communities. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**, 2185–2195 (1998)
31. Fuller M.E., Manning J.F.: Aerobic gram-positive and gram-negative bacteria exhibit differential sensitivity to and transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *Curr. Microbiol.* **35**, 77–83 (1997)
32. Funk S.B., Roberts D.J., Crawford D.L., Crawford R.L.: Initial-phase optimization for bioremediation of munition compound-contaminated soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2171–2177 (1993)
33. Gellert G.: Sensitivity and significance of luminescent bacteria in chronic toxicity testing based on growth and bioluminescence. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **45**, 87–91 (2000)
34. Global security: Explosives – Nitroaromatics (TNT [2,4,6-trinitrotoluene]). [www.globalsecurity.org](http://www.globalsecurity.org) (20-12-2016)
35. Gorontzy T., Kuver J., Blotevogel K.-H.: Microbial transformation of nitroaromatic compounds under anaerobic conditions. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 1331–1336 (1993)
36. Guzik U., Wojcieszynska D., Hupert-Kocurek K.: Mikrobiologiczny rozkład związków aromatycznych w warunkach anoksji. *Post. Mikrobiol.* **49**, 217–226 (2010)
37. Guzik U., Wojcieszynska D., Krysiak M., Ślaski U., Biochemii K., Kaczorek K.E.: Mikrobiologiczny rozkład alkanów ropopochodnych wprowadzenie. *NAFTA-GAZ*, **66**, 1019–1027 (2010)
38. Guzik U.: Charakterystyka biochemiczna i genetyczna enzymów z grupy dioksygenaz, uczestniczących w rozkładzie związków aromatycznych, u wybranych szczepów bakterii. Rozprawa doktorska, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski, Katowice, 2007
39. Haghghi-Podeh M.R., Bhattacharya S.K.: Fate and toxic effects of nitrophenols on anaerobic treatment systems. *Water Sci. Technol.* **34**, 345–350 (1996)
40. Hanstein W.G., Hatefi Y.: Trinitrophenol: a membrane-impermeable uncoupler of oxidative phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 288–92 (1974)
41. Hatzinger P. B., Kelsey J. W. R.: Biodegradation (w) Encyclopedia of Soils in the Environment, red. D. Hillel, Elsevier, New York, 2005, s. 250–258
42. Hepworth J.D., Waring D.R., Waring M.J.: Chemia związków aromatycznych. PWN, Warszawa, 2009
43. Hess T., Schmidt S., Silversstein J., Howe B.: Supplemental substrate enhancement of 2,4-dinitrophenol mineralization by a bacterial consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1551–1558 (1990)
44. Islam M.N., Shin M.S., Jo Y.T., Park J.H.: TNT and RDX degradation and extraction from contaminated soil using subcritical water. *Chemosphere*, **119**, 1148–1152 (2015)
45. Johnson G.R., Spain J.C.: Evolution of catabolic pathways for synthetic compounds: bacterial pathways for degradation of 2,4-dinitrotoluene and nitrobenzene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**, 110–123 (2003)
46. Ju K.S., Parales R.E.: Nitroaromatic compounds, from synthesis to biodegradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 250–72 (2010)
47. Kadiyala V., Nadeau L.J.: Construction of *Escherichia coli* strains for conversion of nitroacetophenones to ortho-aminophenols. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 6520–6526 (2003)
48. Kanekar P., Dautpure P., Sarnaik S.: Biodegradation of nitro-explosives. *Indian J. Exp. Biol.* **41**, 991–1001 (2003)
49. Kao C., Lin B., Chen S., Wei S., Yao C., Chien C.: Biodegradation of trinitrotoluene (TNT) by indigenous microorganisms from TNT-contaminated soil, and their application in TNT bioremediation. *Bioremediation J.* **9868**, 1547–6529 (2016)
50. Karlová P., Gelbíčová T., Sedláček I.: Substrate interactions between 4-nitrophenol and 4-nitrotoluene during biodegradation of their mixture. *Desalin. Water Treat.* **57**, 2759–2765 (2016)
51. Karta charakterystyki niebezpiecznej substancji – 4-nitroanilina, zgodnie z Roz. MZ z dnia 03.07.2002 r., PN-ISO 11014-1 i Dyrektywą 91/155/EEC

52. Karta charakterystyki niebezpiecznej substancji – dinitrotoluen, 22 grudnia 2008 r. Na podstawie zał. II do Roz. WE 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 18 grudnia 2006 r.
53. Karta charakterystyki niebezpiecznej substancji – nitrobenzen, zgodnie z Roz. MZ z dnia 03.07.2002 r., PN-ISO 11014-1 i Dyrektywą 91/155/EEC
54. Karta charakterystyki niebezpiecznej substancji MERC – 2,4-dinitrofenol, zgodnie z Roz. WE 1907/2006
55. Karta charakterystyki niebezpiecznej substancji MERC – 2-nitrofenol, zgodnie z Roz. WE 1907/2006
56. Kinouchi T., Yoshinari O.: Purification and characterization of 1-nitropyrene nitroreductases from *Bacteroides fragilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 596–604 (1983)
57. Klausmeier R.E., Osmon J.L., Walls D.R.: The effect of trinitrotoluene on microorganisms. *Dev. Ind. Microbiol.* **15**, 309–317 (1973)
58. Kołwzan B., Adamiak W., Grabas K., Pawelczyk A.: Podstawy mikrobiologii w ochronie środowiska. Oficyna wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2005
59. Krygowski T.M. i wsp.: Chemia – encyklopedia szkolna. WSiP, Warszawa, 2001
60. Kulkarni M., Chaudhari A.: Microbial remediation of nitro-aromatic compounds: an overview. *J. Environ. Manage.* **85**, 496–512 (2007)
61. Kundu D., Hazra C., Chaudhari A.: Bioremediation potential of *Rhodococcus pyridinivorans* NT2 in nitrotoluenes contaminated soils: The effectiveness of natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation approaches. *Soil Sediment Contam.* DOI: 10.1080/15320383.2016.1190313 (2016)
62. Lague D.: China blames oil firm for chemical spill. The New York Times, <http://www.nytimes.com/2005/11/24/world/asia/24iht-harbin.html> (29-12-2016)
63. Lang M., Spittler P., Hellwig V., Steglich W.: Stephanosporin, a “traceless” precursor of 2-chloro-4-nitrophenol in the *Gasteromyces* *Stephanospora caroticolor*. *Angew. Chemie – Int. Ed.* **40**, 1704–1705 (2001)
64. Lewis T.A., Newcombe D.A., Crawford R.L.: Bioremediation of soils contaminated with explosives. *J. Environ. Manage.* **70**, 291–307 (2004)
65. Lin H., Chen X., Ding H., Jia X., Zhao Y.: Isolation and characterization of *Rhodococcus* sp. NB5 capable of degrading a high concentration of nitrobenzene. *J. Basic Microbiol.* **51**, 397–403 (2011)
66. Liu N., Ding F., Wang L., Liu P., Yu X., Ye K.: Coupling of bio-prb and enclosed in-well aeration system for remediation of nitrobenzene and aniline in groundwater. *Env. Sci Pollut Res.* DOI: 10.1007/s11356-016-6206-3 (2016)
67. Maples K.R., Eyer P., Manson R.P.: Aniline-, phenylhydroxylamine-, and hemoglobin thyl free radical formation *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Pharmacol.* **37**, 311–318 (1989)
68. Mason R.P., Holtzman J.L.: The role of catalytic superoxide formation in the o<sub>2</sub> inhibition of nitroreductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **67**, 1267–1274 (1975)
69. McCormick N.G., Feeherry F.E., Levinson H.S.: Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene and other nitroaromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**, 949–958 (1976)
70. McMurry J.: Chemia organiczna. Tom 3. PWN, Warszawa, 2013
71. Nielsen L.E., Nielsen L.E., Nickerson K.W., Nickerson K.W.: Survey of extreme solvent tolerance in gram-positive cocci: membrane fatty acid changes in. *Microbiology*, **71**, 5171–5176 (2005)
72. Nishino N., Atkinson R., Arey J.: Formation of nitro products from the gas-phase oh radical-initiated reactions of toluene, naphthalene, and biphenyl: effect of NO<sub>2</sub> concentration. *Environ. Sci. Technol.* **42**, 9203–9209 (2008)
73. Nishino S.F., Paoli G.C.: Aerobic degradation of dinitrotoluenes and pathway for bacterial degradation of aerobic degradation of dinitrotoluenes and pathway for bacterial degradation of 2, 6-dinitrotoluene. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2139–2147 (2000)
74. Nishino S.F., Spain J.C.: Oxidative pathway for the biodegradation of nitrobenzene by *Comamonas* sp. strain JS765. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2308–2313 (1995)
75. Otto K., Hofstetter K., Röthlisberger M., Witholt B., Schmid A.: Biochemical characterization of styab from *Pseudomonas* sp. strain VLB120 as a two-component flavin-diffusile mono-oxygenase. *J. Bacteriol.* **186**, 5292–5302 (2004)
76. Oves M., Saghir Khan M., Huda Qari A., Nadeen Felemban M., Almeelbi T.: Heavy Metals: Biological Importance and Detoxification Strategies. *J. Bioremediat. Biodegrad.* **7**, DOI: 10.4172/2155-6199.1000334 (2016)
77. Pacheco A.de O., Kagohara E., Andrade L.H., Comasseto J.V., Crusius I.H.S., Paula C.R., Porto A.L.M.: Biotransformations of nitro-aromatic compounds to amines and acetamides by tuberous roots of *Arracacia xanthorrhiza* and *Beta vulgaris* and associated microorganism (*Candida guilliermondii*). *Enzyme Microb. Technol.* **42**, 65–69 (2007)
78. Paracetamol – informacja od wytwórcy: <http://web.archive.org/web/20130407031450/http://www.pharmweb.net/pwmirror/pwy/paracetamol/pharmwebpicg.html> (04-03-2017)
79. Peres C.M., Agathos S.N.: Biodegradation of nitroaromatic pollutants: from pathways to remediation. *Biotechnol. Annu. Rev.* **6**, 197–220 (2000)
80. Peterson J., Mason P., Hovsepian J., Holtzman J.: Oxygen-sensitive and -insensitive nitroreduction by *Escherichia coli* and rat microsomes. *J. Biol. Chem.* **254**, 4009–4014 (1979)
81. Qureshi A., Purohit H.: Isolation of bacterial consortia for degradation of p- nitrophenol from agricultural soil. *Ann. Appl. Biol.* **140**, 159–162 (2002)
82. Radi R.: Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *PNAS*, **101**, 4003–4008 (2003)
83. Ramos J.L., González-Pérez M.M., Caballero A., Dillewijn P. Van: Bioremediation of polynitrated aromatic compounds: plants and microbes put up a fight. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 275–281 (2005)
84. Razo-Flores E., Donlon B., Lettinga G., Field J.A.: Biotransformation and biodegradation of n-substituted aromatics in methanogenic granular sludge. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**, 525–538 (1997)
85. Rieger P.G., Knackmuss H.J.: Basic knowledge and perspectives on biodegradation of 2, 4, 6-trinitrotoluene and related nitroaromatic compounds in contaminated soil (w) Biodegradation of nitroaromatic compounds. red. J.C. Spain, Springer US, New York, 1995, s. 1–18
86. Roldán M.D., Pérez-Reinado E., Castillo F., Moreno-Vivián C.: Reduction of polynitroaromatic compounds: the bacterial nitroreductases. *FEMS Microbiol. Rev.* DOI:10.1111/j.1574-6976.2008.00107.x (2008)
87. Sax I.R., Lewis R.J.: Nitro-compounds of aromatic hydrocarbons. *Dangerous properties of industrial material*, **2**, 2534–2536 (1999)
88. Schrader P.S., Hess T.F.: Bioremediation and biodegradation coupled abiotic-biotic mineralization of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) in soil slurry. *J. Environ. Qual.* **33**, 1202–1209 (2004)
89. Shao P., Yuan X., Liu R., Cao J.P.: Effects of nitrobenzene on liver antioxidant defense system of *Carassius auratus*. *Chem. Res. Chinese Univ.* **26**, 204–209 (2010)
90. Sheu Y.T., Lien P.J., Chen C.C., Chang Y.M., Kao C.M.: Bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated groundwater using unique bacterial strains: microcosm and mechanism studies. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **13**, 1357–1366 (2016)
91. Siciliano S.D., et al.: Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, DOI: 10.1128/AEM.67.6.2469-2475.2001 (2001)

92. Smitha M.S., Singh R., Liu H.-J.: Novel bacillus consortium for degradation of 2,4-dinitrotoluene: a xenobiotic compound. *Br. Microbiol. Res. J.* **15**, 1–10 (2016)
93. Snellinx Z., Taghavi S., Vangronsveld J., Lelie D., Van Der: Microbial consortia that degrade 2,4-DNT by interspecies metabolism: isolation and characterisation. *Biodegradation*, **14**, 19–29 (2003)
94. Somerville C.C., Nishino S.F., Spain J.C.: Purification and characterization of nitrobenzene nitroreductase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45. *J. Bacteriol.* **177**, 3837–3842 (1995)
95. Spain J.C., Hughes J.B., Knackmuss H.J.: Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives. CRC Press, Boca Raton, 2000
96. Spain J.C.: Bacterial degradation of nitroaromatic compounds under aerobic conditions (w) Biodegradation of Nitroaromatic Compounds, red. J.C. Spain, Springer Science+Business Media, New York, 1995, s. 19–35
97. Spain J.C.: Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Annual Rev. Microbiol.* **49**, 523–555 (1995)
98. Spain J.C., Gibson D.T.: Pathway for biodegradation of p-nitrophenol in a *Moraxella* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 812–819 (1991)
99. Suen W.C., Haigler B.E., Spain J.C.: 2,4-dinitrotoluene dioxygenase from *Burkholderia* sp. strain DNT: similarity to naphthalene dioxygenase. *J. Bacteriol.* **178**, 4926–4934 (1996)
100. Talmage S.S., Opresko D.M., Maxwell C.J., Welsh C., Cretella F.M., Reno P.H., Daniel F.B.: Nitroaromatic munition compounds: environmental effects and screening values. *Re. Environ. Contam. Toxicol.* **161**, 1–156 (1999)
101. Travis E.R., Hannink N.K., Van Der Gast C.J., Thompson I.P., Rosser S.J., Bruce N.C.: Impact of transgenic tobacco on trinitrotoluene (TNT) contaminated soil community. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 5854–5861 (2007)
102. Travis A.S.: Manufacture and uses of the anilines: a vast array of processes and products. *Chemistry of Functional Groups*. DOI: 10.1002/9780470682531.pat0395 (2007)
103. Tyagi M., da Fonseca M.M.R., de Carvalho C.C.C.R.: Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, **22**, 231–241 (2011)
104. Unell M., Kabelitz N., Jansson J.K., Heipieper H.J.: Adaptation of the psychrotroph *Arthrobacter chlorophenicus* A6 to growth temperature and the presence of phenols by changes in the anteiso/iso ratio of branched fatty acids. *FEMS Microbiol. Lett.* **266**, 138–143 (2007)
105. Vaillancourt E.H., Bolin J.T., Eltis L.D.: The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**, 241–267 (2006)
106. Vorbeck C., Lenke H., Fischer P., Knackmuss H.J.: Identification of a hydride-meisenheimer complex as a metabolite of 2,4,6-trinitrotoluene by a mycobacterium strain. *J. Bacteriol.* **176**, 932–934, 1994
107. Wakefield J.C.: Nitrobenzene toxicological overview. Health Protection Agency, [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/338243/hpa\\_nitrobenzene\\_toxicological\\_overview\\_v1.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/338243/hpa_nitrobenzene_toxicological_overview_v1.pdf) (20-12-2016)
108. World Health Organization: Nitrobenzene. Environmental health criteria 230. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc230.htm> (19.12.2016)
109. Widrig D.L., Boopathy R., Manning J.F.: Bioremediation of TNT-contaminated soil: a laboratory study. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 1141–1148 (1997)
110. Winkler R., Hertweck C.: Biosynthesis of nitro compounds. *Chem. BioChem.* **8**, 973–977 (2007)
111. Williamson K.L.: Macroscale and microscale organic experiments. Houghton-Mifflin, Boston, 2002
112. World Health Organization: International Programme on Chemical Safety, <http://www.inchem.org/pages/ehc.html> (04-03-2017)
113. Wójcik P., Tomaszewska B.: Biotechnologia w remediacji zanieczyszczeń organicznych. *Biotechnologia*, **4**, 156–172 (2005)
114. Wu Z., Liu Y., Liu H., Xia Y., Shen W., Hong Q., Li S., Yao H.: Characterization of the nitrobenzene-degrading strain *Pseudomonas* sp. A3 and use of its immobilized cells in the treatment of mixed aromatics wastewater. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 2679–2687 (2012)
115. Zeyer J., Kocher H.P., Timmis K.N.: Influence of para-substituents on the oxidative metabolism of o-nitrophenols by *Pseudomonas putida* B2. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 334–339 (1986)
116. Ziegenfuss P.S., Williams R.T., Weston R.F., Chester W., Myler C.A.: Hazardous materials compostion. *J. Hazard. Mater.* **28**, 91–99 (1991)

Anna Kisiel<sup>1\*</sup>, Ewa Kępczyńska<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra Biotechnologii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński

Wpłynęło w styczniu 2017 r.  
Zaakceptowano w marcu 2017 r.

1. Wprowadzenie. 2. Źródła chityny i jej struktura. 3. Chitynazy – budowa i działanie. 4. Bakterie produkujące chitynazy. 5. Rola chitynaz bakteryjnych w biotechnologii zielonej. 6. Wykorzystanie chitynaz w biotechnologii białej. 7. Wykorzystanie chitynaz w biotechnologii czerwonej. 8. Podsumowanie

### Bacterial chitinases and their application in biotechnology

**Abstract:** Chitin, an insoluble linear  $\beta$ -1,4-linked polymer of *N*-acetylglucosamine, is the second most abundant polysaccharide in nature after cellulose. It is present in cell walls of several fungi, exoskeletons of insects and crustacean shells. Enzymatic hydrolysis of this polysaccharide is carried out in the presence of glycoside hydrolases-chitinases. They are produced by microorganisms, insects, plants, and animal, but it is the bacterial chitinases which play a fundamental role in degradation of the chitin. Chitinases and their products, chito-oligomers, have been of interest in recent years due to their wide range of applications in agriculture, medicine and industry. This review focuses on the enzymatic properties of the bacterial chitinases and their potential applications in various kinds of biotechnology.

1. Introduction. 2. Sources of chitin and its structure. 3. Chitinases – structure and function. 4. Chitinase – producing bacteria. 5. The role of bacterial chitinases in green biotechnology. 6. Application of chitinases in white biotechnology. 7. Application of chitinases in red biotechnology. 8. Summary

**Słowa kluczowe:** *N*-acetyloglukozamina, bakterie chitynolityczne, biofungicydy, bioinsektycydy, chityna, chitynazy, zwalczanie biologiczne  
**Key words:** *N*-acetylglucosamine, chitinolytic bacterial, biofungicides, bioinsecticides, chitin, chitinases, biological control

## 1. Wprowadzenie

Obecnie biotechnologia mikroorganizmów to główny komponent globalnego przemysłu głównie farmaceutycznego, spożywczego, chemicznego i rolniczego. Dzięki zdolnościom do przeprowadzania procesów syntezy i degradacji różnego rodzaju związków mikroorganizmy stały się obiektem zainteresowania między innymi biotechnologii zielonej, czerwonej i białej. Odgrywają kluczową rolę w degradacji biopolimerów odnawialnych, takich jak celuloza, hemiceluloza, lignina i chityna, do prostych oligomerów czy cukrów monomerycznych, które mogą zostać wykorzystane bezpośrednio w przemyśle ale mogą też być dalej metabolizowane przez mikroorganizmy. Spośród tych surowców odnawialnych chityna jest niezwykle wartościowym biopolimerem, drugim po celulozie pod względem występowania w przyrodzie ( $10^{10}$ – $10^{11}$  ton rocznie), stanowiącym bogate źródło węgla i azotu. Jest homopolimerem prostego cukru (*N*-acetyloglukozaminy) i wymaga specyficznych enzymów, chitynaz, do jej hydrolizy. Produkty hydrolizy mogą znaleźć zastosowanie m.in. w rolnictwie, przemyśle spożywczym, farmacji, medycynie czy gospodarce odpadami. Głównym źródłem chitynaz są drobnoustroje, które chitynę wykorzystują jako źródło składników pokarmowych [11]. Enzymy

te występują również u roślin, gdzie pełnią różne funkcje podczas wzrostu i rozwoju [42]. Spełniają również funkcję obronną przed patogenami grzybowymi nie tylko u roślin [36], ale również u zwierząt [9], a podczas infekcji wywołanej przez wirusy, bakterie czy grzyby uznawane są za czynniki wirulencji [21, 52].

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie wiedzy na temat chitynaz produkowanych przez bakterie oraz ich wykorzystania w różnych działach biotechnologii.

## 2. Źródła chityny i jej struktura

Chityna razem z celulozą należy do najczęściej występujących w przyrodzie polimerów. Jest składnikiem ścian komórkowych grzybów, egzoszkieletów i osłonek jaj stawonogów (owadów i skorupiaków), powłok nicieni, a także muszli mięczaków. Występuje głównie w kompleksach z białkami lub innymi polisacharydami, jak np.  $\beta$ -1,3-glukanem, będącym również budulcem ścian komórkowych grzybów [36]. Skorupki stanowią potencjalnie największe źródło chityny, co warto podkreślić, uznawanej za odpad poprodukcyjny stanowiący nawet 75% całkowitej wagi skorupiaków takich jak kraby, krewetki i kryl. Sucha masa chityny w tych odpadach stanowi od 20% do 58%, a zatem

\* Autor korespondencyjny: Katedra Biotechnologii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński, ul. Wąska 13, 71-415 Szczecin; tel. (91) 444 15 55; e-mail: anna.kisiel@univ.szczecin.pl

jest wartym zainteresowania surowcem odnawialnym, który w porównaniu do celulozy, jest nie tylko bogatym źródłem węgla, ale także i azotu [25, 52].

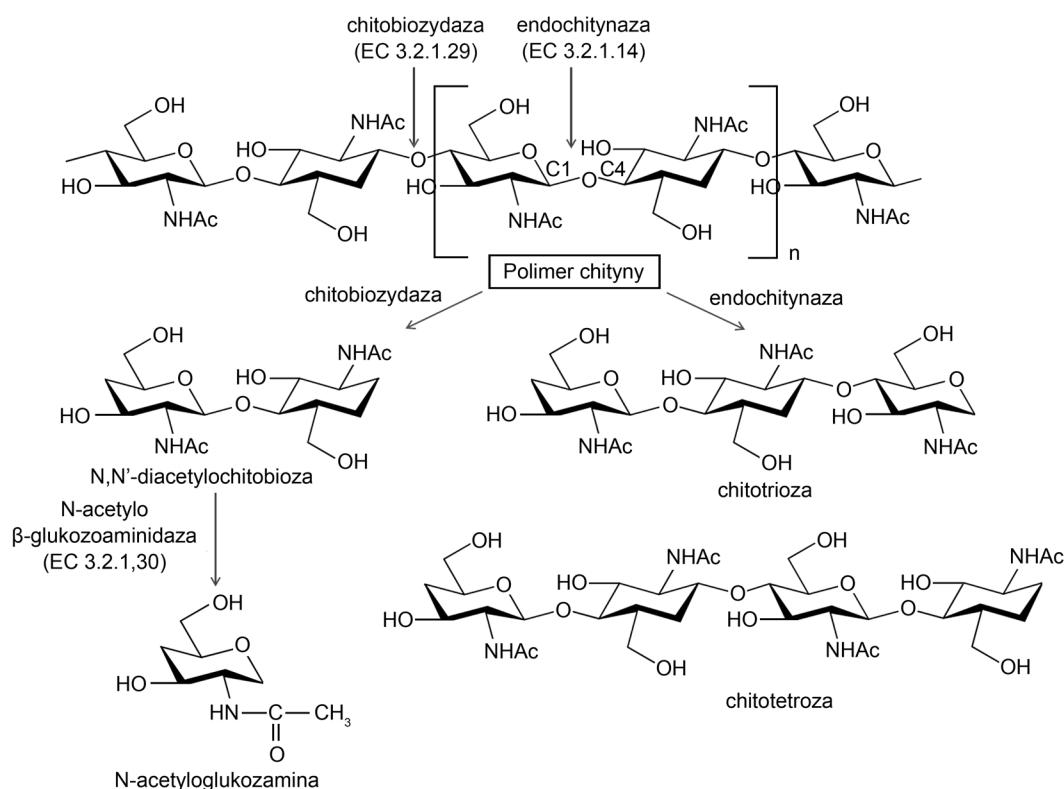
Chityna jest nierozgałęzionym polimerem  $\beta$ -1,4-*N*-acetylglukozaminy (GlcNAc), połączonej wiązaniami  $\beta$ -1,4-glikozydowymi. Jest ona swą budową zbliżona do celulozy jednak zamiast grupy hydroksylowej (-OH) przy C2 posiada grupę acetyloaminową (NH.CO.CH<sub>3</sub>). Jest to polisacharyd krystaliczny występujący w naturze w trzech postaciach:  $\alpha$ -chityny,  $\beta$ -chityny i  $\gamma$ -chityny [43].  $\alpha$ -Chityna jest najbardziej rozpowszechnioną, izomorficzną i zwartą formą ze względu na antyrównoległe rozmieszczenie łańcuchów chityny, co sprzyja tworzeniu silnych wiązań wodorowych.  $\beta$ -Chityna jest luźno upakowana, a łańcuchy ułożone są w sposób równoległy, w większej odległości od siebie, o słabszych siłach międzycząsteczkowych, które powodują, że jest to forma mniej stabilna [62]. Ponadto nie jest możliwa synteza  $\beta$ -chityny z roztworu w warunkach *in vitro* [88]. Mieszaniną obu tych form jest natomiast polimorficzna  $\gamma$ -chityna.

### 3. Chitynazy – budowa i działanie

Chitynazy, są szeroko rozpowszechnionymi białkami enzymatycznymi należącymi do większej grupy enzymatycznej – hydrolaz glikozydowych (GH). Do tej grupy należą wszystkie enzymy hydrolizujące wiązania glikozydowe w polisacharydach, oligosacharydach i glikozydach. Jest to bardzo liczna grupa i w oparciu

o sekwencje aminokwasowe ich domen katalitycznych podzielono je na ponad 115 rodzin. Chitynazy przyporządkowano do rodziny 18, 19, 20 i 48 hydrolaz glikozydowych [36, 42].

Chitynaza katalizuje hydrolizę wiązań  $\beta$ -glikozydowych pomiędzy węglem C1 i C4 dwóch sąsiednich *N*-acetylglukozamin w łańcuchu chityny – Rys. 1 [18, 57]. Ze względu na mechanizm działania wyodrębniono dwa rodzaje chitynaz: endochitynazy (EC 3.2.1.14) i egzochitynazy (EC 3.2.1.52) [65, 67]. Endochitynazy rozszczepiają wiązania losowo wewnątrz polimeru chityny, tworząc rozpuszczalne oligomery *N*-acetylglukozaminy (GlcNAc), o małej masie cząsteczkowej, takie jak chitotetroza, chitotrioza i dimer *N,N'*-diacetylchitobioza. Natomiast egzochitynazy możemy podzielić na dwie podkategorie: chitobiozydazy (EC 3.2.1.29), obecnie zwane też *N*-acetyloheksozaminidazami (EC 3.2.1.52), które katalizują stopniowe uwalnianie *N,N'*-diacetylchitobiozy działając od niezredukowanego końca mikrofibryli chityny oraz 1-4- $\beta$ -*N*-acetylglukozaaminidazy (EC 3.2.1.30), które rozszczepiają produkty oligomeryczne powstałe w wyniku działania endochitynaz i chitobiozozaz generując przy tym monomery GlcNAc bez mono- lub oligosacharydów [11, 55, 57] (Rys. 1). Bakterie mają zdolność do całkowitej degradacji chityny. Powstałe we wcześniejszych etapach hydrolizy chityny cząsteczki *N*-acetylglukozaminy są hydrolizowane przez transferazę acetylglukozaminy do glukozaminy, a następnie do



Rys. 1. Enzymatyczna hydroliza chityny

octanu, amoniaku i fruktozo-6-fosforanu dzięki obecności transferazy glukozamino-6-fosforanu [12, 37].

Wiele organizmów ma zdolność do syntezy enzymów chitynolitycznych. Na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasowych chitynaz z różnych organizmów zostały podzielone na pięć podstawowych klas i przypisane do rodziny 18, 19 i 20 hydrolaz glikozyliwych. Bakterie wytwarzają chitynazy należące głównie do rodziny GH 18 a niektóre bakterie z rodzaju *Streptomyces* do GH 19 [44]. Do rodziny GH 18 zaliczane są również wszystkie chitynazy grzybowe [29], podobnie jak chitynazy wytwarzane przez owady [91]. Sekwencje kodujące chitynazy z tej rodziny są również szeroko rozpowszechnione u wirusów oraz u zwierząt i roślin wyższych. Natomiast chitynazy z rodziny GH 19 występują głównie u roślin wyższych i jak już wspomniano u niektórych bakterii [36, 42]. Uważa się, że różne jest pochodzenie tych 2 rodzin hydrolaz ponieważ różnią się sekwencją aminokwasową, strukturą trójwymiarową (3D), oraz mechanizmem molekularnym reakcji katalitycznych [56, 86]. Chitynazy zaklasyfikowano jako enzymy zachowujące (GH 18) lub inwertujące (GH 19) konfigurację na anomerycznym atomie węgla w powstałym produkcie [6]. Do rodziny 20 hydrolaz glikozydowych należą *N*-acetyloglukozaminidazy bakteryjne, grzybowe lub ludzkie [13, 57].

Struktura chitynaz bakteryjnych złożona jest z sekwencji sygnałnej, domeny katalitycznej, domeny wiążącej chitynę oraz domeny fibronektyny III lub regionu bogatego w serynę bądź treoninę [57]. Domeny katalityczne odgrywają główną rolę w procesie hydrolizy chityny, jednak w zależności od rodziny hydrolaz różnią się strukturą przestrzenną. Bakteryjne chitynazy z rodziny GH 18 posiadają domenę katalityczną (CatD-catalytic domain) w formie 8 fałdowań typu ( $\beta/\alpha$ ) TIM-barrel (beczułka) z resztami katalitycznymi na  $\beta$ -końcu nr 4; domeny wiążącej chitynę (CHBD -chitin-binding domain); a także domeny fibronektyny III (fibronectins III domain – FnIII) lub kadheryny. Z kolei domeny katalityczne chitynaz należących do GH 19 są bogate w struktury  $\alpha$ -helikalne [38]. Obecność domeny wiążącej chitynę zwiększa powinowactwo do substratu i wydajność hydrolizy chityny, co wskazuje na kluczową rolę tych domen [51]. Domeny FnIII, natomiast nie wydają się być bezpośrednio zaangażowane w wiązanie chityny, ale mogą być istotne dla aktywności enzymu, prawdopodobnie wpływając na jego właściwości i strukturę oraz lokalizację przestrzenną domeny katalitycznej i domeny wiążącej chitynę [88].

W oparciu o homologię sekwencji oraz różnice w strukturze chitynazy z rodziny GH 18 zostały podzielone na trzy podrodziny A, B, i C. Podrodzina A posiada dodatkowy region fałdowania  $\beta+\alpha$ , który pogłębia szczelinę centrum aktywnego. Takiego dodatkowego regionu nie posiadają podrodziny B i C [75].

Chitynazy są bardzo zróżnicowaną grupą enzymów. Różnią się od siebie rozmiarem, od 20 kDa do około 120 kDa przy czym wielkość większości bakteryjnych chitynaz mieści się w zakresie od ~20 do 60 kDa. Dla porównania wielkość chitynaz roślinnych mieści się w zakresie ~25–40 kDa, natomiast owadzych w zakresie ~40–85 kDa. Również optimum temperaturowe i pH ich działania jest bardzo zróżnicowane i zależy głównie od źródła pozyskania bakterii. Optymalna temperatura działania chitynaz bakteryjnych waha się zwykle w przedziale 40–50°C, choć chitynazy z *Streptomyces* sp. M-20 działają w 30°C [40], a chitynazy termostabilne mogą działać nawet w 80°C, jak chitynaza z *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 [81]. Większość chitynaz optimum aktywności osiąga w pH kwaśnym lub obojętnym, ale wiele bakterii produkuje enzymy działające nawet w zakresie pH od 8 do 10, w tym wcześniej już wspomniany *S. thermoviolaceus* OPC-520 [81].

Tak szerokie spektrum temperatur i pH w ramach których chitynazy bakteryjne wykazują optimum aktywności stwarza duży problem z określeniem poziomu tej aktywności, ale przede wszystkim daje możliwość ich szerokiego aplikacyjnego zastosowania do różnych procesów zachodzących w odmiennych warunkach.

#### 4. Pozyskanie chitynaz bakteryjnych, optymalizacja warunków hydrolizy i oznaczanie aktywności

Isolacja ze środowiska bakterii produkujących chitynazy nie jest procesem skomplikowanym, ponieważ polega głównie na dodaniu chityny koloidalnej do podłoży izolacyjnych. Najczęściej bakterie chitynolityczne izolowane są z gleby. Przy czym Gram-dodatnie promieniowce (*Actinomycetes*), w szczególności te należące do rodzaju *Streptomyces* są potencjalnie największym źródłem zewnątrzkomórkowych endo- i egzochitynaz. Oprócz promieniowców obecność chitynaz stwierdzono również u bakterii z rodzaju *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, a także *Vibrio* czy *Stenotrophomonas* [21, 52].

Wykazanie obecności chitynaz u bakterii jest pierwszym etapem w długotrwałym procesie jakim jest optymalizacja warunków działania enzymu, co jest konieczne do określenia jego potencjału aplikacyjnego. Jak już wspomniano jest to grupa enzymów bardzo zróżnicowania pod względem optimum działania. Dlatego konieczne jest dopracowanie warunków reakcji enzymatycznej w celu uzyskania jak największej wydajności. Zwiększenie aktywności chitynaz bakteryjnych uzyskuje się poprzez dodatek do pożywek substratów dla chitynazy, chityny koloidalnej, chito-oligosacharydów czy elementów ścian komórkowych grzybów, a nawet *N*-acetyloglukozaminy [24, 26]. Gomaa [24] wykazał, że na aktywność chitynaz u *Bacillus thurin-*

*giensis* i *Bacillus licheniformis* wpływ mają czas i temperatura inkubacji, pH pożywki, stężenie substratu. Najwyższą aktywność tego enzymu stwierdzono w 5 dniu inkubacji. Taką samą zależność zaobserwowano dla *Streptomyces* sp. NK1057 [54]. Opóźnienie takie może wynikać z faktu, że chityna jest związkiem o wysokiej masie cząsteczkowej i organizmy potrzebują dłuższego czasu do jego rozłożenia. Wielokrotnie również potwierdzono wpływ zastosowania różnych źródeł węgla czy azotu na aktywność chitynolityczną. Generalnie dodatek glukozy jest uznawany za represor syntezy chitynaz, w tym również ekspresji genów kodujących te enzymy [19]. Z kolei dodatek organicznego źródła azotu, jak np. kazeiny odbija się korzystniej na aktywności chitynaz niż zastosowanie związków nieorganicznych [24, 83]. Dopasowanie składu pożywek oraz warunków hodowli (temperatura i pH) może spowodować nawet 20-krotny wzrost aktywności chitynaz [24].

Aktywność chitynaz oznaczana jest różnymi metodami przy czym najczęściej wykorzystywana jest metoda kolorymetryczna, wiskozymetryczna i radiochemiczna. Metoda kolorymetryczna oparta jest na określaniu monomerów *N*-acetylo-*D*-glukozaminy, uwalnianych z koloidalnej chityny w warunkach utleniających. Najczęściej stosowanym sposobem mierzenia zawartości cukrów redukujących jest metoda Schales z kwasem 3,5-dinitrosalicylowym (DNS) i żelazocyjankiem [68]. Następnie spektrofotometrycznie można oznaczyć zmianę zabarwienia wynikającą z redukcji żelazocyjanku. Jest to metoda stosunkowo prosta, ale posiada wiele wad, jak niewrażliwość przy niskich stężeniach, niska specyficzność, a ponadto długi czas reakcji, czy konieczność podgrzewania mieszaniny reakcyjnej, które z kolei utrudniają zastosowanie tej metody w badaniach wysokoprzepustowych [20]. W metodzie wiskozymetrycznej aktywność chitynazy ocenia się poprzez monitorowanie zmian lepkości rozpuszczonych pochodnych chityny, takich jak glikol etylenowy chityny, karboksymetylochityna i 6-*O*-hydroksypropylochityna. Metoda ta jest bardziej czuła do oznaczania aktywności endochitynaz niż inne metody, jednak jej skuteczność silnie zależy od stopnia polimeryzacji substratów jak i siły jonowej i pH roztworu [32]. Metoda radiochemiczna wykorzystuje znakowaną trytem chitynę. Aktywność chitynazy bada się przez ustalenie radioaktywności powstałych rozpuszczalnych w wodzie, chito-oligosacharydów. Jest to najbardziej czuły sposób jednak wymagający specjalistycznego sprzętu. Do oceny aktywności chitynaz możliwe jest również wykorzystanie detekcji substratu i produktów działania enzymu opartą o spektrometrię masową z jonizacją próbki (MALDI-TOFF MS). Jest to metoda najbardziej wydajna, ponieważ wymaga jedynie 2 µl próby, jest wysokoprzepustowa i w związku z tym można ją wykorzystać na skalę przemysłową [60].

## 5. Rola chitynaz bakteryjnych w biotechnologii zielonej

Bakterie zdolne do hydrolizy chityny mogą być wykorzystane w biotechnologii zielonej jako biopestycydy do zwalczania grzybów (biofungicydy) oraz owadów (bioinsektycydy).

### Biofungicydy

Wiadomo, że grzyby należą do najgroźniejszych czynników chorobotwórczych powodujących ogromne straty w rolnictwie. W celu ograniczenia ich rozwoju stosuje się powszechnie syntetyczne związki chemiczne zwane fungicydami. Alternatywą dla nich są biofungicydy, do których zalicza się mikroorganizmy. Mogą one ograniczyć rozwój chorób grzybowych poprzez produkcję substancji biologicznie czynnych, w tym również enzymów trawiących ściany komórkowe grzybów. Do mikroorganizmów wykorzystujących ten mechanizm należy zaliczyć bakterie produkujące chitynazy zdolne do zwalczania grzybów [69, 76] należących do rodzajów: *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Rhizoctonia* *Phytophthora*, *Pythium* czy *Colletotrichum*, powodujących duże straty w rolnictwie. Wśród bakterii najczęściej wykorzystywanych jako biofungicydy występują bakterie z rodzaju *Streptomyces*, *Bacillus* czy *Pseudomonas* (Tab. I).

Prapagdee i wsp. [59] wykazali ograniczenie rozwoju grzybów *Colletotrichum gloeosporioides* i *Sclerotium rolfsii* wykorzystując przesącz kultury wyizolowanego z ryzosfery szczepu *Streptomyces hygrosopicus* SRA14, głównie ze względu na obecność zewnątrzkomórkowej chitynazy. Nagpure i wsp. [53] potwierdzili, że szczep *Streptomyces* sp. MT7, zdolny do produkcji chitynaz był skuteczny w ograniczeniu rozwoju grzybów powodujących gnienie drewna. Choudhary i wsp. [10] wykazali, że szczep *S. exfoliatus* MT9 ogranicza rozwój wielu patogenów owoców. Również wiele bakterii z rodzaju *Bacillus* hamuje wzrost grzybów wykorzystując do tego celu chitynazy. Na przykład, *B. thuringiensis* spp. *colmeri* hamował wzrost wielu fitopatogenów m.in., *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium glaucum* i *Sclerotinia fuckeliana* [47]. Chitynazy z *Bacillus cereus* QQ 308 hamowały wzrost patogenicznych grzybów, takich jak *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* oraz *Pythium ultimum* [8]. Inny szczep *B. cereus* CH2 dzięki chitynazom hamował kiełkowanie zarodników *Verticillium dahliae*, co uniemożliwiło dalszy rozwój tego grzyba i zabezpieczyło bakłażana przed wędnięciem naczyniowym wywoływanym przez tego grzyba [45]. Inny szczep z tego samego gatunku *B. cereus* IO8, jak i *B. thuringiensis* UM96 hamował rozwój powszechnie występującego *B. cinerea* odpowiedzialnego za gnienie owoców i obumieranie kwiatów [28, 49]. Również szczepy należące do *B. circulans* czy *B. pumilus* mają

Tabela I  
Bakterie produkujące chitynazy i ich wykorzystanie do zwalczania patogenów grzybowych (biofungicydy)

Bakterie	Patogen grzybowy	Piśmiennictwo
<i>Streptomyces</i> sp. M-20	<i>Botrytis cinerea</i>	[40]
<i>Streptomyces</i> sp. MT7	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Schizophyllum commune</i> , <i>Gleophyllum trabeum</i> , <i>Polyporus agaricans</i> , <i>Polyporus friabilis</i> , <i>Coriolus versicolor</i> , <i>Postia placenta</i>	[53]
<i>Streptomyces</i> sp. NK1057	<i>Fusarium oxysporum</i>	[54]
<i>Streptomyces exfoliatus</i> MT9	m.in. grzyby z rodzajów <i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Botryodiplodia</i> , <i>Colletotrichum</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Geotrichum</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Phoma</i> , <i>Rhizopus</i>	[10]
<i>Streptomyces griseus</i>	<i>Fusarium solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>Colletotrichum dematium</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i>	[61]
<i>Streptomyces viridificans</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Colletotrichum dematium</i>	[26]
<i>Streptomyces hygroscopicus</i> SRA14	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i>	[59]
<i>Bacillus thuringiensis</i> NM101-19	m.in. grzyby z rodzajów <i>Rhizoctonia</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Pythium</i>	[24]
<i>Bacillus thuringiensis</i> spp. colmeri	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>P. piricola</i> , <i>P. glaucum</i> , <i>Sclerotinia fuckeliana</i>	[47]
<i>Bacillus thuringiensis</i> UM96	<i>Botrytis cinerea</i>	[49]
<i>Bacillus licheniformis</i> NM120-17	m.in. grzyby z rodzajów <i>Rhizoctonia</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Pythium</i>	[24]
<i>Bacillus circulans</i> GRS 243	<i>Phaeoisariopsis personata</i>	[41]
<i>Bacillus cereus</i> CH2	<i>Verticillium dahliae</i>	[45]
<i>Bacillus cereus</i> IO8	<i>Botrytis cinerea</i>	[28]
<i>Bacillus cereus</i> YQQ 308	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>Pythium ultimum</i>	[8]
<i>Bacillus pumilus</i> SG2	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Magnaporthe grisea</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Bipolaris</i> sp.	[23]
Fluorescencyjne <i>Pseudomonas</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> fa. sp. <i>dianthi</i>	[2]
Fluorescencyjne <i>Pseudomonas</i>	<i>Phytophthora capsici</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>	[3]
Fluorescencyjne <i>Pseudomonas</i>	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Diaporthe phaseolorum</i> , <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	[30]
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>	[70]
<i>Vibrio pacini</i>	<i>Mucor racemosus</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Zygorhynchus heterogynus</i> , <i>Candida albicans</i>	[4]
<i>Enterobacter</i> sp. NRG4	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Mucor rouxi</i> , <i>Rhizopus nigricans</i>	[14]
<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Curvularia lunata</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. udum</i>	[73]
<i>Aeromonas hydrophila</i> SBK1	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Fusarium oxysporum</i>	[27]
<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i>	[33]
<i>Alcaligenes xylosoxydans</i>	<i>Fusarium udum</i> , <i>Rhizoctonia bataticola</i>	[83]
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	[74]
<i>Serratia marcescens</i> GPS 5	<i>Phaeoisariopsis personata</i>	[41]
<i>Serratia marcescens</i> B2	<i>Botrytis cinerea</i>	[72]

zdolność do hamowania rozwoju patogenów grzybowych wywołujących m.in. wędnięcie czy zgnilizny [23, 41]. Innym bogatym źródłem chitynaz są bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, a w szczególności szczepy fluorescencyjne. Chitynazy z bakterii fluorescencyjnych z rodzaju *Pseudomonas* jak i same bakterie zapobiegały rozprzestrzenianiu *F. oxysporum* fa. sp. *dianthi*, grzyba powodującego wędnięcie goździka [2] oraz grzybów *B. capsici cinerea*, *R. solani*, *Diaporthe phaseolorum* i *Colletotrichum lindemuthianum* wywołujących m.in.

zgnilizny, raki czy antraknozy [30]. Chitynazy produkowane przez szczepy *Pseudomonas* wyizolowane z ryzofery ciecierzycy (*Cicer arietinum* L.) i fasoli złotej (*Vigna radiata* L.) wykazały zdolność hamowania wzrostu grzybni *Pythium aphanidermatum* i *R. solani* w warunkach *in vitro* [70]. Stwierdzono również synergiczny efekt chitynaz oraz  $\beta$ -1,3-glukanaz wytwarzanych przez fluorescencyjne szczepy *Pseudomonas* na zahamowanie wzrostu grzybów *Phytophthora capsici* czy *R. solani* wywołujących zgnilizny [3]. Przeciwgrzybowe



działanie chitynaz wykazano również u szczepów bakterii należących do innych rodzajów, np. *Vibrio pacini* [4], *Enterobacter* sp. NRG4 [14], *Serratia marcescens* [41, 72], *Rhizobium* sp. [73], *Aeromonas hydrophila* SBK1 [27], *Stenotrophomonas maltophilia* [74] czy *Aeromonas caviae* [33].

### Bioinsektycydy

Aktualnie do walki ze szkodliwymi owadami najpowszechniej stosowane są syntetyczne insektycydy o wysokiej klasie toksyczności (I, II, III klasa), co stwarza zagrożenie dla środowiska w tym roślin, zwierząt i ludzi. Istnieje zatem wielka potrzeba opracowania skutecznych ale bezpiecznych metod zwalczania owadów. Bakterie produkujące chitynazy mogą być przydatne w opracowaniu bezpiecznych bioinsektycydów, gdyż dzięki chitynazom, „hydrolizującym główny komponent ciała owadów, są w stanie uniemożliwić ich rozwój. Chociaż najczęściej wykorzystywane są w tym celu chitynazy produkowane przez grzyby, szczególnie te atakujące owady, to jednak istnieją doniesienia o wykorzystaniu chitynaz bakteryjnych (Tab. II).

Bakterie stanowią bardzo atrakcyjną alternatywę dla grzybów owadobójczych ze względu na ich szybsze tempo namnażania, a w konsekwencji zwiększenie szybkości zabijania owadów. Owadobójcze działanie chitynaz polega głównie na wspomaganie i synergistycznym działaniu z produkowanymi przez bakterie toksynami. Przykładem takiego działania może być *Bacillus sphaericus*, który z powodzeniem stosowany jest od lat do zwalczania komarów. Jego skuteczność w niszczeniu larw komarów jest związana z produkcją krystalicznych toksyn binarnych [58]. Chitynaza z *B. sphaericus* może wspomagać toksyczność toksyny binarnej przeciwko larwom szkodnika światłówki *Spodoptera exigua* [48]. Endochitynaza ChiAII z *S. marcescens* podobnie jak same bakterie w połączeniu z białkiem endotoksyny CryIc z *B. thuringiensis* również wykazują wysokie działanie owadobójcze wobec larw tego szkodnika [1, 63]. Białka o aktywności chitynolitycznej wyizolowano z pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (outer membrane vesicles – OMV) produkowanych przez bakterie *Photorhabdus luminescens akhurstii* oraz *Xenorhab-*

*dus nematophilus* i wykazano ich aktywność bójczą przeciwko larwom słonecznicy orężówki po podaniu doustnym [39]. Skuteczne okazało się zastosowanie chitynaz produkowanych przez trzy szczepy promieniowców przeciwko *Drosophila melanogaster* w wyniku zakłócania tworzenia stadium poczwarki [22]. Badania przeprowadzone na entomopatogenicznych bakteriach *B. thuringiensis* skupiają się głównie na określaniu skuteczności pod względem dawki letalnej i wrażliwości poszczególnych stadiów rozwoju takich owadów jak tantniś krzyżowiaczek (*Plutella xylostella*), słonecznica orężówka (*Helicoverpa armigera*) czy *Compsilura concinnata* [16–17, 50].

Reasumując, bakterie chitynolityczne w charakterze biofungicydów czy bioinsektycydów w szeroko pojętym rolnictwie stanowią alternatywę dla chemicznych syntetycznych środków ochrony roślin. Co więcej, dzięki inżynierii genetycznej udało się uzyskać rośliny transgeniczne z przeniesionymi z bakterii genami kodującymi chitynazy, co zwiększyło ich odporność na patogeny grzybowe. Rośliny ryżu, do których wprowadzono gen *chiC* kodujący bakteryjną chitynazę z rodziny GH19 były morfologicznie normalne i płodne, a dodatkowo charakteryzowały się zwiększoną odpornością na *Magnaporthe grisea* powodującą choroby liści [34]. Wprowadzenie do pszenicy genu kodującego chitynazę z *Pseudomonas fluorescens* P5 spowodowało zwiększenie odporności tej rośliny na *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, a także ryżu i bawełny na *R. solani* [87]. W ostatnich latach zmieniło się jednak nastawienie do roślin transgenicznych dlatego ważniejsze wydaje się skupienie uwagi na możliwości zastosowania chitynaz jako biopestycydów do bezpośredniej ochrony roślin.

### 6. Wykorzystanie chitynaz w biotechnologii białej

Chitynazy mogą też znaleźć zastosowanie w biotechnologii przemysłowej nazywanej białą, zajmującej się przetwarzaniem surowców odnawialnych, między innymi takich jak chityna.

Źródłem chityny jak już wspomniano są owoce morza w postaci odpadów poprodukcyjnych. Na te

Tabela II  
Bakterie chitynolityczne wykorzystywane do zwalczania owadów

Bakteria	Owady	Piśmiennictwo
<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Drosophila melanogaster</i>	[22]
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Plutella xylostella</i> , <i>Compsilura concinnata</i> , <i>Helicoverpa armigera</i>	[16, 17, 50]
<i>Bacillus sphaericus</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i>	[5]
<i>Bacillus sphaericus</i> DL5789	<i>Spodoptera exigua</i>	[48]
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Spodoptera littoralis</i>	[63]
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Spodoptera littoralis</i>	[1]

Tabela III  
Bakterie chitynolityczne wykorzystywane w biotechnologii białej

Bakterie	Proces	Surowiec	Piśmiennictwo
<i>Bacillus subtilis</i>	biodegradacja odpadów	pancerzyki skorupiaków	[7]
<i>Bacillus cereus</i> TKU006	biodegradacja odpadów	pancerzyki skorupiaków	[85]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> K-187	biodegradacja odpadów	pancerzyki skorupiaków	[84]
<i>Streptomyces</i> sp.	uzyskiwanie protoplastów	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Fusarium solani</i>	[71]
<i>Streptomyces cyaneus</i> SP-27	uzyskiwanie protoplastów	<i>Schizophyllum commune</i>	[89]
<i>Bacillus circulans</i> WL-12	uzyskiwanie protoplastów	<i>Phaffia rhodozymba</i>	[35]
<i>Bacillus circulans</i> KA-304	uzyskiwanie protoplastów	<i>Schizophyllum commune</i>	[90]
<i>Enterobacter</i> sp. NRG4	uzyskiwanie protoplastów	<i>Trichoderma reesei</i> , <i>Pleurotus florida</i> , <i>Agaricus bisporus</i> , <i>A. niger</i>	[14]

odpady składają się głównie panczerzyki skorupiaków, takich jak krewetki czy kraby. Ich degradacja zmniejsza zanieczyszczenie środowiska wodnego przez przemysł związany z produkcją owoców morza [31, 77]. Źródłem bakterii chitynolitycznych utylizujących te odpady może być zarówno środowisko morskie, w tym odpady krewetkowe [78], a nawet gleba [79]. Wielokrotnie udowodniono skuteczność chitynaz produkowanych przez bakterie należące do rodzaju *Bacillus* czy *Pseudomonas* w degradacji panczerzy krewetek czy krabów [7, 84–85] (Tab. III).

Rekombinowane chitynazy wykorzystuje się do depolimeryzacji biomasy chityny, a bioaktywne mono czy oligosacharydy mają szerokie spektrum biotechnologicznych zastosowań, między innymi jako bionawozy [15, 66], lub substraty do produkcji kosmetyków [15]. Innym podejściem do efektywnego wykorzystania odpadów chityny jest wytwarzanie białka z pojedynczych komórek (single cell protein – SCP), kiedy to produkty degradacji chityny służą jako źródła węgla lub substancji odżywczych do produkcji biomasy [64].

Obiektem zainteresowań biotechnologii białej są także grzyby w tym drożdże, które są wykorzystywane do produkcji protoplastów służących do badań nad syntezą ścian komórkowych oraz syntezą i wydzielaniem enzymów. Dahiya i wsp. [13–14] wykazali, że chitynazy z *Enterobacter* sp. NRG4 są bardzo skuteczne w uzyskiwaniu protoplastów *Trichoderma reesei*, *Pleurotus florida*, *Agaricus bisporus* czy *A. niger*. Kompleks enzymatyczny z *Bacillus circulans* WL-12 o wysokiej aktywności chitynazy skutecznie generował protoplasty *Phaffia rhodozymba* [35], natomiast chitynaza ze *Streptomyces* była zdolna do wytworzenia protoplastów *Aspergillus oryzae* i *F. solani* [71]. Proces uzyskiwania protoplastów grzybowych jest bardziej wydajny gdy ma miejsce współdziałanie chitynaz z  $\beta$ -1,3-glukanazami w tym procesie, bo jednocześnie hydrolizowane są dwa polisacharydy będące komponentami ściany komórkowej grzybów tj. chityna i glukan [18]. Dodanie oczyszczonej chitynazy A pozyskanej z *Streptomyces cyaneus*

SP-27 do  $\alpha$ -1,3-glukanazy z *B. circulans* KA-304 zwiększyło wydajność tworzenia protoplastów z *Schizophyllum commune* [89]. Mieszanina chitynazy I i  $\alpha$ -1,3-glukanazy z *B. circulans* KA-304 zwiększyła wydajność uzyskiwania protoplastów *S. commune* [90].

## 7. Wykorzystanie chitynaz w biotechnologii czerwonej

Chitynazy są również w kręgu zainteresowań biotechnologii czerwonej wykorzystywanej w ochronie zdrowia, szczególnie w zakresie produkcji nowych biofarmaceutyków.

Produktem działania chitynaz są chitoooligosacharydy, które są badane pod kątem wykorzystania medycznego. Potwierdzono antynowotworowe działanie oligosacharydów polegające na zahamowaniu wzrostu lub ograniczeniu przerzutów nowotworów u myszy po podaniu *N*-acetylochitoheksozy [80, 82]. Chitynazy pochodzenia bakteryjnego również wykazują działanie antynowotworowe. Chitynazy z *Bacillus amyloliquefaciens* V656 użyto do zhydrolizowania chitozanu, a uzyskane hydrolizaty (GlcNAc)<sub>6</sub> hamowały proliferację linii CT26 komórek raka okrężnicy [46]. Enzymy te również stanowią doskonały marker wielu groźnych chorób powodowanych przez bakterie m.in. przez *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes* czy *Pseudomonas aeruginosa* [21].

Wiele chorób zakaźnych przenoszonych jest przez owady, a chitynazy jak już wspomniano mogą zostać wykorzystane do zwalczania komarów. Chitynaza z *B. sphaericus* może wspomagać toksycność toksyny binarnej przeciwko *Culex quinquefasciatus* [5].

## 8. Podsumowanie

Kluczową rolę w rozwoju światowej gospodarki odgrywają biopolimery odnawialne. Chityna, drugi po celulozie najczęściej występujący biopolimer, jest nie

tylko bogatym źródłem węgla, ale również azotu. Skorpaki stanowią potencjalnie największe źródło chityny, choć występuje ona również w ścianach komórkowych grzybów czy egzoszkielecie owadów. Degradacja chityny jest katalizowana w reakcji enzymatycznej przez chitynazy, które rozszczepiają wiązania  $\beta$ -glikozydowe pomiędzy węglem C1 i C4 dwóch sąsiednich *N*-acetylglukozamin. Są to enzymy powszechnie występujące w przyrodzie, jednak kluczową rolę w hydrolizie chityny odgrywają chitynazy bakteryjne, głównie ze względu na ich łatwiejsze pozyskiwanie, co stwarza ogromną możliwość wykorzystania ich w rolnictwie, przemyśle czy medycynie. Chitynazy bakteryjne jak i produkty ich działania, chitoooligomery mogą być wykorzystane w biotechnologii zielonej jako biopestycydy do zwalczania grzybów (biofungicydy) oraz owadów (bioinsektycydy), a także w biotechnologii białej, do degradacji odpadów, czy wreszcie w biotechnologii czerwonej głównie do produkcji biofarmaceutyków. Ze względu na szerokie spektrum wykorzystania chitynaz poznanie dokładnego mechanizmu ich działania może przyczynić się do powiększenia potencjału aplikacyjnego chitynaz.

## Piśmiennictwo

- Aggarwal C., Paul S., Tripathi V., Paul B., Khan M.A.: Chitinolytic activity in *Serratia marcescens* (strain SEN) and potency against different larval instars of *Spodoptera litura* with effect of sublethal doses on insect development. *BioControl*, **60**, 631–640 (2015)
- Ajit N.S., Verma R., Shanmugam V.: Extracellular chitinases of fluorescent Pseudomonads antifungal to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* causing carnation wilt. *Curr. Microbiol.* **52**, 310–316 (2006)
- Arora N.K., Kim M.J., Kang S.C., Maheshwari D.K.: Role of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase activities produced by a fluorescent pseudomonad and *in vitro* inhibition of *Phytophthora capsici* and *Rhizoctonia solani*. *Can. J. Microbiol.* **53**, 207–212 (2007)
- Bao-qin H., Chang-ying Y., Wan-shun L., Ji-Xun D.: Purification and inhibition fungal growth of chitinases from *Vibrio pacini*. *Wuhan Univ. J. Nat. Sci.* **9**, 973–978 (2004)
- Cai Y., Yan J., Hu X., Han B., Yuan Z.: Improving the insecticidal activity against resistant *Culex quinquefasciatus* mosquitoes by expression of chitinase gene chiAC in *Bacillus sphaericus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 7744–7746 (2007)
- Cantarel B.L., Coutinho P.M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V., Henrissat B.: The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* **37**, 233–238 (2009)
- Chang W.T., Chen M., Wang S.L.: An antifungal chitinase produced by *Bacillus subtilis* using chitin waste as a carbon source. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 945–950 (2010)
- Chang W.T., Chen Y.C., Jao C.L.: Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes. *Biores. Technol.* **98**, 1224–1230 (2007)
- Chen L., Shen Z., Wu J.: Expression, purification and *in vitro* antifungal activity of acidic mammalian chitinase against *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum* strains. *Clin. Exp. Dermatol.* **34**, 55–60 (2009)
- Choudhary B., Nagpure A., Gupta R.K.: Fungal cell wall lytic enzymes, antifungal metabolite (s) production, and characterization from *Streptomyces exfoliates* MT9 for controlling fruit-rotting fungi. *J. Basic Microbiol.* **54**, 1295–1309 (2014)
- Cohen-Kupiec R., Chet I.: The molecular biology of chitin digestion. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 270–277 (1998)
- Comb D.G., Roseman S.: Glucosamine-6-phosphate deaminase. *Biochim. Biophys. Acta*, **21**, 193–194 (1956)
- Dahiya N., Tewari R., Hoondal G.S.: Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl. Microbiol. Biotech.* **25**, 1–10 (2006)
- Dahiya N., Tewari R., Tiwari R.P., Hoondal G.S.: Production of an antifungal chitinase from *Enterobacter* sp. NRG4 and its application in protoplast production. *World J. Microbiol.* **21**, 1611–1616 (2005)
- Das S.N., Neeraja Ch., Sarma P.V.S.R.N., Madhu Prakash J., Purushotham P., Kaur M., Dutta S., Podile A.R.: Microbial chitinases for chitin waste management (w) Microorganism in Environmental Management, red. Satyanarayana T., Johri B.N., Prakash A., Springer, New York, 2012, s. 135–150
- Deilamy A., Abbasipour H.: Comparative bioassay of different isolates of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* on the third larval instars of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lep.: Plutellidae). *Arch. Phytopathol. Plant. Prot.* **46**, 1480–1487 (2013)
- Erb S.L., Bouchier R.S., Frankenhuysen K.V., Smith S.M.: Sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* berliner subsp. *kurstaki* on *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) and the tachinid parasitoid *Compsilura concinnata* (Diptera: Tachinidae). *Environ. Entomol.* **30**, 1174–1181 (2001)
- Felse P.A., Panda T.: Production of microbial chitinases: a revisit. *Bioprocess. Eng.* **23**, 127–134 (2000)
- Felse P.A., Panda T.: Regulation and cloning of microbial chitinase genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 141–151 (1999)
- Ferrari A.R., Gaber Y., Fraaije M.W.: A fast, sensitive and easy colorimetric assay for chitinase and cellulose activity detection. *Biotechnol. Biofuels.* **7**, 37–44 (2014)
- Frederiksen R.F., Paspaliari D.K., Larsen T., Storgaard B.G., Larsen M.H., Ingmer H., Storgaard B.G., Larsen M.H., Ingmer H., Palcic M.M., Leisner J.J.: Bacterial chitinases and chitin-binding proteins as virulence factors. *Microbiology*, **159**, 833–847 (2013)
- Gadelhak G.G., El-Tarabily K.A., Al-Kaabi F.K.: Insect control using chitinolytic soil actinomycetes as biocontrol agents. *Int. J. Agr. Biol.* **7**, 627–633 (2005)
- Ghasemi S., Ahmadian G., Jelodar N.B., Rahimian H., Ghandili S., Dehestani A., Shariati P.: Antifungal chitinases from *Bacillus pumilus* SG2: preliminary report. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 1437–1443 (2010)
- Gomaa E.Z.: Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: their potential in antifungal biocontrol. *J. Microbiol.* **50**, 103–111 (2012)
- Gooday G.W.: The ecology of chitin degradation. *Adv. Microbiol. Ecol.* **11**, 387–430 (1990)
- Gupta R., Saxena R.K., Chaturvedi P., Viridi J.S.: Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potential in fungal cell wall lysis. *J. Appl. Bacteriol.* **78**, 378–383 (1995)
- Halder S.K., Maity Ch., Jana A., Das A., Paul T., Mohapatra P.K.D., Pati B.R., Mondal K.Ch.: Proficient biodegradation of shrimp shell waste by *Aeromonas hydrophila* SBK1 for the concomitant production of antifungal chitinase and antioxidant chitosaccharides. *Int. Biodet. Biodeg.* **79**, 88–97 (2013)
- Hammami I., Siala R., Jridi M., Ktari N., Nasri M., Mohamedali T.: Partial purification and characterization of chiIO8, a novel antifungal chitinase produced by *Bacillus cereus* IO8. *J. Appl. Microbiol.* **115**, 358–366 (2013)

29. Hartl L., Zach S., Seidl-Seiboth V.: Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 533–543 (2012)
30. Hernández-León R., Rojas-Solís D., Contreras-Pérez M., del Carmen Orozco-Mosqueda M., Macías-Rodríguez L.I., Reyes-de la Cruz H., Valencia-Cantero E., Santoyo G.: Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biol. Control*, **81**, 83–92 (2015)
31. Hoang K.C., Lai T.H., Lin C.S., Chen Y.T., Liao C.Y.: The chitinolytic activities of *Streptomyces* sp. TH-11. *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 56–65 (2011)
32. Howard M.B., Ekborg N.A., Weiner R.M., Hutcheson S.W.: Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 627–635 (2003)
33. Inbar J., Che, I.: Evidence that chitinase produced by *Aeromonas caviae* is involved in biological control of soil borne plant pathogen by this bacterium. *Soil Biol. Biochem.* **23**, 973–978 (1991)
34. Itoh Y., Takahashi K., Takizawa H., Nikaidou N., Tanaka H., Nishihashi H., Watanabe T., Nishizawa Y.: Family 19 chitinase of *Streptomyces griseus* HUT6037 increases plant resistance to the fungal disease. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 847–855 (2003)
35. Johnson E.A., Villa T.G., Lewis M.J., Phaff H.J.: Lysis of cell wall of yeast *Phaffia rhodozyma* by a lytic complex from *Bacillus circulans* WL-12. *J. Appl. Biochem.* **1**, 272–282 (1979)
36. Kasprzewska A.: Plant chitinases – regulation and function. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **8**, 809–824 (2003)
37. Keyhani N.O., Roseman S.: Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1473**, 108–122 (1999)
38. Kezuka Y., Ohishi M., Itoh Y., Watanabe J., Mitsutomi M., Watanabe T., Nonaka T.: Structural studies of a two-domain chitinase from *Streptomyces griseus* HUT6037. *J. Mol. Biol.* **358**, 472–484 (2006)
39. Khandelwal P., Bhatnagar N.B.: Insecticidal activity associated with the outer membrane vesicles of *Xenorhabdus nematophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2032–2037 (2003)
40. Kim K.J., Yang Y.J., Kim J.G.: Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces* sp. M-20. *J. Biochem. Mol. Biol.* **36**, 185–189 (2003)
41. Kishore G.K., Pande S., Podile A.R.: Biological control of late leaf spot of peanut (*Arachis hypogaea*) with chitinolytic bacteria. *Phytopathology*, **95**, 1157–1165 (2005)
42. Kisiel A., Jęckowska K., Kępczyńska E.: Rola chitynaz w rozwoju roślin. *Post. Biol. Kom.* **44**, 273–288 (2016)
43. Kurita K.: Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Prog. Polym. Sci.* **26**, 1921–1971 (2001)
44. Larsen T., Petersen B.O., Storgaard B.G., Duus J.O., Palcic M.M., Leisner J.J.: Characterization of a novel *Salmonella typhimurium* chitinase which hydrolyzes chitin, chitooligosaccharides and an N-acetylglucosamine conjugate. *Glycobiology*, **21**, 426–436 (2011)
45. Li J.G., Jiang Z.Q., Xu L.P., Sun F.F., Guo J.H.: Characterization of chitinase secreted by *Bacillus cereus* strain CH2 and evaluation of its efficacy against *Verticillium* wilt of eggplant. *Biocontrol*, **53**, 931–944 (2008)
46. Liang T.W., Chen Y.J., Yen Y.H., Wang S.L.: The antitumor activity of the hydrolysates of chitinous materials hydrolyzed by crude enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* V656. *Process. Biochem.* **42**, 527–534 (2007)
47. Liu D., Cai J., Xie Ch.-Ch., Liu Ch., Chen Y.-H.: Purification and partial characterization of a 36-kDa chitinase from *Bacillus thuringiensis* spp. *colmeri*, and its biocontrol potential. *Enzyme Microb. Technol.* **46**, 252–256 (2010)
48. Liu M., Cai Q.X., Liu H.Z., Zhang B.H., Yan J.P., Yuan Z.M.: Chitinolytic activities in *Bacillus thuringiensis* and their synergistic effects on larvicidal activity. *J. Appl. Microbiol.* **93**, 374–379 (2002)
49. Martínez-Absalón S., Rojas-Solís D., Hernández-León R., Orozco-Mosqueda Ma. del C., Peña-Cabriaes J.J., Sakuda S., Valencia-Cantero E., Santoyo G.: Potential use and mode of action of the new strain *Bacillus thuringiensis* UM96 for the biological control of the gray mould phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Biocontrol Sci. Technol.* **24**, 1349–1362 (2014)
50. Mohan M., Sushil S.N., Bhatt J.C., Gujar G.T., Gupta H.S.: Synergistic interaction between sublethal doses of *Bacillus thuringiensis* and *Campoletis chloridae* in managing *Helicoverpa armigera*. *BioControl*, **53**, 375–386 (2008)
51. Morimoto K., Karita S., Kimura T., Sakka K., Ohmiya K.: Cloning, sequencing and expression of the gene encoding *Clostridium paraputrificum* chitinases ChiB and analysis of the functions of novel cadherinlike domains and chitin-binding domain. *J. Bacteriol.* **179**, 7306–7314 (1997)
52. Nagpure A., Choudhary B., Gupta R.K.: Chitinases: in agriculture and human healthcare. *Crit. Rev. Biotechnol.* **34**, 215–232 (2013)
53. Nagpure A., Choudhary B., Kumar S., Gupta R.K.: Isolation and characterization of chitinolytic *Streptomyces* sp. MT7 and its antagonism towards wood-rotting fungi. *Ann. Microbiol.* **64**, 531–541 (2013)
54. Nawani N.N., Kapadnis B.P.: Production dynamics and characterization of chitinolytic system of *Streptomyces* sp. NK 1057, a well equipped chitin degrader. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 487–494 (2004)
55. Novotna Z., Fliegerova K., Simunek J.: Characterization of chitinases of polycentric anaerobic rumen fungi. *Folia Microbiol.* **53**, 241–245 (2008)
56. Ohnuma T., Numata T., Osawa T., Mizuhara M., Lampela O., Juffer A.H., Skriver K., Fukamizo T.: A class V chitinase from *Arabidopsis thaliana*: gene responses, enzymatic properties, and crystallographic analysis. *Planta*, **234**, 123–137 (2011)
57. Patil R.S., Ghormade V., Deshpande M.V.: Chitinolytic enzymes: An exploration. *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 473–483 (2000)
58. Payne J.M., Davidson E.W.: Insecticidal activity of crystalline parasporal inclusions and other components of the *Bacillus sphaericus* 1593 spore complex. *J. Invertebr. Pathol.* **43**, 383–388 (1984)
59. Prapagdee B., Kuekulvong C., Mongkolsuk S.: Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *Int. J. Biol. Sci.* **4**, 330–337 (2008)
60. Price N.P.J., Naumann T.A.: A high-throughput matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry-based assay of chitinase activity. *Anal. Biochem.* **411**, 94–99 (2011)
61. Rabeeth M., Anitha A., Srikanth G.: Purification of an antifungal endochitinase from a potential biocontrol agent *Streptomyces griseus*. *Pak. J. Biol. Sci.* **14**, 788–797 (2011)
62. Ramírez-Coutiño L., Marín-Cervantes M.D.C., Huerta S., Revah S., Shirai K.: Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases. *Process Biochemistry*, **41**, 1106–1110 (2006)
63. Regev A., Keller M., Strizhov N., Sneh B., Prudovsky E., Chet I., Ginzberg I., Koncz-Kalman Z., Koncz C., Schell J., Zilberstein A.: Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3581–3586 (1996)
64. Revah-Moiseev S., Carroad P.A.: Conversion of enzymatic hydrolysate of shellfish waste chitin to SCP. *Biotechnol. Bioeng.* **23**, 1067–1078 (1981)

65. Sahai A.S., Manocha M.S.: Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host parasite interaction. *FEMS Microbiol. Rev.* **11**, 317–338 (1993)
66. Sakai K., Yokota A., Kurokawa H., Wakayama M., Moriguchi M.: Purification and characterization of three thermostable endochitinases of a noble *Bacillus* strain, MH-1, isolated from chitin-containing compost. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3397–3402 (1998)
67. Saks E., Jankiewicz U.: Aktywność chitynolityczna bakterii. *Post. Biochem.* **56**, 427–434 (2010)
68. Schales O., Schales S.S.: Simple method for the determination of glucose in blood. *Proc. Am. Fed. Clin. Res.* **2**, 78 (1945)
69. Sharma N., Sharma K.P., Gaur R.K., Gupta V.K.: Role of chitinase in plant defense. *Asian J. Biochem.* **6**, 29–37 (2011)
70. Sindhu S.S., Dadarwal K.R.: Chitinolytic and cellulolytic pseudomonas antagonistic to fungal pathogens enhance nodulation by *Mesorhizobium* sp in chickpea. *Microbiol. Res.* **156**, 353–358 (2001)
71. Skujins J.J., Potgeiter H.J., Alexander M.: Dissolution of fungal cell walls by *Streptomyces* chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase. *Arch. Biochem. Biophys.* **111**, 358–364 (1965)
72. Someya N., Nakajima M., Hirayae K., Hibi T., Akutsu K.: Synergistic antifungal activity of chitinolytic enzymes and prodigiosin produced by the biocontrol bacterium *Serratia marcescens* strain B2 against the gray mold pathogen, *Botrytis cinerea*. *J. Gen. Plant. Pathol.* **67**, 312–317 (2001)
73. Sridevi M., Mallaiah K.V.: Factors effecting chitinase activity of *Rhizobium* sp. from *Sesbania sesban*. *Biologia*, **63**, 307–312 (2008)
74. Suma K., Podile A.R.: Chitinase A from *Stenotrophomonas maltophilia* shows transglycosylation and antifungal activities. *Biores. Technol.* **133**, 213–220 (2013)
75. Suzuki K., Sugawara N., Suzuki M., Uchiyama T., Katouno F., Nikaidou N., Watanabe T.: Chitinases, A, B and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *E. coli*: enzymatic properties and synergism on chitin degradation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 1075–1083 (2002)
76. Swiontek-Brzezinska M., Jankiewicz U., Burkowska A., Walczak M.: Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection. *Curr. Microbiol.* **68**, 71–81 (2014)
77. Swiontek-Brzezinska M., Lalke-Porczyk E., Donderski W.: Occurrence and activity of microorganisms in shrimp waste. *Curr. Microbiol.* **57**, 580–587 (2008)
78. Swiontek-Brzezinska M., Lalke-Porczyk E., Donderski W.: Chitinolytic activity of bacteria and fungi isolated from shrimp exoskeletons. *Ocean. Hydrob. Studies*, **36**, 101–111 (2007)
79. Swiontek-Brzezinska M., Lalke-Porczyk E., Donderski W.: The role of chitinolytic bacteria and fungi in biodegradation of crustacean remains in lacustrine habitats. *Pol. J. Ecol.* **56**, 335–342 (2008)
80. Tokoro A., Tatewaki N., Suzuki K., Mikami T., Suzuki S., Suzuki M.: Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against meth-A solid tumor. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 784–790 (1988)
81. Tsubiyo H., Minoura K., Miyamoto K., Moriwaki M., Inamori Y.: Purification and properties of a thermostable chitinase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 620–622 (1993)
82. Tsukada K., Matsumoto T., Aizawa K., Tokoro A., Naruse R., Suzuki S., Suzuki M.: Antimetastatic and growth-inhibitory effects of N-acetylchitohexaose in mice bearing Lewis lung carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.* **81**, 259–265 (1990)
83. Vaidya R.J., Shah I.M., Vyas P.R., Chatpar H.S.: Production of chitinase and its optimization from a novel isolate *Alcaligenes xylosoxydans*: potential antifungal biocontrol. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1**, 62–69 (2001)
84. Wang S.L., Chang W.T.: Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in shrimp and crab shell powder medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 380–386 (1997)
85. Wang S.L., Chao C.H., Liang T.W., Chen C.C.: Purification and characterization of protease and chitinase from *Bacillus cereus* TKU006 and conversion of marine wastes by these enzymes. *Mar. Biotechnol.* **11**, 334–344 (2009)
86. Wiweger M., Farbos I., Ingouff M., Langercrantz U., Von Arnold S.: Expression of *Chia4-Pa* chitinase genes Turing somatic and zygotic embryo development in Norway spruce (*Picea abies*): similarities and differences between gymnosperm and angiosperm class IV chitinases. *J. Exp. Bot.* **54**, 2691–2699 (2003)
87. Xiao-Jing X., Li-Qun Z., You-Yong Z., Wen-Hua T.: Improving biocontrol effect of *Pseudomonas fluorescens* P5 on plant diseases by genetic modification with chitinase gene. *Chin. J. Agric. Biotechnol.* **2**, 23–27 (2005)
88. Yan Q., Fong S.S.: Bacterial chitinase: nature and perspectives for sustainable bioproduction. *Biores. Bioproc.* **2**, 31 (2015)
89. Yano S., Rattanakit N., Honda A., Noda Y., Wakayama M., Plikomol A., Tachiki T.: Purification and characterization of chitinase A of *Streptomyces cyaneus* SP-27: an enzyme participates in protoplast formation from *Schizophyllum commune* mycelia. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 54–61 (2008)
90. Yano S., Rattanakit N., Wakayama M., Tachiki T.: A chitinase indispensable for formation of protoplast of *Schizophyllum commune* in basidiomycete-lytic enzyme preparation produced by *Bacillus circulans* KA-304. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 1299–1305 (2004)
91. Zarandi H.S., Bagheri A., Baghizadeh A., Moshtaghi N.: Quantitative analysis of chitinase gene expression in chickpea. *Russ. J. Plant. Physiol.* **58**, 681–685 (2011)

Paweł Krzyżek<sup>1\*</sup>

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

Wpłynęło w styczniu 2017 r.  
Zaakceptowano w marcu 2017 r.

1. Wstęp. 2. Sekrecja pęcherzyków błonowych u *H. pylori*. 3. Proteom pęcherzyków błonowych *H. pylori*. 4. Transport czynników wirulencji poprzez OMV. 4.1. Toksyna VacA. 4.2. Onkoproteina CagA. 4.3. Inne substancje. 5. Udział OMV w formowaniu biofilmu. 5.1. Funkcje biofilmu. 5.2. Zaangażowanie OMV w tworzenie biofilmu u bakterii. 5.3. Zaangażowanie OMV w tworzenie biofilmu u *H. pylori*. 5.4. Funkcja strukturalna zewnątrzkomórkowego DNA *H. pylori*. 6. Zewnątrzkomórkowe DNA jako nośnik informacji. 6.1. Wpływ na wirulencję. 6.2. Transformacja. 6.3. Naturalna kompetencja *H. pylori*. 7. Podsumowanie

### Secretion of outer membrane vesicles as a mechanism promoting *H. pylori* infections

**Abstract:** *Helicobacter pylori* commonly colonizes the human gastric mucosa. Infections with this microorganism can contribute to serious health consequences, such as peptic ulceration, gastric adenocarcinoma and gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. Chronic persistence of this bacteria in the host organism is probably strongly dependent on the secretion of outer membrane vesicles (OMV). These organelles are small, electron-dense, extracellular structures which are secreted in large amounts during stressful conditions, among others. *H. pylori* OMV mediate transfer of virulence factors such as toxins and immunomodulatory compounds. They contribute to avoiding a response from the host immune system and inducing chronic gastritis. OMV secretion also affects the formation of cell aggregates, microcolonies and biofilm matrix. Enhanced OMV production is connected to maintenance of direct contact through cell-cell and cell-surface interactions. A key component of OMV, which determines their structural function, is extracellular DNA (eDNA) anchored to the surface of these organelles. eDNA associated with OMV additionally determines the genetic recombination in the process of horizontal gene transfer. *H. pylori* is naturally competent for genetic transformation and is constantly capable of DNA uptake from the environment. The natural competence state promotes the assimilation of eDNA anchored to the OMV surface. This is probably dependent on ComB and ComEC components, which are involved in the transformation process. For this reason, the OMV secretion mediates intensive exchange of genetic material, promotes adaptation to changing environmental conditions and enables persistent infecting of the gastric mucosa by *H. pylori*.

1. Introduction. 2. Secretion of outer membrane vesicles by *H. pylori*. 3. Proteome of *H. pylori* outer membrane vesicles. 4. Transport of virulence factors through OMV. 4.1. Toxin VacA. 4.2. Oncoprotein CagA. 4.3. Other substances. 5. OMV involvement in biofilm formation. 5.1. Functions of biofilm. 5.2. OMV influence on bacterial biofilm formation. 5.3. OMV influence on biofilm formation by *H. pylori*. 5.4. Structural function of *H. pylori* extracellular DNA. 6. Extracellular DNA as an information carrier. 6.1. Influence on virulence. 6.2. Transformation. 6.3. Natural competence of *H. pylori*. 7. Conclusions

**Słowa kluczowe:** biofilm, czynniki wirulencji, *H. pylori*, pęcherzyki błonowe, transformacja

**Key words:** biofilm, *H. pylori*, outer membrane vesicles, transformation, virulence factors

## 1. Wstęp

Pęcherzyki błonowe (OMV, Outer Membrane Vesicles) są strukturami o nanometrycznych wymiarach, które przenoszą różnorodne substancje chemiczne, często nierozpuszczalne lub hydrofobowe [47, 50]. Wśród nich wyróżnić można białka błonowe i cytoplazmatyczne, lipidy, kwasy nukleinowe (RNA i DNA), komponenty ściany komórkowej (LPS i peptydoglikan) oraz drobnocząsteczkowe metabolity wtórne (toksyny, czynniki immunomodulujące, substancje warunkujące *quorum sensing*) [36, 37, 47, 50]. W obrazie mikroskopowym OMV widoczne są jako drobne, sferyczne, gęste elektronowo organelle o wymiarach w zakresie 50–250 nm [36]. Pęcherzyki błonowe warunkują dostarczenie substancji do miejsca docelowego w efek-

tywnym stężeniu oraz ochronę przed czynnikami środowiskowymi, tj. działaniem nukleaz i peptydaz [37, 53]. Pęcherzyki wytwarzane są we wszystkich fazach wzrostu mikroorganizmów i produkowane są zarówno przez bakterie Gram-ujemne, jak i Gram-dodatnie [37, 50]. Dotychczas nie uzyskano mutantów bakterii całkowicie pozbawionych zdolności do sekrecji OMV, co sugeruje, że proces ten zależny jest od wielu genów [37].

Początkowo uważano, że OMV są przypadkowym produktem powstałym w wyniku obrotu katabolicznego ściany komórkowej lub lizy komórki mikroorganizmu. Obecnie są jednak rozpatrywane jako system sekrecji, kluczowy dla fizjologii drobnoustrojów [47, 50, 53]. Wydzielanie pęcherzyków błonowych łączy się z adaptacją mikroorganizmów do niekorzystnych warunków środowiska. Odpowiedź ta polega na promowaniu

\* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu; ul. Chałubińskiego 4, 50-368 Wrocław; tel. 717 84 12 86; e-mail: krojcerpawel@gmail.com

tworzenia agregatów bakteryjnych i biofilmów oraz usuwaniu antybiotyków, przeciwciał i bakteriofagów z powierzchni komórki przez aktywną sekrecję OMV do środowiska zewnętrznego [53]. Pęcherzyki *Moraxella catarrhalis* mają zdolność łączenia się z przeciwciałami skierowanymi przeciwko bakterii, co warunkuje uniknięcie opsonizacji i bezpośredniego kontaktu drobnoustroju z komórkami odpornościowymi [54]. U mutantów  $\Delta yieM$  *Escherichia coli* nadprodukcujących pęcherzyki błonowe, wykazano 10-krotny wzrost sekrecji OMV. Proces ten skorelowany był ze zwiększonymi zdolnościami przetrwania przy traktowaniu mutantów antybiotykami degradującymi błonę komórkową, polimyksyną B i kolistyną. Dodatkowo, inkubacja fagów litycznych T4 z *E. coli*, przy obecności 1  $\mu\text{g}$  OMV, redukowała skuteczność bakteriofagów o 90% [42].

Pęcherzyki błonowe mogą uczestniczyć w transporcie materiału genetycznego, determinującego zachodzenie horyzontalnego transferu genów (HGT), lub związków zaangażowanych w komunikację międzydrobnoustrojową [9, 53]. Kliniczne szczepy *Pseudomonas aeruginosa* izolowane od pacjentów z mukowiscydozą wydzielają przy pomocy OMV silnie hydrofobowe czynniki sygnałowe, związane z wirulencją tego patogenu, tj. 2-heptylo-3-hydrokso-4-chinolon (PQS, *Pseudomonas* Quinolone Signal) [44]. Jednym z pierwszych mikroorganizmów, u których wykazano zdolność do przenoszenia materiału genetycznego przez transport pęcherzykowy był *Haemophilus influenzae*. OMV transportujące DNA wpływało na ochronę kwasu nukleinowego przed nukleazami i enzymami restrykcyjnymi oraz umożliwiało zachodzenie modyfikacji genetycznych. Stąd też nazwane zostały transformasomami (*transformasomes*) [25]. Dziś wiadomo, że pęcherzyki tych bakterii zawierają także inne czynniki wirulencji jak endopeptydaza IgA, lipooligosacharyd (LOS), adhezyna P5 czy białka metabolizmu hemu [59]. U mikroorganizmów wykazano również zdolność do rozpowszechniania genów oporności poprzez pęcherzyki błonowe. Plazmid oporności na penicylinę u *Neisseria gonorrhoeae* może być przenoszony za pośrednictwem OMV na szczepy wrażliwe [12]. Podobnie pęcherzyki błonowe szczepów *Acinetobacter baumannii* produkujących metalo- $\beta$ -laktamazę, warunkującą oporność na karbapenemy, inicjowały zdolność do rozkładu tych antybiotyków u szczepów wrażliwych tej bakterii [56]. W doświadczeniu Schaar i wsp. [57] wykazano, że OMV wydzielane przez *M. catarrhalis* KR526 zawierały aktywną  $\beta$ -laktamazę i w stężeniu 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  kompletnie hydrolizowały 2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  amoksyliny. Pęcherzyki tego mikroorganizmu wpływały także protekcyjnie względem innych bakterii patogenych układu oddechowego, *H. influenzae* i *Streptococcus pneumoniae*. To sugeruje, że OMV mogą wywierać efekt ochronny względem różnych drobnoustrojów,

bytujących w tej samej niszy ekologicznej, wzmacniając ich zdolności przetrwania.

W niniejszej pracy dokonano przeglądu wiedzy dotyczącej zdolności *Helicobacter pylori* do sekrecji pęcherzyków błonowych. Szczególną uwagę zwrócono na zaangażowanie pęcherzyków w formowanie biofilmu i agregatów bakteryjnych oraz generowanie zmienności genetycznej.

## 2. Sekrecja pęcherzyków błonowych u *H. pylori*

Do zakażenia *H. pylori* dochodzi najczęściej w dzieciństwie, a objawy kliniczne mogą ujawnić się po wielu latach. Drobnoustrój ten zasiedla śluzówkę żołądka, gdzie zdolny jest do przetrwania mimo stosowanych terapii. Przetrwale infekcje indukują chroniczne zapalenie błony śluzowej żołądka, co łączone jest z rozwojem choroby wrzodowej żołądka lub dwunastnicy oraz nowotworem żołądka [4]. Podobnie jak większość bakterii Gram-ujemnych, *H. pylori* jest zdolny do sekrecji pęcherzyków błonowych, których wielkość mieści się w zakresie 20–300 nm [48]. Mikroorganizm ten nierzadko mimo braku bezpośredniej adhezji do komórek epitelium posiada zdolność inicjowania zapalenia błony śluzowej żołądka [24]. Pęcherzyki błonowe warunkują skuteczne przekraczanie bariery epitelialnej i dostarczenie czynników wirulencji bezpośrednio do komórek docelowych. Taka strategia umożliwia uniknięcie bezpośredniego kontaktu z komórkami gospodarza i ochronę przed szkodliwym działaniem układu odpornościowego [24, 63].

Bakterie *H. pylori* wydzielają OMV w hodowlach płynnych, stałych lub w formie biofilmu, zarówno w warunkach *in vitro* i *in vivo* [31, 53]. Skład oraz ilość pęcherzyków błonowych determinowane są przez fazę wzrostu i czynniki środowiskowe. Zaobserwowano, że *H. pylori* izolowany podczas logarytmicznej fazy wzrostu posiada spiralny kształt i wydziela relatywnie niską ilość OMV, zaś w fazie stacjonarnej przyjmuje kształt kokoidalny, wydzielając duże ilości pęcherzyków [48]. W badaniu Keenan i wsp. [32] wykazano wpływ zmiany stężenia żelaza na ilość i budowę lipopolisacharydu (LPS) w produkowanych pęcherzykach *H. pylori*. U bakterii wzrastających w optymalnych warunkach LPS na powierzchni wydzielanych OMV występował liczniej ( $1,94 \pm 0,07$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  białek OMV) niż przy obniżonym stężeniu żelaza ( $0,75 \pm 0,19$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  białek OMV). Co więcej, ekspresja terminalnej jednostki Lewis<sup>x</sup> w obrębie struktury LPS *H. pylori* była 15-krotnie zredukowana w warunkach obniżonego stężenia żelaza. Bytujący w jamie ustnej *Porphyromonas gingivalis* produkuje dwie formy LPS, różniące się właściwościami łańcucha polisacharydowego: O-LPS (neutralny) i A-LPS (ładunek ujemny). Pęcherzyki

blonowe mutantów *P. gingivalis* o zredukowanej ilości A-LPS, występujące naturalnie w dużych ilościach, posiadały zmieniony profil białek błony zewnętrznej (OMP, Outer Membrane Proteins). Sugeruje to, że LPS może wpływać na skład i proces formowania pęcherzyków [22].

### 3. Proteom pęcherzyków błonowych *H. pylori*

Białka znajdujące się w OMV posiadają różnorodne funkcje i należą do białek strukturalnych, białek błony zewnętrznej i wewnętrznej, poryn, kanałów jonowych, enzymów cytoplazmatycznych i peryplazmatycznych oraz białek związanych z odpowiedzią mikroorganizmu na stres [37]. W doświadczeniu Mullaney i wsp. [46] oraz Olofsson i wsp. [48] badano proteom pęcherzyków wydzielanych przez *H. pylori*. Dominującą grupę stanowiły białka błony zewnętrznej (31%) i białka cytoplazmatyczne (22%) [46]. W stosunku do proteomu błony zewnętrznej całej komórki bakterii, 77% wszystkich białek tego kompartmentu znajdowało się w obrębie OMV. Sugeruje to, że grupowanie substancji w trakcie formowania pęcherzyków jest procesem selektywnym i nie zachodzi w wyniku biernego oderwania fragmentu błony komórkowej bakterii. Pośród zidentyfikowanych białek w pęcherzykach błonowych *H. pylori* należy wyróżnić cytotosynę VacA, onkoproteinę CagA, podjednostki ureazy, proteazę HtrA, transpeptydazę  $\gamma$ -glutamylową, katalazę, NapA, OipA oraz adhezyny BabA i SabA [46, 48]. W badaniu powinowactwa adhezyn na powierzchni OMV szczepów 17875/Leb (BabA<sup>+</sup>, SabA<sup>-</sup>) i 17875/sLex (BabA<sup>-</sup>, SabA<sup>+</sup>) stwierdzono podobny poziom łączenia z receptorami epitelium śluzówki żołądka w porównaniu z całą komórką bakterii. Wskazuje to na obecność w pełni funkcjonal-

nych i prawidłowo sfałdowanych białek adhezyjnych na powierzchni pęcherzyków błonowych, które warunkują zajście interakcji z komórkami gospodarza i internalizację tych organelli [48]. Co więcej, w doświadczeniu weryfikującym zdolność OMV *H. pylori* do indukcji odpowiedzi zapalnej zaobserwowano wzrost sekrecji prozapalnej cytokiny IL-8 w sposób zależny od dawki pęcherzyków. Aktywność wykazano względem obu testowanych typów komórek, tj. żołądka (AGS) i jelita (T84), natomiast wzrost stężenia IL-8 był 12-15-krotnie wyższy w przypadku linii komórek T84 [46]. Bezpośrednia interakcja OMV *H. pylori* z komórkami gospodarza umożliwia bakterii pozostanie w bezpiecznej odległości, warunkującej ochronę przed działaniem układu odpornościowego i możliwość przetrwałego infekowania śluzówki żołądka. Wydzielanie pęcherzyków błonowych u *H. pylori* jest rozpatrywane jako alternatywny sposób transportu czynników wirulencji, toksyn i związków immunomodulujących, celem pozyskiwania substancji odżywczych oraz interferencji z odpowiedzią gospodarza skierowaną przeciw temu mikroorganizmowi [46, 48, 53] [Tabela I].

### 4. Transport czynników wirulencji poprzez OMV

Ze względu na silne właściwości adhezyjne pęcherzyków błonowych oraz ich małe rozmiary, organelle te mogą wchodzić w specyficzne interakcje z komórkami gospodarza, w miejscach niedostępnych lub trudno dostępnych dla całej komórki drobnoustroju [36]. Zaobserwowano, że do endocytozy OMV *H. pylori* dochodzi przy pomocy tratw lipidowych, tj. mikrodomen w błonie komórkowej bogatych w sterole i sfingolipidy. Poziom internalizacji uległ znacznemu obniżeniu przy usunięciu cholesterolu z błon komórkowych

Tabela I

Wirulencja *H. pylori* warunkowana sekrecją pęcherzyków błonowych i zależnym od wydzielania OMV transportem eDNA

Adaptacja <i>H. pylori</i>	Efekt działania	Piśmiennictwo
Toksyeczność względem komórek eukariotycznych	Indukowanie podwyższonej sekrecji cytokin prozapalnych	[13, 23]
	Wakolizacja	[27]
	Formowanie mikrojąder	[25]
	Indukcja apoptozy	[27]
	Zaburzenie homeostazy żelazowej	[25]
	Obniżenie wewnątrzkomórkowego stężenia glutationu	[25, 29]
	Modyfikowanie proliferacji komórki	[1]
Zdolność chronicznej infekcji	Uniknięcie bezpośredniego kontaktu z komórkami odpowiedzi immunologicznej	[1, 27]
	Pozyskiwanie substancji odżywczych z komórek gospodarza	[1, 13]
	Tworzenie agregatów bakteryjnych i biofilmów	[19, 21, 26]
	Przyleganie do powierzchni abiotycznych	[19]
	Rozprzestrzenianie genów oporności i genów wirulencji	[5, 7]
	Uzyskiwanie nukleotydów i energii przez metabolizm eDNA	[32]



gospodarza oraz przy zastosowaniu filipiny lub metyl- $\beta$ -cyklodekstryny [27, 49]. Odmienne wyniki uzyskano w doświadczeniu Parker i wsp. [52], gdzie penetracja komórki eukariotycznej przez OMV *H. pylori* odbywała się w sposób niezależny od cholesterolu i zależny od klatryny. Dodatkowo, wykazano że toksyna VacA związana z pęcherzykami promuje proces internalizacji.

#### 4.1. Toksyna VacA

Toksyna wakuolizująca VacA warunkuje tworzenie aniono-selektywnych kanałów w błonach endosomów, co związane jest z wypływem zawartości komórki do środowiska zewnętrznego i poboru niezbędnych substancji przez *H. pylori* [9]. Aktywna biologicznie toksyna VacA może być zlokalizowana na powierzchni pęcherzyków błonowych tych bakterii lub wydzielana na zewnątrz komórki w postaci niezwiązanej [31]. Traktowanie komórek RK13 (komórki nerki królika) dawką 50  $\mu\text{g/ml}$  OMV szczepu toksynogennego *H. pylori* ATCC49503 (VacA<sup>+</sup>) powodowało wakuolizację 49% badanych komórek. Efekt ten był dużo silniejszy niż w kontroli lub po zastosowaniu pęcherzyków mutantów VacA (odpowiednio 4 i 3%) [63]. W doświadczeniu Chitcholtan i wsp. [9] dostrzeżono trzykrotny wzrost formowania mikrojąder w komórkach epitelium żołądka (AGS) traktowanych OMV szczepu *H. pylori* ATCC49503 i brak tego efektu pod wpływem działania pęcherzyków, pochodzących od nietoksynogennych mutantów VacA. Tworzenie mikrojąder miało podobny przebieg zarówno przy inkubacji AGS z całymi komórkami bakterii, jak i wyłącznie z OMV. Co więcej, wykazano że pęcherzyki *H. pylori* wpływają na zaburzenie homeostazy żelazowej komórki i obniżenie poziomu glutationu. Glutation zaś moduluje potencjał oksydacyjno-redukcyjny disiarczków, modyfikując właściwości białek w mikrośrodowisku żołądka, i jest najaktywniej wykorzystywanym substratem transferazy  $\gamma$ -glutamylowej. Limitowanie glutationu przyczynia się do promowania zależnych od stresu oksydacyjnego uszkodzeń komórek śluzówki żołądka i inicjowania procesu karcynogenezy [6].

Ustalono, że białko VacA wzmacnia adhezję pęcherzyków do komórek eukariotycznych poprzez hamowanie mechanizmów zależnych od LPS. Mimo pozytywnej korelacji między obecnością tej toksyny na powierzchni OMV a poziomem internalizacji, VacA nie jest konieczna do skutecznej penetracji błony komórek gospodarza przez pęcherzyki [52]. Wolna, rozpuszczalna forma toksyny VacA jest zdolna do indukowania apoptozy komórek żołądka AGS, natomiast nie w komórkach białaczkowych Jurkat. Pęcherzyki błonowe związane z VacA inicjowały apoptozę tej linii komórek, sugerując zdolność promowania łączenia się OMV z komórkami docelowymi przez toksynę

wakuolizującą [63]. Podobną sytuację zaobserwowano u *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, której toksyna niszcząca leukocyty – leukotoksyna, wykazuje większą aktywność, gdy związana jest z powierzchnią OMV niż z błoną komórkową bakterii. Pęcherzyki szczepów *A. actinomycetemcomitans* JP2, o silnej zdolności do produkcji leukotoksyny, były 5–10-krotnie bardziej toksyczne niż szczepu *A. actinomycetemcomitans* 652 o niskim poziomie produkcji tej substancji [30]. W przypadku pęcherzyków wydzielanych przez enterotoksyczne *E. coli* (ETEC) 95% ciepłochwiejnej toksyny LT związanej jest z powierzchnią OMV [23, 34].

#### 4.2. Onkoproteina CagA

Przykładem innego czynnika wirulencji związanej z powierzchnią pęcherzyków błonowych *H. pylori* jest białko CagA [48]. Proteina ta obecna jest w dwóch formach: ufosforylowanej i nieufosforylowanej. Pierwsza wpływa na zmiany morfologiczne, adhezyjne i wzrost ruchliwości komórek eukariotycznych, druga zaś warunkuje niszczenie połączeń ścisłych między komórkami i oddziałuje na przebieg cyklu komórkowego gospodarza [46]. Białko CagA wykryto w OMV szczepu *H. pylori* J99, u którego brak funkcjonalnego systemu sekrecji typu IV, determinującego translokację tych makromolekuł do komórek gospodarza. Związanie CagA z pęcherzykami może stanowić alternatywny, niezależny od T4SS, sposób przenoszenia tych czynników wirulencji [46, 48]. W badaniach Ismail i wsp. [24] określano wpływ pęcherzyków błonowych izolowanych od dwóch szczepów *H. pylori*, tj. ATCC49503 (CagA<sup>+</sup>) i ATCC51932 (CagA<sup>-</sup>), względem komórek epitelialnych żołądka. Niezależnie od użytej dawki, OMV obu szczepów wpływały na obniżenie żywotności komórek epitelium oraz modyfikację aktywności proliferacji (podwyższenie przy niskich dawkach i obniżenie przy stężeniu  $\geq 5 \mu\text{g/ml}$ ). Różnice zaobserwowano w poziomie indukcji produkcji IL-8 przez komórki epitelium, ponieważ 4-krotnie wyższy poziom zanotowano przy działaniu 50  $\mu\text{g/ml}$  OMV szczepu CagA<sup>-</sup>. Doświadczenie to dowodzi o możliwości aktywnej modulacji odpowiedzi komórek eukariotycznych w sposób niezależny od przylegania bakterii.

#### 4.3. Inne substancje

Substancje efektorowe znajdujące się w obrębie pęcherzyków błonowych łatwiej pokonują barierę komórkową. Są chronione przed czynnikami degradującymi i mogą być dostarczane w skoncentrowanej dawce do miejsca docelowego [63]. Innym czynnikiem związanym z OMV *H. pylori* jest białko NapA, czynnik chemotaktyczny neutrofilii, indukujący wzrost produkcji wolnych rodników tlenowych (ROS, Reactive

Oxygen Species). Wzrost migracji neutrofilii był skorelowany z dawką użytych OMV. Miał on na celu generowanie stresu oksydacyjnego w komórkach gospodarza i zależne od tego procesu uwolnienie substancji odżywczych dla mikroorganizmów [46]. Bakterie kolonizujące błony śluzowe, wśród nich *H. pylori*, mają zdolność sekrecji peptydoglikanu za pośrednictwem transportu pęcherzykowego. Specyficzne rozpoznanie mureiny przez cytozolowy sensor NOD1 skutkuje wzrostem ilości NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) i indukcją wrodzonej odpowiedzi komórek gospodarza [27].

## 5. Udział OMV w formowaniu biofilmu

OMV *H. pylori* warunkują w znaczący sposób patogenność tej bakterii. Wpływają na szybkość proliferacji i zmianę morfologii komórek epitelialnych żołądka, indukują formowanie mikrojąder, kierują komórki eukariotyczne na drogę apoptozy oraz stymulują wydzielanie cytokin prozapalnych tj. IL-6 i IL-8 [52]. Przenosząc czynniki wirulencji i modyfikując odpowiedź układu odpornościowego skierowaną przeciw tym drobnoustrojom odgrywają istotną rolę w kolonizowaniu niszy żołądka [36]. Pęcherzyki mogą również pełnić kluczową funkcję w zwiększaniu przeżywalności mikroorganizmów przez promowanie formowania biofilmu.

### 5.1. Funkcje biofilmu

Populacje bakterii często tworzą wysoce zorganizowane, gęste kompleksy zwane biofilmem [45]. W jego skład wchodzi komórki drobnoustrojów oraz zewnątrzkomórkowa macierz, która stanowi około 90% całej biomasy tej struktury i składa się z różnorodnych substancji, m.in. egzopolisacharydów, białek, lipidów i eDNA (zewnątrzkomórkowego DNA) [13, 58, 67]. Biofilm stanowi środowisko chroniące komórki mikroorganizmów przed niekorzystnymi czynnikami, w tym przed wahaniami temperatury, zmianami pH, promieniowaniem UV, swoistym i nieswoistym działaniem układu odpornościowego gospodarza oraz czynnikami przeciwdrobnoustrojowymi (enzymy degradujące, antybiotyki) [20, 21]. Co więcej, warunkuje również adhezję, agregację komórek, tworzenie silnie uwodnionego środowiska (ochrona przed wysuszeniem), a także sorpcję związków organicznych i nieorganicznych [13].

### 5.2. Zaangażowanie OMV w tworzenie biofilmu u różnych drobnoustrojów

W wielu badaniach zaobserwowano występowanie licznych pęcherzyków błonowych w macierzy biofilmu [13, 36, 50, 51, 66, 67]. OMV zaangażowane są

w koagregowanie komórek bakterii, tworzenie mikrokolonii i biowarstwy. W warunkach *in vitro* wykazano aktywny udział pęcherzyków *P. gingivalis* w promowaniu agregacji mikroorganizmów jamy ustnej, tj. *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Streptococcus* spp., *Actinomyces* spp., *Staphylococcus aureus* oraz strzępkowej formy *Candida albicans* [26]. Poziom sekrecji pęcherzyków błonowych przez bakterie wzrasta znacznie podczas wystawienia na niekorzystne warunki, sugerując powiązanie procesu formowania biofilmu z wydzielaniem OMV. Uwalnianie pęcherzyków wpływa najprawdopodobniej na zwiększenie hydrofobowości powierzchni mikroorganizmów i wzrost zdolności do tworzenia biowarstwy [37]. U bakterii *Myxococcus xanthus* obserwacja struktury biofilmu wykazała obecność bardzo licznych OMV, znajdujących się praktycznie w każdej wolnej przestrzeni macierzy pozakomórkowej. Pęcherzyki pełniły kluczową rolę w agregacji komórek i stabilizowaniu całej struktury biofilmu, proces ten zaś był warunkowany przez białka OMP obecne na powierzchni pęcherzyków. W niektórych komórkach dostrzeżono drobne deformacje kształtu celem utrzymania kontaktu typu komórka-komórka, co ukazuje, że takie interakcje nie są jedynie wynikiem ścisłego upakowania mikroorganizmów w biofilmie [51].

### 5.3. Zaangażowanie OMV w tworzenie biofilmu u *H. pylori*

Doświadczenie wskazujące na zaangażowanie pęcherzyków błonowych w promowanie tworzenia biofilmów wykonano także dla *H. pylori*. Yonezawa i wsp. [66] badali zdolności różnych szczepów *H. pylori* do formowania biowarstwy. Biofilmy wszystkich badanych szczepów posiadały relatywnie niską biomasa ( $OD_{595} = \sim 0,2$ ), za wyjątkiem jednego, TK1402 ( $OD_{595} = 1,5$ ). Jest to kliniczny izolat, pochodzący od japońskiego pacjenta z chorobą wrzodową żołądka. Przy dokładnej analizie biofilmu zaobserwowano obecność licznych sferycznych, pęcherzykowatych struktur w macierzy egzopolisacharydu (EPS). Pęcherzyki te sprzyjały ścisłym interakcjom komórkowym i tworzeniu agregatów. Dodatkowo, formowanie biowarstwy innego szczepu *H. pylori* było wzmocnione przy obecności w podłożu OMV pochodzących z hodowli *H. pylori* TK1402. Wykazano również, że obniżona suplementacja podłoża cielęcą surowicą płodową (FCS, Fetal Calf Serum) wpływa linowo na redukcję tworzenia biofilmu u *H. pylori*. W odróżnieniu od podłoża z 7% FCS, w którym szczep TK1402 wydzieliał duże ilości OMV, przy braku suplementacji nie wykryto obecności pęcherzyków. Obserwacja ta ukazuje jak ściśle zdolność formowania biofilmu przez *H. pylori* jest sprzężona z wydzielaniem pęcherzyków błonowych. W kolejnym badaniu Yonezawa i wsp. [67] analizowano skład białkowy pęcherzyków OMV

*H. pylori* TK1402 i wyizolowano 22 kDa proteinę, której nie odnaleziono w OMV innych szczepów. Białko to było obecne po dwu- i trzydniowej inkubacji szczepu TK1402, ale nie jednodniowej. Z tego powodu wnioskowano o jego istotnej roli w inicjowaniu przylegania do powierzchni abiotycznych, agregacji komórek bakterii i tworzeniu biowarstwy u *H. pylori* TK1402.

Zdolność do formowania ustrukturyzowanego biofilmu i sekrecji licznych pęcherzyków błonowych udowodniono także u środowiskowych szczepów *H. pylori* MDC1, izolowanych z zooplanktonu morskiego. Po 30 dniach inkubacji, w hodowli tej bakterii obserwowano agregaty form kokoidalnych, otoczone przez licznie występującą macierz zewnątrzkomórkową i pęcherzyki błonowe. W badaniu genu *luxS*, warunkującego zależną od autoinduktorów-2 (AI-2) aktywność *quorum sensing*, maksymalną ekspresję tego genu zaobserwowano w drugiej dobie hodowli, zaś w 30 dniu jego ekspresja nieznacznie przekraczała poziom detekcji. Autorzy artykułu sugerowali zmniejszenie ekspresji *luxS* jako rezultat dobrze zorganizowanej społeczności bakterii i zmniejszonej potrzeby komunikowania się [8]. Obecnie wiadomo natomiast, że autoinduktor-2 są czynnikiem rozpraszającym strukturę biofilmu *H. pylori* i stąd też synteza czynników AI-2 osiągała bardzo niski poziom [1].

#### 5.4. Funkcja strukturalna zewnątrzkomórkowego DNA *H. pylori*

Zewnątrzkomórkowe DNA (eDNA) jest ważnym polimerem obecnym w macierzy biofilmu. Komponent ten pełni funkcję architektoniczną i warunkuje odpowiednie rozmieszczenie mikroorganizmów w biowarstwie [15, 60]. Rola strukturalna eDNA została wykazana w wielu doświadczeniach przez redukcję biomasy biofilmów różnych bakterii po traktowaniu DNazą I. W badaniu Grande i wsp. [18] udowodniono jednak, że użycie tego enzymu (0,1 i 1 mg/ml) nie wpływa w żaden sposób na żywotność komórek *H. pylori* ani na biomasę biofilmów. Efekt DNazy I testowano względem kwasów nukleinowych pochodzących od różnych etiologicznie szczepów *H. pylori*, tj. wzorcowym (ATCC43629), klinicznym (SDB60) i środowiskowym (MDC1). Brak aktywności DNazy oraz uzyskanie różnych profili wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego DNA w analizie RAPD PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA) wskazywał na uwalanie kwasu nukleinowego w procesie niezależnym od lizy komórkowej. Co więcej, materiał genetyczny chroniony był przed aktywnością degradacyjną enzymu. Zasugerowano sekrecję eDNA zakotwiczonego w pęcherzykach błonowych. Przypuszczenia te potwierdzili następnie Grande i wsp. [19], którzy ustalili, że *H. pylori* jest zdolny do sekrecji pęcherzyków zarówno

w fazie planktonicznej (pOMV), jak i biofilmowej (bOMV). W analizie właściwości fizykochemicznych pęcherzyków wykazano, że bOMV posiadają większe rozmiary i bardziej ujemny ładunek (293 nm, -30 mV) niż pOMV (124 nm, -25 mV). Silniej ujemny ładunek korelował z 4-krotnie wyższą zawartością kwasu nukleinowego w bOMV. Dodatkowo wykazano, że znacznie większa część bOMV zawierała eDNA (30%) w porównaniu z pOMV (12%), zaś w obu przypadkach związek ten eksponowany był na powierzchni pęcherzyków. Pęcherzyki błonowe determinowały tworzenie wzajemnych połączeń między OMV-OMV oraz OMV-komórka, wspierając hipotezę o pełnieniu przez nie funkcji strukturalnej. Traktowanie zarówno pOMV, jak i bOMV, DNazą I nie wpływało na redukcję stężenia związanego z nimi DNA. Zintegrowanie kwasu nukleinowego z powierzchnią pęcherzyków wywierało efekt ochronny przed działaniem nukleaz, jednak molekularna natura tego procesu nie została jeszcze poznana.

#### 6. Zewnątrzkomórkowe DNA jako nośnik informacji

Zewnątrzkomórkowe DNA pełni bardzo ważną rolę w utrzymaniu prawidłowej struktury biofilmu, natomiast jego kluczową funkcją jest udział w rekombinacji genetycznej w procesie horyzontalnego transferu genów (HGT). Istnieje silna korelacja między wysokim stopniem zorganizowania biofilmu a częstością rekombinacji genetycznych [41]. Macierz biowarstwy zapewnia dogodne warunki ochronne przed niekorzystnymi czynnikami środowiskowymi, zaś ściśle upakowanie komórek drobnoustrojów promuje sprawny mechanizm HGT [41, 45]. I tak np. stężenie eDNA w środowisku biofilmu *Enterococcus faecalis* było 1000-krotnie wyższe niż w otoczeniu tych bakterii w fazie wzrostu planktonicznego [2]. Pęcherzyki błonowe mogą być jednym ze sposobów transportu eDNA i przyczyniać się do zwiększenia genetycznej zmienności współwystępujących mikroorganizmów oraz wpływać korzystnie na ich przetrwanie [36, 50]. Zewnątrzkomórkowe DNA może być pochodzenia chromosomalnego, plazmidowego lub fagowego [36]. Pobrane eDNA może stanowić dla drobnoustrojów źródło substancji odżywczych (węgla, azotu, fosforu), zwłaszcza w okresie niskiej ich zasobności, lub zostać zintegrowane z genomem biorcy [62].

Bakterie znajdujące się wewnątrz biofilmu wykazują niską wrażliwość na działanie antybiotyków. Przyczyną tego jest zredukowany poziom metabolizmu komórkowego oraz obniżona zdolność penetracji gęstej struktury biowarstwy przez biocydy. Z tego powodu geny oporności na antybiotyki ulegają ekspresji najczęściej w powierzchniowych warstwach biofilmu. DNA dyfundujące w obrębie macierzy EPS przyczynia się do rozprzestrzenienia genów umożliwiających

przetrwanie w warunkach presji środowiskowej, panującej w danym mikrośrodkowisku [45]. Zdolność do transformacji poprzez eDNA i przenoszenie genów oporności na antybiotyki wykazano u różnych gatunków bakterii, a wśród nich *M. catarrhalis* [57], *H. influenzae* [25, 59], *N. gonorrhoeae* [12, 35], *Acinetobacter baylyi* [14], *A. baumannii* [56], *P. aeruginosa* [10] oraz *Campylobacter jejuni* [5].

### 6.1. Wpływ na wirulencję

Rozprzestrzenianie genów oporności w procesie HGT udowodniono również u *H. pylori*. Stwierdzono istnienie silnego związku między infekcją mieszaną *H. pylori* (zakażenie kilkoma szczepami bakterii) u pacjentów a opornością tych bakterii na antybiotyki [7, 16]. W doświadczeniu Cellini i wsp. [7] zademonstrowali, że szczepy z mieszanych infekcji wykazywały wyższy poziom oporności w porównaniu do szczepów z zakażeń pojedynczych: klarytromycyna (odpowiednio: 80% i 48%), moksifloksacyna (20 i 6%) oraz tynidazol (80% i 35%). Co więcej, szczepy wirulentne również częściej izolowano od osób z infekcją mieszaną. Fenotyp VacA s1m1/s1m2 zidentyfikowano u 70% pacjentów z infekcją wywołaną przez kilka szczepów *H. pylori* i 42% pacjentów z infekcji pojedynczym szczepem. Podobną korelację uzyskano dla karcynogenego białka CagA, wykrytego u 97% szczepów *H. pylori* izolowanych od pacjentów z zakażeniem mieszanym i u 85% szczepów z pojedynczych infekcji. W innym doświadczeniu Marzio i wsp. [43] sprawdzano kolonizację różnych regionów żołądka przez *H. pylori* u pacjentów dotychczas nie leczonych i po przebytej eradykacji. Połowa pacjentów z pierwotnym zakażeniem *H. pylori* i 2/3 pacjentów po leczeniu posiadała te drobnoustroje zarówno w regionie trzonu, jak i części przedodźwiernikowej żołądka. Oporność drobnoustrojów kolonizujących cały żołądek była wyższa niż u tych kolonizujących jedynie część przedodźwiernikową. Hodowla *in vitro* mieszaniny dwóch szczepów, jednego izolowanego od pacjenta z nowotworem żołądka i drugiego od pacjenta z chłoniakiem typu MALT, prowadziła do uzyskania 60% chimerycznych klonów o bardziej zjadliwej kombinacji alleli genów *vacA* i *cagA* [17]. Potwierdza to hipotezę o promocji HGT w populacjach mieszanych i możliwości generowania *H. pylori* o mozaikowym genotypie [17, 19, 33].

### 6.2. Transformacja

Jednym z kluczowych sposobów tworzenia zmienności mikroorganizmów jest transformacja. Proces ten umożliwia pobieranie zewnątrzkomórkowego DNA i użycie go w procesie rekombinacji genetycznej [38, 45, 53]. Kompetencja do transformacji może być procesem stałym lub indukowanym w warunkach *in*

*vitro* poprzez wystawienie na związki chemiczne lub przez elektroporację. Stała, naturalna kompetencja do transformacji wywołana jest obecnością eDNA w biofilmach. Zewnątrzkomórkowe DNA zapewnia bliski kontakt komórek i utrzymanie struktury biowarstwy, co może inicjować proces transformacji [41]. Określono, że liza 1 komórki bakterii może zwiększyć lokalne stężenie DNA do 100 µg/ml. Tak wysoka zawartość DNA w środowisku o dużym zagęszczeniu mikroorganizmów sprawia, że biofilmy są idealnym środowiskiem do zachodzenia procesu HGT [3]. Na przykładzie Gram-dodatnich paciorkowców *Streptococcus mutans* wykazano 10–600-krotny wzrost aktywności procesu naturalnej transformacji w biofilmie w porównaniu do form planktonicznych [39]. Pozyskiwanie korzystnych genów (warunkujących oporność, kodujących enzymy związane z katabolizmem, zwiększających właściwości adhezyjne) odbywa się poprzez zintegrowanie DNA z chromosomem mikroorganizmu [41].

### 6.3. Naturalna kompetencja *H. pylori*

Bakteria *H. pylori* jest drobnoustrojem naturalnie kompetentnym i zdolnym do pobierania eDNA z otaczającego środowiska [11, 28, 61]. Częstość transformacji jest zależna od szczepu biorcy oraz genów, które są pobierane przez mikroorganizm. Transformacja u *H. pylori* odbywa się za pośrednictwem 2-niciowego DNA i jest procesem 1000-krotnie skuteczniejszym ( $10^{-5}$ – $10^{-6}$ ) niż przy użyciu 1-niciowego DNA. W komórkach *H. pylori* wykryto obecność bardzo wydajnego systemu transportu i rekombinacji z krótkimi fragmentami nici kwasu nukleinowego tj. 1300 pz. Dla porównania średnia wielkość przenoszonych fragmentów u innych bakterii wynosi odpowiednio *Streptococcus pneumoniae* 2000 pz, *Neisseria meningitidis* 5000 pz i *Bacillus subtilis* 10000 pz. Taka strategia umożliwia sprawne zachodzenie procesu transformacji i uzyskiwanie różnorodnych wariantów tzw. quasi-gatunków *H. pylori* [40].

Pobieranie DNA przez *H. pylori* odbywa się za pośrednictwem systemu podobnego do T4SS tj. systemu comB [11, 28, 29]. Jest on ortologiczny do systemu virB *Agrobacterium tumefaciens*. System comB występuje u wszystkich szczepów *H. pylori* i wpływa na ich naturalną kompetencję do poboru eDNA ze środowiska [29]. Dodatkowo u części szczepów może występować alternatywny system T4SS, zaangażowany w translokację karcynogennych białek CagA do komórek eukariotycznych [28, 29]. System poboru dsDNA u *H. pylori* jest dwuetapowy. Pierwszy etap warunkowany jest przez system comB i prowadzi do translokacji eDNA ze środowiska pozakomórkowego do przestrzeni peryplazmatycznej bakterii. Drugi etap determinowany jest przez kanał błonowy comEC, homologiczny do systemu *B. subtilis* i umożliwia transport nici DNA

przez błonę wewnętrzną do cytoplazmy. U mutantów *H. pylori* pozbawionych białek ComEC dochodziło do akumulowania DNA w przestrzeni peryplazmatycznej i braku efektywnej rekombinacji [61]. W doświadczeniu Yeh i wsp. [65] uzyskano mutanty genu kodującego białko HP1361 *H. pylori*, który jest homologiem ComE3 *B. subtilis*. Mutagenizaacja doprowadziła do znacznego spadku częstości transformacji *H. pylori* ( $<10^{-9}$ ), natomiast była przywrócona przy komplementacji wektorem zawierającym HP1361. To ukazuje, że kanał ComEC jest kluczowy dla zachodzenia skutecznego procesu transformacji. Dorer i wsp. [11] infekowali myszy C57BL/6 specjalnie wyselekcjonowanym szczepem *H. pylori* MSD132, zdolnym do przeżycia w żołądku myszy co najmniej 28 tygodni. U mutantów  $\Delta comB10$ , niezdatnych do pobierania DNA ze środowiska, wykazano niższy potencjał kolonizacji żołądka myszy niż u szczepów dzikich w 8 tygodniu infekcji. Wskazuje to na istotność procesu naturalnej kompetencji jako źródła nukleotydów i energii podczas chronicznej infekcji. Dodatkowo, u mutantów  $\Delta dprA$  (cytozolowego czynnika kompetencji, promującego rekombinację z pobranym DNA) również ukazano obniżony poziom kolonizacji żołądka. Obserwacja ta dowodzi z kolei o roli naturalnej kompetencji jako mechanizmu zwiększającego żywotność mikroorganizmów przez generowanie zmienności i adaptacji do niekorzystnych warunków panujących w środowisku żołądka.

Pęcherzyki błonowe zdolne są do przenoszenia eDNA, z tego też powodu postuluje się określenie systemu pęcherzykowego jako czwartego, alternatywnego dla koniugacji, transdukcji i transformacji, systemu rekombinacji genetycznej w procesie HGT. Mechanizm ten, w odróżnieniu od transformacji, miałby umożliwiać drobnoustrojom pobór DNA niezależnie od stanu ich kompetencji [64]. Naturalna, stała kompetencja do transformacji *H. pylori* wydaje się być niezasadna, ponieważ bakteria ta wydziela liczne OMV, zawierające eDNA, zdolne do indukowania rekombinacji. Z tego powodu sekrecja pęcherzyków błonowych powinna być wystarczająca do zapewnienia *H. pylori* zmienności genetycznej. Doświadczenie Fulsundar i wsp. [15] prowadzone na modelu *Acinetobacter baylyi* wyjaśniło zależność między produkcją OMV a transferem DNA, warunkowaną stałą kompetencją. Wydzielanie pęcherzyków zawierających plazmid oporności przez *A. baylyi* J26 indukowało syntezę  $\beta$ -laktamaz u szczepów wrażliwych. Co więcej, transfer DNA zachodził także w środowisku przy obecności DNaz (100 ng/ml). Natomiast komórki mutantów *A. baylyi*  $\Delta comA$  i  $\Delta comB-F$  nie uległy transformacji. Przeprowadzone badania Renelli i wsp. [55] potwierdzają wyniki poprzednich badaczy, ponieważ zawierające DNA OMV *P. aeruginosa* PAO1 nie generowały powstawania transformantów bakterii własnego szczepu lub *E. coli* DH5 $\alpha$ . Sugeruje to, że do

zajścia rekombinacji genetycznej wymagany był stan kompetencji bakterii-biorców.

Pobór eDNA ze środowiska wymaga sprawnego systemu, umożliwiającego transfer kwasu nukleinowego przez dwuwarstwę lipidową (błonę zewnętrzną i wewnętrzną) do cytozolu komórki mikroorganizmu. Przyjęcie eDNA niezależnie od mechanizmu, tj. na drodze transformacji czy endocytozy pęcherzyków błonowych, wymaga aktywnego aparatu pobierającego materiał genetyczny i stanu kompetencji drobnoustrojów. Stąd też prawdopodobnie stan stałej kompetencji *H. pylori* promuje przyswojenie eDNA zakotwiczonego na powierzchni pęcherzyków błonowych, co zależne jest od kanałów comB oraz comEC, które uczestniczą także w procesie transformacji.

## 7. Podsumowanie

*H. pylori* jest bakterią zdolną do przetrwania w śluzówce żołądka przez długi czas. Wydaje się, że przewlekłe bytowanie w organizmie gospodarza jest, między innymi, zależne od sekrecji pęcherzyków błonowych. OMV *H. pylori* posiadają małe rozmiary, co przyczynia się do ich skuteczniejszej adhezji i internalizacji z epitelium żołądka. Taki sposób dostarczania czynników wirulencji umożliwia uniknięcie bezpośredniego kontaktu z komórkami gospodarza oraz ochronę przed układem odpornościowym. Dodatkowo, wydzielanie pęcherzyków wzmacnia także zdolność do tworzenia agregatów komórek i biofilmu u tej bakterii. Bliski kontakt drobnoustrojów zaś stymuluje zachodzenie procesu horyzontalnego transferu genów za pośrednictwem eDNA, zakotwiczonego na powierzchni pęcherzyków błonowych. Z rozważań przedstawionych w niniejszej pracy wynika, że stan naturalnej kompetencji do transformacji i sekrecja OMV są najprawdopodobniej dwoma ściśle ze sobą związanymi procesami. Bez sprawnego aparatu determinującego pobór eDNA ze środowiska, niemożliwe jest przeprowadzenie przez mikroorganizm procesu rekombinacji z DNA, uzyskanym w wyniku endocytozy pęcherzyków błonowych. System pęcherzykowy powinien być więc pojmowany jako alternatywny, ale nie oddzielny od transformacji, mechanizm przyswajania kwasu nukleinowego ze środowiska. Z tego też powodu, naturalnie kompetentny *H. pylori* może przypuszczalnie w skuteczny sposób generować swoją zmienność i zwiększać możliwości przetrwania za pośrednictwem sekrecji eDNA poprzez OMV.

## Piśmiennictwo

1. Anderson J.K., Huang J.Y., Wreden C., Sweeney E.G., Goers J., Remington S.J., Guillemin K.: Chemorepulsion from the quorum signal autoinducer-2 promotes *Helicobacter pylori* biofilm dispersal. *mBio*, 6, e00379–15 (2015)

2. Barnes A.M., Ballering K.S., Leibman R.S., Wells C.L., Dunny G.M.: *Enterococcus faecalis* produces abundant extracellular structures containing DNA in the absence of cell lysis during early biofilm formation. *MBio*, **3**, e00193–12 (2012)
3. Baur B., Hanselmann K., Schlimme W., Jenni B.: Genetic transformation in freshwater: *Escherichia coli* is able to develop natural competence. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3673–3678 (1996)
4. Biernat M., Gościński G.: The pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection – the significance of selected virulence factors. *Forum zakaż.* **2**, 7–16 (2011)
5. Brown H.L., Hanman K., Reuter M., Betts R.P., van Vliet A.H.M.: *Campylobacter jejuni* biofilms contain extracellular DNA and are sensitive to DNase I treatment. *Front. Microbiol.* **6**, 699 (2015)
6. Bumann D., Aksu S., Wendland M., Janek K., Zimny-Arndt U., Sabarth N., Meyer T.F., Jungblut P.R.: Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **70**, 3396–3403 (2002)
7. Cellini L., Grande R., Di Campli E., Di Bartolomeo S., Capodicasa S., Marzio L.: Analysis of genetic variability, antimicrobial susceptibility and virulence markers in *Helicobacter pylori* identified in Central Italy. *Scand. J. Gastroenterol.* **41**, 280–287 (2006)
8. Cellini L., Grande R., Di Campli E., Di Bartolomeo S., Di Giulio M., Traini T., Trubiani O.: Characterization of an *Helicobacter pylori* environmental strain. *J. Appl. Microbiol.* **105**, 761–769 (2008)
9. Chitcholtan K., Hampton M.B., Keenan J.I.: Outer membrane vesicles enhance the carcinogenic potential of *Helicobacter pylori*. *Carcinogenesis*, **29**, 2400–2405 (2008)
10. Ciofu O., Beveridge T.J., Kadurugamuwa J., Walther-Rasmussen J., Høiby N.: Chromosomal beta-lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**, 9–13 (2000)
11. Dorer M.S., Cohen I.E., Sessler T.H., Fero J., Salama N.R.: Natural competence promotes *Helicobacter pylori* chronic infection. *Infect. Immun.* **81**, 209–215 (2013)
12. Dorward D.W., Garon C.F., Judd R.C.: Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **171**, 2499–2505 (1989)
13. Flemming C.-H., Wingender J.: The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 623–633 (2010)
14. Fulsundar S., Harms K., Flaten G.E., Johnsen P.J., Chopade B., Nielsen K.M.: Gene transfer potential of outer membrane vesicles of *Acinetobacter baylyi* and effects of stress on vesiculation. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 3469–3483 (2014)
15. Gloag E.S., Whitchurch C.B. i wsp.: Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 11541–11546 (2013)
16. Gościński G., Biernat M., Bińkowska A., Kus A., Iwańczak B.: Frequency of infection with *Helicobacter pylori* isolates of different antimicrobial profiles in children and adolescents. A preliminary study. *Adv. Clin. Exp. Med.* **26**, 263–268 (2017)
17. Grande R., Di Campli E., Di Bartolomeo S., Verginelli F., Di Giulio M., Baffoni M., Bessa L.J., Cellini L.: *Helicobacter pylori* biofilm: a protective environment for bacterial recombination. *J. Appl. Microbiol.* **113**, 669–676 (2012)
18. Grande R., Di Giulio M., Bessa L.J., Di Campli E., Baffoni M., Guarnieri S., Cellini L.: Extracellular DNA in *Helicobacter pylori* biofilm: a backstairs rumour. *J. Appl. Microbiol.* **110**, 490–498 (2011)
19. Grande R., Mincione G. i wsp.: *Helicobacter pylori* ATCC 43629/NCTC 11639 outer membrane vesicles (OMVs) from biofilm and planktonic phase associated with extracellular DNA (eDNA). *Front. Microbiol.* **6**, 1369 (2015)
20. Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P.: Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 95–108 (2004)
21. Hall-Stoodley L., Stoodley P.: Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol.* **13**, 7–10 (2005)
22. Haurat M.F., Aduse-Opoku J., Rangarajan M., Dorobantu L., Gray M.R., Curtis M.A., Feldman M.F.: Selective sorting of cargo proteins into bacterial membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* **286**, 1269–1276 (2011)
23. Horstman A.L., Kuehn M.J.: Bacterial surface association of heat-labile enterotoxin through lipopolysaccharide after secretion via the general secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 32538–32545 (2002)
24. Ismail S., Hampton M.B., Keenan J.I.: *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles modulate proliferation and interleukin-8 production by gastric epithelial cells. *Infect. Immun.* **71**, 5670–5675 (2003)
25. Kahn M.E., Barany F., Smith H.O.: Transformasomes: specialized membranous structures that protect DNA during *Haemophilus transformation*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 6927–6931 (1983)
26. Kamaguchi A., Nakayama K., Ichiyama S., Nakamura R., Watanabe T., Ohta M., Baba H., Ohya T.: Effect of *Porphyromonas gingivalis* vesicles on coaggregation of *Staphylococcus aureus* to oral microorganisms. *Curr. Microbiol.* **47**, 485–491 (2003)
27. Kaparakis M., Ferrero R.L. i wsp.: Bacterial membrane vesicles deliver peptidoglycan to NOD1 in epithelial cells. *Cell Microbiol.* **12**, 372–385 (2010)
28. Karnholz A., Hoefler C., Odenbreit S., Fischer W., Hofreuter D., Haas R.: Functional and topological characterization of novel components of the *comB* DNA transformation competence system in *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **188**, 882–893 (2006)
29. Karnholz A., Hoefler C., Odenbreit S., Fischer W., Hofreuter D., Haas R.: Functional and topological characterization of novel components of the *comB* DNA transformation competence system in *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **188**, 882–893 (2006)
30. Kato S., Kowashi Y., Demuth D.R.: Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. *Microb. Pathog.* **32**, 1–13 (2002)
31. Keenan J., Day T., Neal S., Cook B., Perez-Perez G., Allardyce R., Bagshaw P.: A role for the bacterial outer membrane in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *FEMS Microbiol. Lett.* **182**, 259–264 (2000)
32. Keenan J.I., Davis K.A., Beaugie C.R., McGovern J.J., Moran A.P.: Alterations in *Helicobacter pylori* outer membrane and outer membrane vesicle-associated lipopolysaccharides under iron-limiting growth conditions. *Innate Immun.* **14**, 279–290 (2008)
33. Kennemann L., Suerbaum S. i wsp.: *Helicobacter pylori* genome evolution during human infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 5033–5038 (2011)
34. Kesty N.C., Mason K.M., Reedy M., Miller S.E., Kuehn M.J.: Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells. *EMBO J.* **23**, 4538–4549 (2004)
35. Kouzel N., Oldewurtel E.R., Maier B.: Gene transfer efficiency in gonococcal biofilms: role of biofilm age, architecture, and pilin antigenic variation. *J. Bacteriol.* **197**, 2422–2431 (2015)
36. Kuehn M.J., Kesty N.C.: Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev.* **19**, 2645–2655 (2005)
37. Kulkarni H.M., Jagannadham M.V.: Biogenesis and multifaceted roles of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria. *Microbiology*, **160**, 2109–2121 (2014)
38. Kung S.H., Almeida R.P.: Biological and genetic factors regulating natural competence in a bacterial plant pathogen. *Microbiology*, **160**, 37–46 (2014)
39. Li Y.H., Lau P.C., Lee J.H., Ellen R.P., Cvitkovitch D.G.: Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. *J. Bacteriol.* **183**, 897–908 (2001)

40. Lin E.A., Zhang X.-S., Levine S.M., Gill S.R., Falush D., Blaser M.J.: Natural transformation of *Helicobacter pylori* involves the integration of short DNA fragments interrupted by gaps of variable size. *PLoS Pathog.* **5**, e1000337 (2009)
41. Madsen J.S., Burmølle M., Hansen L.H., Sørensen S.J.: The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **65**, 183–195 (2012)
42. Manning A.J., Kuehn M.J.: Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol.* **11**, 258 (2011)
43. Marzio L., Cellini L., Amitrano M., Grande R., Serio M., Cappello G., Grossi L.: *Helicobacter pylori* isolates from proximal and distal stomach of patients never treated and already treated show genetic variability and discordant antibiotic resistance. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **23**, 467–472 (2011)
44. Mashburn L.M., Whiteley M.: Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature*, **437**, 422–425 (2005)
45. Moradigaravand D., Engelstädter J.: The impact of natural transformation on adaptation in spatially structured bacterial populations. *BMC Evol. Biol.* **14**, 141 (2014)
46. Mullaney E., Brown P.A., Smith S.M., Botting C.H., Yamaoka Y.Y., Terres A.M., Kelleher D.P., Windle H.J.: Proteomic and functional characterization of the outer membrane vesicles from the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Proteomics Clin. Appl.* **3**, 785–796 (2009)
47. O'Donoghue E.J., Krachler A.M.: Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells. *Cell Microbiol.* **18**, 1508–1517 (2016)
48. Olofsson A., Arnqvist A. i wsp.: Biochemical and functional characterization of *Helicobacter pylori* vesicles. *Mol. Microbiol.* **77**, 1539–1555 (2010)
49. Olofsson A., Nygård Skalman L., Obi I., Lundmark R., Arnqvist A.: Uptake of *Helicobacter pylori* vesicles is facilitated by clathrin-dependent and clathrin-independent endocytic pathways. *MBio*, **5**, e00979–14 (2014)
50. Olsen I., Amano A.: Outer membrane vesicles – offensive weapons or good Samaritans? *J. Oral. Microbiol.* DOI:10.3402/jom.v7.27468 (2015)
51. Palsdottir H., Remis J.P., Schaudinn C., O'Toole E., Lux R., Shi W., McDonald K.L., Costerton J.W., Auer M.: Three-dimensional macromolecular organization of cryofixed *Myxococcus xanthus* biofilms as revealed by electron microscopic tomography. *J. Bacteriol.* **191**, 2077–2082 (2009)
52. Parker H., Chitcholtan K., Hampton M.B., Keenan J.I.: Uptake of *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles by gastric epithelial cells. *Infect. Immun.* **78**, 5054–5061 (2010)
53. Parker H., Keenan J.I.: Composition and function of *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles. *Microbes Infect.* **14**, 9–16 (2012)
54. Perez Vidakovic M.L.A., Jendholm J., Mörgelin M., Månsson A., Larsson C., Cardell L.-O., Riesbeck K.: B cell activation by outer membrane vesicles—a novel virulence mechanism. *PLoS Pathog.* **6**, e1000724 (2010)
55. 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)
56. Rumbo C., Fernández-Moreira E., Merino M., Poza M., Mendez J.A., Soares N.C., Mosquera A., Chaves F., Bou G.: Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 3084–3090 (2011)
57. Schaar V., Nordström T., Mörgelin 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)
58. Schooling S.R., Beveridge T.J.: Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J. Bacteriol.* **188**, 5945–5957 (2006)
59. Sharpe S.W., Kuehn M.J., Mason K.M.: Elicitation of epithelial cell-derived immune effectors by outer membrane vesicles of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **79**, 4361–4369 (2011)
60. Smalyukh I.I., Butler J., ShROUT J.D., Parsek M.R., Wong G.C.: Elasticity-mediated nematiclike bacterial organization in model extracellular DNA matrix. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* **78**, e030701 (2008)
61. Stingl K., Müller S., Scheidgen-Kleyboldt G., Clausen M., Maier B.: Composite system mediates two-step DNA uptake into *Helicobacter pylori*. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 1184–1189 (2010)
62. Vorkapic D., Pressler K., Schild S.: Multifaceted roles of extracellular DNA in bacterial physiology. *Curr. Genet.* **62**, 71–79 (2016)
63. Winter J., Letley D., Rhead J., Atherton J., Robinson K.: *Helicobacter pylori* membrane vesicles stimulate innate pro- and anti-inflammatory responses and induce apoptosis in Jurkat T cells. *Infect. Immun.* **82**, 1372–1381 (2014)
64. 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)
65. Yeh Y.-C., Lin T.-L., Chang K.-C., Wang J.-T.: Characterization of a ComE3 homologue essential for DNA transformation in *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **71**, 5427–5431 (2003)
66. 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**, 197–210 (2009)
67. Yonezawa H., Osaki T., Woo T., Kurata S., Zaman C., Hojo F., Hanawa T., Kato S., Kamiya S.: Analysis of outer membrane vesicle protein involved in biofilm formation of *Helicobacter pylori*. *Anaerobe*, **17**, 388–390 (2011)

Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka<sup>1\*</sup>, Anna Marta Banaś<sup>1</sup>,  
Magdalena Joanna Grzeszczuk<sup>1</sup>

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

Wpłynęło w styczniu 2017 r.  
Zaakceptowano w marcu 2017 r.

1. Wprowadzenie. 2. Analizy funkcjonowania białek Dsb *in vivo*. 2.1. Wyznaczanie stanu redoks białek. 2.2. Analiza fenotypowa zmutowanych szczepów. 3. Analizy funkcjonalne białek Dsb *in vitro*. 3.1. Test redukcji insuliny. 3.2. Określanie potencjału redoks. 3.3. Analiza aktywności oksydacyjnej i izomeryzacyjnej. 3.4. Określanie wartości pKa nukleofilowej cysteiny motywu CXXC. 3.5. Analizy oddziaływań pomiędzy DsbA a DsbB. 3.6. Struktury białek. 3.7. Identyfikacja substratów białek Dsb. 4. Podsumowanie

#### Strategies for the analysis of thioloxidoreductases

**Abstract:** Bacterial Dsb (disulfide bond) enzymes are involved in the oxidative folding of many proteins, through the formation of disulfide bonds between thiol groups of cysteine residues. This process is critical for the correct folding and structural stability of many secreted and membrane proteins. The rapidly expanding number of sequenced bacterial genomes has revealed the enormous diversity among bacterial Dsb systems. While the *Escherichia coli* oxidative protein folding has been studied in great details, the mechanism of the Dsb systems functioning in other bacteria are rather poorly understood. Herein, we present the current methodology, both *in vivo* and *in vitro* experimental techniques, which allow us to understand the functioning of the Dsb proteins and has broaden our knowledge in the field of biochemistry and microbiology of this posttranslational protein modification. Many bacterial virulence factors are extracytoplasmic Dsb-dependent proteins. Thus, this system plays an important role in bacterial pathogenesis and the proteins of the Dsb network represent possible targets for new drugs.

1. Introduction. 2. Analysis of the Dsb functioning *in vivo*. 2.1. Determination of the *in vivo* redox state. 2.2. Phenotypic assay of the mutated strains. 3. Analysis of the Dsb functioning *in vitro*. 3.1. Insulin reduction assay. 3.2. Determination of the redox potential. 3.3. Assay of the oxidative and isomerase activity. 3.4. Determination of the pKa value of the cysteine residue. 3.5. Determination of the interaction between DsbA and DsbB. 3.6. Protein structures. 3.7. Searching for Dsb protein substrates. 4. Conclusions

**Słowa kluczowe:** białka Dsb, cechy biochemiczne, EcDsbA, mostki disiarczkowe, struktura

**Key words:** Dsb proteins, EcDsbA, disulfide bonds, protein structure, biochemical attributes

## 1. Wprowadzenie

Potranslacyjne modyfikacje białek są istotnym procesem biologicznym, decydującym o strukturze i stabilności, a w konsekwencji o funkcjonalności wielu protein. Jedną z najpospolitszych modyfikacji jest wprowadzanie mostków disiarczkowych, polegające na utlenianiu grup tiolowych cystein, z jednoczesnym uwolnieniem dwóch elektronów. W komórkach bakterii Gram-ujemnych proces ten zachodzi w utleniających warunkach panujących w przestrzeni peryplazmatycznej. Generowanie mostków disiarczkowych jest etapem ograniczającym szybkość fałdowania białek. Chociaż *in vitro* zachodzi on spontanicznie, *in vivo* katalizowany jest przez zespół białek Dsb (*disulfide bond*). Badania prowadzone od ponad 20 lat zaowocowały szczegółową charakterystyką systemu Dsb modelowego mikroorganizmu, *Escherichia coli* K-12. W komórkach *E. coli* K-12 białka Dsb działają w dwóch szlakach: utleniania (EcDsbA, EcDsbB) i izomeryzacji/redukcji (EcDsbC i EcDsbD). W szlaku utleniania pomiędzy resztami cystein w białkach tworzone są wiązania disiarczkowe, natomiast w szlaku izomeryzacji/redukcji – naprawiane są błędy szlaku

utleniania. Monomeryczne, peryplazmatyczne białko EcDsbA, którego struktura zawiera charakterystyczną dla oksydoreduktaz tiolowosiarczkowych domenę tioredoksyny (TRX), katalizuje powstanie wiązania pomiędzy grupami tiolowymi cystein innych białek, zaraz po, lub czasami w trakcie, ich transportu przez błonę cytoplazmatyczną do peryplazmy. Kluczowe znaczenie dla funkcji tego enzymu ma zlokalizowany w domenie TRX motyw aktywny CXXC oraz aminokwasowa reszta cis-proliny, odległa w strukturze pierwszorzędowej, lecz sąsiadująca z motywem CXXC w strukturze trzeciorzędowej. Cysteiny motywu katalitycznego DsbA ulegają jednocześnie redukcji. Aby białko DsbA mogło przeprowadzić kolejny cykl reakcji, musi ono zostać ponownie utlenione. Za reoksydację enzymu EcDsbA odpowiedzialne jest EcDsbB (20 kDa), integralne białko błony cytoplazmatycznej, które zawiera cztery transbłonowe  $\alpha$ -helisy (TM1-TM4) oraz dwie pętle peryplazmatyczne (P1, P2). W każdej z pętli tworzony jest mostek disiarczkowy. Z DsbB elektrony przekazywane są na ostateczne receptory przez kompleksy białkowe wchodzące w skład łańcucha oddechowego. W białkach, które w sekwencji aminokwasowej posiadają więcej niż

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



dwie cysteiny istnieje możliwość błędnego wprowadzenia wiązań disiarczkowych, szczególnie w przypadku kiedy do prawidłowego funkcjonowania białka wymagane jest połączenie mostkiem reszt tiolowych cystein niesąsiadujących ze sobą. W komórkach *E. coli* K-12 nieprawidłowo wprowadzone wiązania są naprawiane przy udziale EcDsbC – izomerazy mostków disiarczkowych. Monomer EcDsbC (23 kDa) posiada C-końcową domenę tioredoksyny z motywem CXXC oraz N-końcową domenę dimeryzacyjną, warunkującą przyjęcie przez ten enzym struktury V-kształtnego homodimeru. Niezbędnych do przeprowadzenia reakcji izomeryzacji elektronów dostarcza zakotwiczone w błonie wewnętrznej, trójdomenowe białko EcDsbD, które transportuje je z cytoplazmatycznej tioredoksyny. Funkcjonowanie tych procesów zostało dokładnie opisane w kilku pracach przeglądowych [3, 10, 45, 57].

W ostatnich latach udokumentowano, że systemy Dsb, funkcjonujące w komórkach prokariota, charakteryzują się olbrzymią różnorodnością zarówno pod względem liczby białek Dsb, ich struktur, jak i wzajemnych interakcji. Wiele bakteryjnych genomów koduje kilka białek DsbA o różnej specyficzności substratowej, współpracujących z jednym lub kilkoma homologami EcDsbB [22]. W komórkach innych brak jest DsbB, a jego funkcję pełni homolog eukariotycznego białka – reduktazy epitlenku witaminy K (*VKOR-vitamin K epoxide reductase*) lub paralog DsbB, białko DsbI o nietypowej strukturze. N-końcowy fragment DsbI, zawierający pięć domen transbłonowych, przypomina klasyczne DsbB, podczas gdy C-końcowa domena zlokalizowana w peryplazmie przybiera strukturę  $\beta$ -propelera [16, 39, 63]. Chociaż większość opisanych jak dotąd homologów EcDsbA to białka monomeryczne, funkcję generowania mostków disiarczkowych w proteomach niektórych gatunków mikroorganizmów pełnią białka dimeryczne, o strukturach podobnych do izomerazy EcDsbC [9, 35, 52]. Wyjątkowo rozbudowany system Dsb występuje w komórkach *Legionella pneumophila*, gdzie funkcjonują dwa białka DsbA, dwa DsbB, dwa DsbD przy jednoczesnym braku DsbC [34–35]. Z drugiej strony, w komórkach *Helicobacter pylori* brak jest klasycznych białek DsbA/DsbB oraz DsbC/DsbD, a ich funkcję przejmują dwie nietypowe oksydoreduktazy HP0231 i HP0377 [4, 53]. Obserwowana różnorodność dotyczy też białek z nadrodziny DsbD transportujących elektrony niezbędne do procesu redukcji niektórych białek Dsb, między innymi DsbC. Opisano, jak dotąd, trzy membranowe białka zaangażowane w ten proces: DsbD, ScsB i CcdA [6–7, 32, 60]. Wiele przykładów różnorodności systemów Dsb podano w pracach przeglądowych do których odsyłamy czytelnika [20, 22, 38].

Stale rosnąca liczba szczepów bakterii patogennych, opornych na stosowane w terapiach ludzi antybiotyki, stanowi poważne zagrożenie dla ludzkości. Skuteczna

walka z chorobami zakaźnymi wymaga opracowania i wprowadzenia na rynek nowych klas leków, o odmiennych od antybiotyków mechanizmach działania. Na szeroką skalę prowadzone są aktualnie badania nad opracowywaniem leków blokujących procesy wirulencji. Wiele czynników wirulencji licznych bakterii patogennych to białka pozacytoplazmatyczne, zawierające więcej niż jedną resztę cysteinową. Dla osiągnięcia właściwej struktury wymagają wprowadzania mostków disiarczkowych pomiędzy grupami – SH reszt cysteinowych. Tak więc ta potranslacyjna modyfikacja często decyduje o patogenności drobnoustrojów, a białka Dsb można rozpatrywać jako cele nowych leków antybakteryjnych. Poznanie szczegółów mechanizmów ich działania oraz rozwiązanie struktur jest pierwszym krokiem prowadzącym do badań aplikacyjnych, umożliwiających planowanie inhibitorów. Praca przeglądowa przedstawia strategię stosowane w badaniach tiolowych oksydoreduktaz. Ich zastosowanie doprowadziło do pierwszych prób poszukiwania strategii blokowania procesów generowania mostków disiarczkowych.

## 2. Analizy funkcjonowania białek Dsb *in vivo*

### 2.1. Wyznaczanie stanu redoks

Tiolowe oksydoreduktazy występują w komórkach w formie zredukowanej (cysteiny z grupami tiolowymi – SH) oraz w formie utlenionej (wytworzony mostek disiarczkowy pomiędzy grupami – SH cystein). Białka Dsb będące oksydazami odpowiedzialne za wprowadzanie mostków disiarczkowych obecne są w komórce w formie utlenionej, podczas gdy izomerazy w formie zredukowanej. Obie formy konkretnego białka migrują w żelach SDS poliakrylamidowych z taką samą prędkością. Aby określić stan redoks białka stosuje się najczęściej związek alkilujący wolne grupy tiolowe: AMS (4-acetamido-49-maleimidylstilbene-2,2-disulfonic acid). Kowalencyjne dołączenie odczynnika do wolnych grup tiolowych skutkuje zwiększeniem masy cząsteczkowej białka o 490 Da na każdą wolną grupę – SH i zmianą jego mobilności, wykrywaną metodą SDS PAGE z zastosowaniem odpowiednich surowic. Metoda ta nosi nazwę „ASM trapping” [12]. W niektórych eksperymentach zamiast AMS stosowany jest odczynnik MalPEG5000 (polyethyleneglycol (PEG)-conjugated-maleimide), którego połączenie z grupą – SH skutkuje zwiększeniem masy cząsteczkowej białka o 5 kDa [35].

### 2.2. Analiza fenotypowa zmutowanych szczepów

Unieczynnienie genów kodujących białka odpowiedzialne za generowanie mostków disiarczkowych przeważnie, choć nie zawsze, wywołuje efekt plejotropowy.

Komórki pozbawione tych białek charakteryzują się podwyższoną wrażliwością na DTT, brakiem ruchliwości czy zwiększoną wrażliwością na działanie jonów metali ciężkich takich jak kadm czy miedź. Ponieważ podwyższone stężenie jonów miedzi skutkuje niewłaściwym zwijaniem białek, unieczynnienie białek Dsb o aktywności izomeryzacyjnej prowadzi do ich, podwyższonej w stosunku do komórek typu dzikiego, wrażliwości na ten pierwiastek. Tak więc strategią dostarczającą informacji o funkcjonowaniu badanego białka jest skonstruowanie odpowiednich mutantów i ich analiza fenotypowa [2, 35, 52, 59]. Należy jednak zaznaczyć, że niektóre białka Dsb charakteryzują się niską specyficznością substratową i wprowadzają mostki disiarczkowe tylko do jednego lub kilku substratów, a dla niektórych jak dotąd wszystkie analizy fenotypowe nie dały pozytywnych rezultatów [2, 19, 29, 62].

Efekty fenotypowe, będące konsekwencją delecji genu *dsbA* lub *dsbC* w komórkach *E. coli*, zostały już dokładnie poznane. Są to wyżej opisana wrażliwość na DTT, utrata ruchliwości (brak funkcjonalnego białka FlgI), podwyższona wrażliwość na jony kadmu czy dodatkowo obniżenie aktywności alkalicznej fosfatazy w wypadku inaktywacji genu *dsbA* [30, 48]. Delecja genu *dsbC* skutkuje wzrostem wrażliwości na jony miedzi i utratą mukoidalnego charakteru kolonii mutantów w genie *mdoG*. Warunki stresowe, będące efektem mutacji *mdoG*, aktywują układ dwuskładnikowy Rcs, w sposób zależny od błonowej lipoproteiny RcsF, zawierającej dwa mostki disiarczkowe. Uszkodzenie systemu Dsb (EcDsbC) uniemożliwia aktywację układu. Tak więc, mutanty *E. coli* w genie *mdoG* charakteryzują się mukoidalnym wzrostem, podczas gdy ten fenotyp nie występuje w komórkach podwójnych mutantów *mdoGdsbC* [8, 25, 40]. Stosowaną często strategią, pozwalającą na zrozumienie funkcjonowania badanej tiolowej oksydoreduktazy, są eksperymenty komplementacji mutacji *dsbA* lub/i *dsbC* w komórkach *E. coli*. Badane geny są klonowane w wektorach wahadłowych lub pod kontrolą indukcyjnych promotorów charakterystycznych dla komórek *E. coli* np. promotora genu arabinozowego [17, 35].

Ciekawych danych wyjaśniających mechanizmy funkcjonowania tiolowych oksydoreduktaz dostarczają też eksperymenty mutagenety specyficznej co do miejsca, dotyczące ich motywów katalitycznych lub analizujące funkcjonowanie hybrydowych białek, będących połączeniem różnych domen białek Dsb [4, 26, 48, 51, 56].

### 3. Analizy funkcjonalne białek Dsb *in vitro*

Białka stosowane do analiz biochemicznych oczyszczane są standardowymi metodami z zastosowaniem układów ekspresyjnych funkcjonujących w komórkach

*E. coli*. Najczęściej odpowiednie geny klonowane są w plazmidach z serii pET z pominięciem fragmentu 5' kodującego sekwencję sygnałną, a następnie nadproduktowane i oczyszczane z cytoplazmy komórek gospodarza z zastosowaniem chromatografii powinowactwa.

#### 3.1. Test redukcji insuliny

Test ten jest powszechnie stosowany do określenia czy badane białko należy do rodziny oksydoreduktaz, niezależnie od tego, czy uczestniczy w szlaku utleniania czy redukcji wiązań disiarczkowych *in vivo*. Czwartorzędowa struktura insuliny składa się z dwóch łańcuchów: A i B połączonych ze sobą dwoma mostkami disiarczkowymi. Redukcja wiązań disiarczkowych skutkuje precypitacją łańcucha B insuliny. Kinetyka procesu jest monitorowana spektrofotometrycznie [37]. Ponieważ test mierzy właściwości redukujące białek, te o aktywnościach izomeraz wykazują zdecydowanie wyższą aktywność niż tiolowe oksydazy. I tak np. EcDsbA charakteryzuje tylko 10% aktywności EcDsbC. Niektóre homologi EcDsbA (MtDsbA czy SaDsbA) nie są zdolne do redukcji insuliny, co wskazuje na ich lekko odmienną strukturę oraz wąską specyficzność substratową [23, 47]. W celu zwiększenia czułości testu możliwe jest zastosowanie rekombinowanej insuliny, do której dołączono peptyd fluorescencyjny (FITC-insuline). Wzbudzenie fluorescencji światłem o określonej długości umożliwia precyzyjną detekcję zmian zachodzących podczas eksperymentu. Inną modyfikacją metody jest powiązanie redukcji insuliny przez badaną tiolową oksydazę z utlenieniem GSH do GSSG i wykorzystaniem przy pomiarze NADPH [64].

#### 3.2. Określanie potencjału redoks

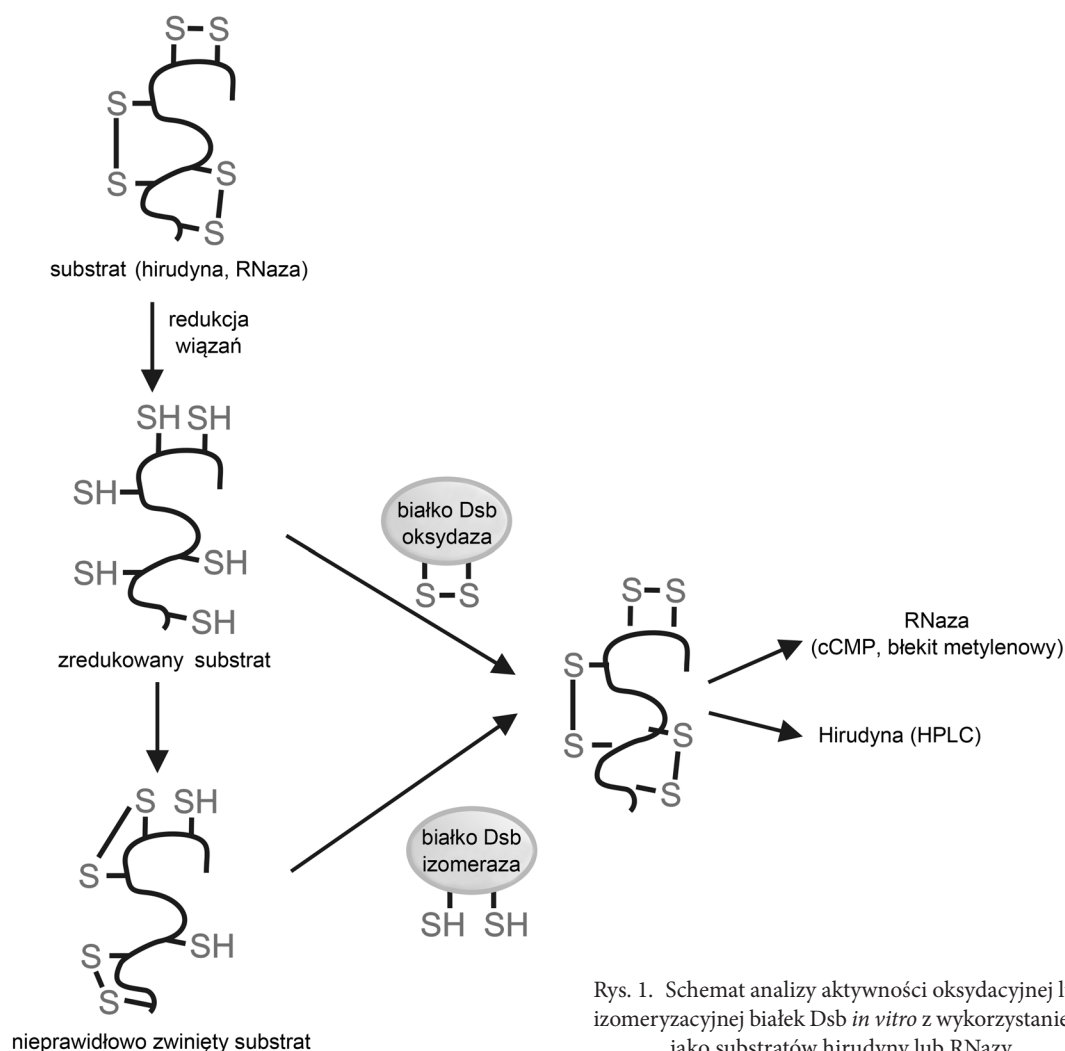
Tiolowo-disulfidowe oksydoreduktazy, w zależności od pełnionych funkcji, występują w komórce głównie w jednym z dwóch stanów: utlenionym bądź zredukowanym. Tendencja białka do występowania w bardziej uprzywilejowanej formie wyrażana jest ilościowo jako jego potencjał redoks. Potencjał redoks jest określany eksperymentalnie przez pomiar względnych ilości frakcji białka w formie utlenionej i zredukowanej w stanie równowagi ze związkiem o znanym potencjale redoks, np. glutationem (parą redoks glutationu zredukowanego – GSH i utlenionego – GSSG). Pomiar dokonywany jest z wykorzystaniem dwóch strategii, w zależności od obecności reszty tryptofanowej w sekwencji aminokwasowej białka: metodą fluorymetryczną lub analizując zmiany stanu redoks białka z zastosowaniem odczynnika alkilującego AMS. Metoda fluorymetryczna polega na monitorowaniu zmian fluorescencji tryptofanu, uzależnionych od występowania białka w formie utlenionej lub zredukowanej. Potencjał redoks

białka wyznaczany jest zgodnie z równaniem Nernsta [37, 52, 66]. Oksydazy charakteryzuje potencjał redoks znacznie wyższy od potencjału redoks izomera. Najniższym potencjałem redoks charakteryzują się cytoplazmatyczne tioredoksyny utrzymujące białka w tym przedziale komórkowym w stanie zredukowanym.

### 3.3. Analiza aktywności oksydacyjnej i izomeryzacyjnej

W celu weryfikacji zdolności badanej tiolowej oksydoreduktazy do generowania mostków disiarczkowych lub rearanżacji nieprawidłowo wprowadzonych mostków, stosowane są testy *in vitro* z oczyszczonymi białkami, z zastosowaniem dwóch substratów: RNazy lub hirudyny. RNazaA jest polipeptydem składającym się ze 124 aminokwasów, które w strukturze drugorzędowej tworzą cztery anty-równoległe  $\beta$ -kartyki i trzy  $\alpha$ -helisy. Białko stabilizowane jest przez cztery mostki disiarczkowe (trzy wiązania -S-S- pomiędzy niesąsiadującymi cysteinami 26–84; 40–95; 58–110 i jedno między sąsiadującymi cysteinami w pozycjach 65–72). Prawidłowa lokalizacja mostków disiarczkowych jest kluczowa dla

zachowania funkcji biochemicznych białka [49, 55]. Hirudyna, inhibitor trombiny, jest polipeptydem składającym się z 65 aminokwasów, które zorganizowane są w domenę N-terminalną, zawierającą trzy mostki disiarczkowe i domenę C-terminalną, która nie wykazuje uporządkowanej organizacji bez stworzenia kompleksu z trombiną. Oba substraty stosowane są w dwóch formach: jako białka o zredukowanych mostkach (cysteiny z grupami -SH) lub niepoprawnie zwinięte białka tzw. scrambled (sc) formy białek. Dla określenia aktywności RNazy stosowane są najczęściej dwa testy: test z zastosowaniem błękitu metylenowego MBAS (Methylene Blue Assay), w którym poprzez pomiar absorbancji oceniana jest interkalacja cząsteczek barwnika do RNazy lub pomiar monitorujący zdolność RNazy do rozkładu cyklicznego związku cCMP. Gdy jako substrat stosowana jest hirudyna, powstające kompleksy hirudyny z substratem rozdzielane są z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z fazą odwróconą (HPLC – High Performance Liquid Chromatography), a kinetyka reakcji może być także, w niektórych przypadkach, monitorowana fluorometrycznie [4–5, 18, 26, 36, 46, 48, 51]. Rysunek 1



Rys. 1. Schemat analizy aktywności oksydacyjnej lub izomeryzacyjnej białek Dsb *in vitro* z wykorzystaniem jako substratów hirudyny lub RNazy

przedstawia zasady analizy aktywności oksydacyjnej lub izomeryzacyjnej białek Dsb.

### 3.4. Określenie wartości $pK_a$ nukleofilowej cysteiny motywu CXXC

Wartość  $pK_a$  cysteiny pozwala określić w jakim pH cysteina występuje w równowadze w formie uprotowanej i w formie anionu tiolowego. Oksydoreduktazy są aktywne w reakcjach wprowadzania mostków disiarczkowych, gdy pierwsza cysteina motywu CXXC występuje w formie anionu tiolowego. Poziom jonizacji tej cysteiny określa wartość  $pK_a$ . Anion tiolowy charakteryzuje się wyższą absorpcją niż grupa tiolowa przy długości fali = 240 nm. Umożliwia to określenie wartości  $pK_a$  kontrolując absorpcję przy tej długości fali, przy stopniowym obniżaniu pH [23]. Występuje ścisły związek pomiędzy wartością  $pK_a$  a potencjałem redukcyjnym białka – im niższa wartość  $pK_a$  N-terminalnej cysteiny motywu CXXC tym wyższy potencjał redukcyjny.

### 3.5. Analizy oddziaływań pomiędzy DsbA a DsbB

EcDsbB, białko błony wewnętrznej o czterech domenach transbłonowych, zawiera w sekwencji aminokwasowej cztery cysteiny tworzące dwa mostki disiarczkowe. Pierwszy zlokalizowany w pierwszej pętli peryplazmatycznej (Cys41-Cys44) i drugi pomiędzy Cys104 i Cys130 w drugiej pętli peryplazmatycznej. Oba są niezbędne w procesie reutlenia EcDsbA, przekazywania elektronów z DsbA na łańcuch oddechowy. W pierwszym etapie tej reakcji następuje atak zlokalizowanej na powierzchni białka DsbA Cys30 na mostek Cys104-Cys130, co doprowadza do powstania międzycząsteczkowego wiązania pomiędzy DsbA i DsbB (Cys30-Cys104). Zredukowana Cys130 atakuje mostek disiarczkowy w pierwszej pętli peryplazmatycznej (Cys41-Cys44), dochodzi do powstania przejściowego wiązania między Cys41 a Cys130. W następnym etapie następuje związanie ubichinonu, co doprowadza do dalszego transportu elektronów i odtworzenia struktury zarówno EcDsbA jak i EcDsbB. Proces przekazywania elektronów podczas reutlenia białka EcDsbA prezentuje rysunek 2. Badania strukturalne pozwoliły na identyfikację krótkiego peptydu EcDsbB odpowiedzialnego za wiązanie EcDsbA z EcDsbB, jest to peptyd w obrębie którego, występuje Cys104 (98PSPFATCDFM107) [27–28, 68]. Struktura EcDsbA, w powiązaniu z lekko zmienionym, ze względów metodycznych peptydem, pochodnym EcDsbB, też została rozwiązana [15]. W celu potwierdzenia reutlenia DsbA przez DsbB *in vivo* analizowany jest stan redoks tiolowej oksydazy w mutantach w genach homologach *dsbB* (AMS trapping) lub zdolność białka do komplementacji mutantów *E. coli dsbA dsbB*. Opracowano

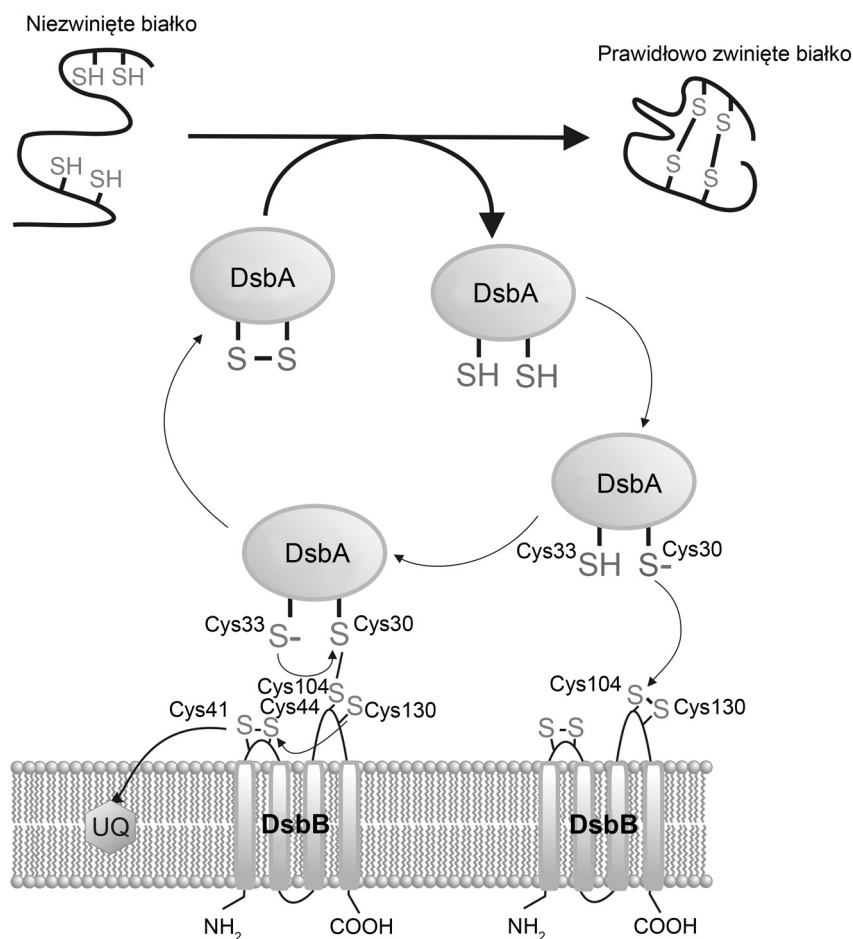
też testy *in vitro* weryfikujące oddziaływania DsbB lub pochodnych od niego peptydów z DsbA. Można przy ich użyciu monitorować proces utleniania DsbA przez DsbB lub zdolność DsbA do utleniania naturalnych lub syntetycznych substratów w obecności DsbB [2, 14–15].

### 3.6. Struktury białek Dsb

Rozwiązywane struktury białek Dsb (pojedynczo lub w kompleksach z ich partnerami) pozwalają wnikać głęboko w mechanizmy ich wzajemnych interakcji i zrozumieć jak stosunkowo niewielkie różnice w sekwencjach aminokwasowych mogą być odpowiedzialne za istotne zmiany w ich funkcjonowaniu. Jak dotąd, głównie na drodze krystalografii, rozwiązano wiele struktur monomerycznych białek DsbA. Ich porównanie, w połączeniu z analizami cech biochemicznych, pozwoliło na podział białek na dwie klasy i kilka podklas [44]. Rozwiązane zostały także struktury dimerycznych białek Dsb o różnych funkcjach [21, 43, 67] oraz białek biorących udział w przekazywaniu elektronów zarówno z peryplazmy na kompleksy białkowe łańcucha oddechowego, jak i z cytoplazmatycznej tioredoksyny do peryplazmy [28, 60–61, 65, 68].

### 3.7. Identyfikacja substratów białek Dsb

Istotnym elementem prowadzącym do zrozumienia funkcjonowania sieci Dsb jest identyfikacja substratów białek Dsb, celów działania zarówno tiolowych izomeraż jak i oksydaz. Wstępnym etapem badań są przeważnie analizy *in silico*, zidentyfikowanie w proteomach bakteryjnych białek zawierających cysteiny, określenie liczby cystein oraz potencjalnej lokalizacji białka. Udokumentowano, że reszty cysteinowe występują zdecydowanie częściej w białkach cytoplazmatycznych niż pozacytoplazmatycznych. Dodatkowo zdecydowana większość białek pozacytoplazmatycznych posiada parzystą liczbę reszt cysteinowych. Ten trend nazwany został „up and down” co oznacza, że na przykład, liczba białek posiadających dwie reszty cysteinowe zdecydowanie przewyższa liczbę tych posiadających trzy reszty cysteinowe. Tak więc pozacytoplazmatyczna lokalizacja białka z parzystą liczbą cystein wskazuje z dużym prawdopodobieństwem, że w jego strukturze obecne są mostki disiarczkowe [9, 16]. Informacyjne są też analizy modelowania struktur białek, które pozwalają na przewidywanie ułożenia mostków disiarczkowych, odpowiedzi na pytanie czy są tworzone pomiędzy sąsiadującymi czy niesąsiadującymi cysteinami. Dodatkowo w ostatnich latach opracowano kilka metod *in silico*, które z zastosowaniem odpowiednich algorytmów stosowane są do poszukiwań białek zawierających mostki disiarczkowe [41–42, 58]. Pierwsze analizy identyfikacji



Rys. 2. Proces przekazywania elektronów podczas reutlenia białka EcDsbA przez EcDsbB

W pierwszym etapie reakcji następuje atak zlokalizowanej na powierzchni białka DsbA Cys30 na mostek Cys104-Cys130 EcDsbB, co doprowadza do powstania międzycząsteczkowego wiązania pomiędzy DsbA i DsbB (Cys30-Cys104). Zredukowana Cys130 atakuje mostek disiarczkowy w pierwszej pętli peryplazmatycznej (Cys41-Cys44), dochodzi do powstania przejściowego wiązania między Cys41 a Cys130. W następnym etapie następuje związanie ubichinonu (UQ), co doprowadza do dalszego transportu elektronów i odtworzenia struktury zarówno EcDsbA jak i EcDsbB.

jące substraty białek Dsb obejmowały porównawcze badania subproteomów peryplazmatycznych szczepów *Salmonella enterica* i *E. coli* typu dzikiego z odpowiednimi izogenicznymi mutantami w genach *dsb* [1, 24]. Prowadzone w następnych latach badania innych przedziałów komórkowych niż peryplazma wykazały, że wiele białek posiadających mostki disiarczkowe to białka o strukturze beta-baryłek, zlokalizowane w błonie zewnętrznej [33, 40, 54]. W badaniach porównawczej proteomiki szczepów *Pseudomonas aeruginosa* typu dzikiego i mutantu w genie *PadsbA1* użyto preparatu białek peryplazmatycznych wzbogaconych o białka osłon komórkowych, co zaowocowało identyfikacją ponad dwudziestu uprzednio nieopisanych substratów PaDsbA1 [2]. Kompleksy tworzone pomiędzy białkami Dsb a ich substratami są przejściowe i trudne do wykrycia. Zastosowanie odpowiednich mutacji punktowych opóźniających rozwiązanie kompleksów pozwala na identyfikację substratów białek Dsb. Jedną ze stosowanych mutacji jest zamiana C-terminalnej

cysteiny motywu CXXC na serynę (CXXC na CXXS). Wiadomo, że redukcja mostka disiarczkowego rozpoczyna się od ataku nukleofilowego N-terminalnej cysteiny motywu CXXC na jej cel działania (mostek disiarczkowy). Powstałe międzycząsteczkowe wiązanie jest następnie szybko redukowane przez C-terminalną cysteinę. Zamiana tej cysteiny na serynę umożliwia utrwalenie i izolację kompleksów białkowych [11, 13, 40, 50]. Także zamiana proliny (element tzw. pętli cis pro, biorącej udział w wiązaniu zarówno substratu jak i partnera redoks czyli DsbB) na serynę lub treoninę – skutkuje nagromadzeniem kompleksów pomiędzy białkami Dsb a ich partnerem redoks lub substratami. Tę metodykę zastosowano po raz pierwszy do identyfikacji substratów EcDsbA, a ostatnio do identyfikacji substratów nietypowego białka DsbA2 *Legionella pneumophila* o aktywności zarówno oksydazy jak i izomezazy [29, 31]. Kompleksy białek Dsb z substratami, otrzymane z komórek badanych mikroorganizmów, są oczyszczane metodą chromatografii powinowactwa

i analizowane metodą SDS PAGE (z i bez DTT). Białka uwolnione z kompleksów są najczęściej identyfikowane na drodze spektrometrii mas.

#### 4. Podsumowanie

Opisane w prezentowanym artykule eksperymentalne metody stosowane w analizie białek Dsb przyczyniły się do zrozumienia funkcjonowania potranslacyjnej modyfikacji protein w komórkach wielu gatunków patogennych bakterii oraz wyjaśnienia ich wpływu na procesy wirulencji. Uzyskane dane pozwoliły na zapoczątkowanie badań mających na celu opracowanie metod blokowania tych procesów. Wyniki pierwszych przeprowadzonych eksperymentów wskazują, że białka Dsb będą w przyszłości wykorzystane jako cele działania nowych leków antybakteryjnych.

#### Podziękowania

Praca była finansowana z funduszy grantu NCN (Opus) 2015/17/B/NZ1/00230.

#### 5. Piśmiennictwo

- Agudo D., Mendoza M.T., Castanares C., Nombela C., Rotger R.: A proteomic approach to study *Salmonella typhi* periplasmic proteins altered by a lack of the DsbA thiol: disulfide isomerase. *Proteomics*, **4**, 355–363 (2004)
- Arts I.S., Ball G., Leverrier P., Garvis S., Nicolaes V., Vertommen D., Ize B., Tamu Dufe V., Messens J., Voulhoux R., Collet J.F.: Dissecting the machinery that introduces disulfide bonds in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*, **4**, e00912–00913 (2013)
- Berkmen M.: Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **82**, 240–251 (2012)
- Bocian-Ostrzycka K.M., Grzeszczuk M.J., Banaś A.M., Jastrząb K., Pisarczyk K., Kolarzyk A., Łasica A.M., Collet J.-F., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Engineering of *Helicobacter pylori* Dimeric Oxidoreductase DsbK (HP0231). *Frontiers in Microbiology*, **7**, 1158 (2016)
- Chim N., Harmston C.A., Guzman D.J., Goulding C.W.: Structural and biochemical characterization of the essential DsbA-like disulfide bond forming protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Struct. Biol.* **13**, 23 (2013)
- Cho S.H., Collet J.F.: Many roles of the bacterial envelope reducing pathways. *Antioxid. Redox Signal.* **18**, 1690–1698 (2013)
- Cho S.H., Parsonage D., Thurston C., Dutton R.J., Poole L.B., Collet J.F., Beckwith J.: A new family of membrane electron transporters and its substrates, including a new cell envelope peroxiredoxin, reveal a broadened reductive capacity of the oxidative bacterial cell envelope. *mBio*, **3**, e00291–11. (2012)
- Cho S.H., Szewczyk J., Pesavento C., Zietek M., Banzhaf M., Roszczenko P., Asmar A., Laloux G., Hov A.K., Leverrier P., Van der Henst C., Vertommen D., Typas A., Collet J.F.: Detecting envelope stress by monitoring beta-barrel assembly. *Cell*, **159**, 1652–1664 (2014)
- Daniels R., Mellroth P., Bernsel A., Neiers F., Normark S., von Heijne G., Henriques-Normark B.: Disulfide bond formation and cysteine exclusion in gram-positive bacteria. *J. Biol. Chem.* **285**, 3300–3309 (2010)
- Denoncin K., Collet J.F.: Disulfide bond formation in the bacterial periplasm: major achievements and challenges ahead. *Antioxid. Redox Signal.* **19**, 63–71 (2013)
- Denoncin K., Vertommen D., Paek E., Collet J.F.: The protein-disulfide isomerase DsbC cooperates with SurA and DsbA in the assembly of the essential beta-barrel protein LptD. *J. Biol. Chem.* **285**, 29425–29433 (2010)
- Denoncin K., Nicolaes V., Cho S.H., Leverrier P., Collet J.F.: Protein disulfide bond formation in the periplasm: determination of the *in vivo* redox state of cysteine residues. *Methods Mol. Biol.* **966**, 325–336 (2013)
- Depuydt M., Leonard S.E., Vertommen D., Denoncin K., Morsomme P., Wahni K., Messens J., Carroll K.S., Collet J.F.: A periplasmic reducing system protects single cysteine residues from oxidation. *Science*, **326**, 1109–1111 (2009)
- Duprez W., Bachu P., Stoermer M.J., Tay S., McMahon R.M., Fairlie D.P., Martin J.L.: Virtual Screening of Peptide and Peptidomimetic Fragments Targeted to Inhibit Bacterial Dithiol Oxidase DsbA. *PLoS ONE*, **10**, e0133805 (2015)
- Duprez W., Premkumar L., Halili M.A., Lindahl F., Reid R.C., Fairlie D.P., Martin J.L.: Peptide Inhibitors of the *Escherichia coli* DsbA Oxidative Machinery Essential for Bacterial Virulence. *J. Med. Chem.* **58**, 577–587 (2015)
- Dutton R.J., Boyd D., Berkmen M., Beckwith J.: Bacterial species exhibit diversity in their mechanisms and capacity for protein disulfide bond formation. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 11933–11938 (2008)
- Grabowska A.D., Wywiał E., Dunin-Horkawicz S., Łasica A.M., Wosten M.M., Nagy-Staron A., Godlewska R., Bocian-Ostrzycka K., Pienkowska K., Laniewski P., Bujnicki J.M., van Putten J.P., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Functional and bioinformatics analysis of two *Campylobacter jejuni* homologs of the thiol-disulfide oxidoreductase, DsbA. *PLoS ONE*, **9**, e106247 (2014)
- Greiner-Stoeffele T., Grunow M., Hahn U.: A general ribonuclease assay using methylene blue. *Anal. Biochem.* **240**, 24–28 (1996)
- Grimshaw J.P., Stirnimann C.U., Brozzo M.S., Malojcic G., Grutter M.G., Capitani G., Glockshuber R.: DsbL and DsbI form a specific dithiol oxidase system for periplasmic arylsulfate sulfotransferase in uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **380**, 667–680 (2008)
- Hatahet F., Boyd D., Beckwith J.: Disulfide bond formation in prokaryotes: history, diversity and design. *Biochim. Biophys. Acta*, **1844**, 1402–1414 (2014)
- Heras B., Edeling M.A., Schirra H.J., Raina S., Martin J.L.: Crystal structures of the DsbG disulfide isomerase reveal an unstable disulfide. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 8876–8881 (2004)
- Heras B., Shouldice S.R., Totsika M., Scanlon M.J., Schembri M.A., Martin J.L.: DSB proteins and bacterial pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 215–225 (2009)
- Heras B., Kurz M., Jarrott R., Shouldice S.R., Frei P., Robin G., Cemazar M., Thony-Meyer L., Glockshuber R., Martin J.L.: *Staphylococcus aureus* DsbA does not have a destabilizing disulfide. A new paradigm for bacterial oxidative folding. *J. Biol. Chem.* **283**, 4261–4271 (2008)
- Hiniker A., Bardwell J.C.: *In vivo* substrate specificity of periplasmic disulfide oxidoreductases. *J. Biol. Chem.* **279**, 12967–12973 (2004)
- Hiniker A., Collet J.F., Bardwell J.C.: Copper stress causes an *in vivo* requirement for the *Escherichia coli* disulfide isomerase DsbC. *J. Biol. Chem.* **280**, 33785–33791 (2005)

26. Hiniker A., Ren G., Heras B., Zheng Y., Laurinec S., Jobson R.W., Stuckey J.A., Martin J.L., Bardwell J.C.: Laboratory evolution of one disulfide isomerase to resemble another. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 11670–11675 (2007)
27. Inaba K., Ito K.: Structure and mechanisms of the DsbB-DsbA disulfide bond generation machine. *Biochim. Biophys. Acta*, **1783**, 520–529 (2008)
28. Inaba K., Murakami S., Suzuki M., Nakagawa A., Yamashita E., Okada K., Ito K.: Crystal structure of the DsbB-DsbA complex reveals a mechanism of disulfide bond generation. *Cell*, **127**, 789–801 (2006)
29. Jameson-Lee M., Garduno R.A., Hoffman P.S.: DsbA2 (27 kDa Com1-like protein) of *Legionella pneumophila* catalyses extra-cytoplasmic disulphide-bond formation in proteins including the Dot/Icm type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* **80**, 835–852 (2011)
30. Kadokura H., Katzen F., Beckwith J.: Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 111–135 (2003)
31. Kadokura H., Tian H., Zander T., Bardwell J.C., Beckwith J.: Snapshots of DsbA in action: detection of proteins in the process of oxidative folding. *Science*, **303**, 534–537 (2004)
32. Katzen F., Deshmukh M., Daldal F., Beckwith J.: Evolutionary domain fusion expanded the substrate specificity of the trans-membrane electron transporter DsbD. *EMBO J.* **21**, 3960–3969 (2002)
33. Koniger V., Holsten L., Harrison U., Busch B., Loell E., Zhao Q., Bonsor D.A., Roth A., Kengmo-Tchoupa A., Smith S.I., Mueller S., Sundberg E.J., Zimmermann W., Fischer W., Hauck C.R., Haas R.: *Helicobacter pylori* exploits human CEACAMs via HopQ for adherence and translocation of CagA. *Nat. Microbiol.* **2**, 16188 (2016)
34. Kpadeh Z.Z., Day S.R., Mills B.W., Hoffman P.S.: *Legionella pneumophila* utilizes a single-player disulfide-bond oxidoreductase system to manage disulfide bond formation and isomerization. *Mol. Microbiol.* **95**, 1054–1069 (2015)
35. Kpadeh Z.Z., Jameson-Lee M., Yeh A.J., Chertihin O., Shumilin I.A., Dey R., Day S.R., Hoffman P.S.: Disulfide bond oxidoreductase DsbA2 of *Legionella pneumophila* exhibits protein disulfide isomerase activity. *J. Bacteriol.* **195**, 1825–1833 (2013)
36. Kurz M., Iturbe-Ormaetxe I., Jarrott R., Cowieson N., Robin G., Jones A., King G.J., Frei P., Glockshuber R., O'Neill S.L., Heras B., Martin J.L.: Cloning, expression, purification and characterization of a DsbA-like protein from *Wolbachia pipientis*. *Protein Expr. Purif.* **59**, 266–273 (2008)
37. Lafaye C., Iwema T., Carpentier P., Jullian-Binard C., Kroll J.S., Collet J.F., Serre L.: Biochemical and structural study of the homologues of the thiol-disulfide oxidoreductase DsbA in *Neisseria meningitidis*. *J. Mol. Biol.* **392**, 952–966 (2009)
38. Lasica A.M., Jagusztyn-Krynicka E.K.: The role of Dsb proteins of Gram-negative bacteria in the process of pathogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**, 626–636 (2007)
39. Lasica A.M., Wyszynska A., Szymanek K., Majewski P., Jagusztyn-Krynicka E.K.: *Campylobacter* protein oxidation influences epithelial cell invasion or intracellular survival as well as intestinal tract colonization in chickens. *J. Appl. Genet.* **51**, 383–393 (2010)
40. Leverrier P., Declercq J.P., Denoncin K., Vertommen D., Hiniker A., Cho S.H., Collet J.F.: Crystal structure of the outer membrane protein RcsF, a new substrate for the periplasmic protein-disulfide isomerase DsbC. *J. Biol. Chem.* **286**, 16734–16742 (2011)
41. Lin H.H., Tseng L.Y.: DBCP: a web server for disulfide bonding connectivity pattern prediction without the prior knowledge of the bonding state of cysteines. *Nucleic Acids Res.* **38**, W503–507 (2010)
42. Marquez-Chamorro A.E., Aguilar-Ruiz J.S.: Soft Computing Methods for Disulfide Connectivity Prediction. *Evol. Bioinform. Online*, **11**, 223–229 (2015)
43. McCarthy A.A., Haebel P.W., Torronen A., Rybin V., Baker E.N., Metcalf P.: Crystal structure of the protein disulfide bond isomerase, DsbC, from *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 196–199 (2000)
44. McMahon R.M., Premkumar L., Martin J.L.: Four structural subclasses of the antivirulence drug target disulfide oxidoreductase DsbA provide a platform for design of subclass-specific inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta*. **1844**, 1391–1401 (2014)
45. Messens J., Collet J.F.: Pathways of disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**, 1050–1062 (2006)
46. Messens J., Collet J.F., Van Belle K., Brosens E., Loris R., Wyns L.: The oxidase DsbA folds a protein with a nonconsecutive disulfide. *J. Biol. Chem.* **282**, 31302–31307 (2007)
47. Premkumar L., Heras B., Duprez W., Walden P., Halili M., Kurth F., Fairlie D.P., Martin J.L.: Rv2969c, essential for optimal growth in *Mycobacterium tuberculosis*, is a DsbA-like enzyme that interacts with VKOR-derived peptides and has atypical features of DsbA-like disulfide oxidases. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **69**, 1981–1994 (2013)
48. Quan S., Schneider I., Pan J., Von Hacht A., Bardwell J.C.: The CXXC motif is more than a redox rheostat. *J. Biol. Chem.* **282**, 28823–28833 (2007)
49. Raines R.T.: Ribonuclease A. *Chem. Rev.* **98**, 1045–1066 (1998)
50. Ren G., Champion M.M., Huntley J.F.: Identification of disulfide bond isomerase substrates reveals bacterial virulence factors. *Mol. Microbiol.* **94**, 926–944 (2014)
51. Ren G., Stephan D., Xu Z., Zheng Y., Tang D., Harrison R.S., Kurz M., Jarrott R., Shouldice S.R., Hiniker A., Martin J.L., Heras B., Bardwell J.C.: Properties of the thioredoxin fold superfamily are modulated by a single amino acid residue. *J. Biol. Chem.* **284**, 10150–10159 (2009)
52. Roszczenko P., Radomska K.A., Wywiał E., Collet J.F., Jagusztyn-Krynicka E.K.: A novel insight into the oxidoreductase activity of *Helicobacter pylori* HP0231 protein. *PLoS ONE*, **7**, e46563 (2012)
53. Roszczenko P., Grzeszczuk M., Kobierecka P., Wywiał E., Urbanowicz P., Wincek P., Nowak E., Jagusztyn-Krynicka E.K.: *Helicobacter pylori* HP0377, a member of the Dsb family, is an untypical multifunctional CcmG that cooperates with dimeric thioldisulfide oxidase HP0231. *BMC Microbiol.* **15**, 135 (2015)
54. Ruiz N., Chng S.S., Hiniker A., Kahne D., Silhavy T.J.: Nonconsecutive disulfide bond formation in an essential integral outer membrane protein. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 12245–12250 (2010)
55. Ruoppolo M., Torella C., Kanda F., Panico M., Pucci P., Marino G., Morris H.R.: Identification of disulphide bonds in the refolding of bovine pancreatic RNase A. *Fold. Des.* **1**, 381–390 (1996)
56. Segatori L., Paukstelis P.J., Gilbert H.F., Georgiou G.: Engineered DsbC chimeras catalyze both protein oxidation and disulfide-bond isomerization in *Escherichia coli*: Reconciling two competing pathways. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 10018–10023 (2004)
57. Shouldice S.R., Heras B., Walden P.M., Totsika M., Schembri M.A., Martin J.L.: Structure and function of DsbA, a key bacterial oxidative folding catalyst. *Antioxid. Redox Signal.* **14**, 1729–1760 (2011)
58. Singh R.: A review of algorithmic techniques for disulfide-bond determination. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* **7**, 157–172 (2008)
59. Sinha S., Langford P.R., Kroll J.S.: Functional diversity of three different DsbA proteins from *Neisseria meningitidis*. *Microbiology*, **150**, 2993–3000 (2004)

60. Stirnimann C.U., Grutter M.G., Glockshuber R., Capitani G.: nDsbD: a redox interaction hub in the *Escherichia coli* periplasm. *Cell Mol. Life Sci.* **63**, 1642–1648 (2006)
61. Stirnimann C.U., Rozhkova A., Grauschopf U., Bockmann R.A., Glockshuber R., Capitani G., Grutter M.G.: High-resolution structures of *Escherichia coli* cDsbD in different redox states: A combined crystallographic, biochemical and computational study. *J. Mol. Biol.* **358**, 829–845 (2006)
62. Tinsley C.R., Voulhoux R., Beretti J.L., Tommassen J., Nassif X.: Three homologues, including two membrane-bound proteins, of the disulfide oxidoreductase DsbA in *Neisseria meningitidis*: effects on bacterial growth and biogenesis of functional type IV pili. *J. Biol. Chem.* **279**, 27078–27087 (2004)
63. Wang X., Dutton R.J., Beckwith J., Boyd D.: Membrane topology and mutational analysis of *Mycobacterium tuberculosis* VKOR, a protein involved in disulfide bond formation and a homologue of human vitamin K epoxide reductase. *Antioxid. Redox Signal.* **14**, 1413–1420 (2011)
64. Watanabe M.M., Laurindo F.R., Fernandes D.C.: Methods of measuring protein disulfide isomerase activity: a critical overview. *Frontiers in chemistry.* **2**, 73 (2014)
65. Williamson J.A., Cho S.H., Ye J., Collet J.F., Beckwith J.R., Chou J.J.: Structure and multistate function of the transmembrane electron transporter CcdA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 809–814 (2015)
66. Wunderlich M., Glockshuber R.: Redox properties of protein disulfide isomerase (DsbA) from *Escherichia coli*. *Protein Sci.* **2**, 717–726 (1993)
67. Yoon J.Y., Kim J., Lee S.J., Kim H.S., Im H.N., Yoon H.J., Kim K.H., Kim S.J., Han B.W., Suh S.W.: Structural and functional characterization of *Helicobacter pylori* DsbG. *FEBS Lett.* **585**, 3862–3867 (2011)
68. Zhou Y., Cierpicki T., Jimenez R.H., Lukasik S.M., Ellena J.F., Cafiso D.S., Kadokura H., Beckwith J., Bushweller J.H.: NMR solution structure of the integral membrane enzyme DsbB: functional insights into DsbB-catalyzed disulfide bond formation. *Mol. Cell.* **31**, 896–908 (2008)



## WRAŻLIWOŚĆ KRĘTKÓW *BORRELIA BURGDORFERI* SENSU LATO NA ANTYBIOTYKI *IN VITRO*

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 w Warszawie

Wpłynęło w styczniu 2017 r.  
Zaakceptowano w marcu 2017 r.

1. Wstęp. 2. Hodowla i wzrost *Borrelia burgdorferi* sensu lato w warunkach *in vitro*. 3. Wrażliwość na antybiotyki *Borrelia burgdorferi* *in vitro*. 4. Podsumowanie

### Susceptibility of spirochetes *Borrelia burgdorferi* sensu lato to antibiotics *in vitro*

**Abstract:** Empiric therapy has been applied in the treatment of Lyme disease. This therapy is selected following the sensitivity analysis of the proposed drug in all species of bacteria which can cause a similar type of infection and on the basis of the clinical efficacy of antibiotic treatment. Established schemes based on data collected from many centers in the world, including type of antibiotic, dose and duration of his administration, and the stage and form of Lyme disease have been created. Number of *in vitro* methods of spirochetes susceptibility to antibiotics has been also developed. Unfortunately, the lack of standardization often makes it impossible to compare the results of MIC and MBC. Furthermore, little is known about the interactions of the various antimicrobial substances and spirochetes. There is a need for testing of clinical strains isolated from patients after treatment, which would explain the problems associated with “refractory” cases of Lyme disease. The paper presents the research on the antibiotic-spirochete interactions observed *in vitro*.

1. Introduction. 2. *In vitro* culture and growth of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. 3. *In vitro* susceptibility of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto strains to antimicrobial agents. 4. Summary

**Słowa kluczowe:** *Borrelia burgdorferi*, antybiotyki

**Key words:** *Borrelia burgdorferi*, antibiotics

### 1. Wstęp

W leczeniu boreliozy z Lyme stosowana jest tzw. terapia empiryczna, dobrana na podstawie analizy wrażliwości na proponowany lek wszystkich gatunków bakterii, mogących wywołać podobny typ zakażenia oraz na podstawie oceny skuteczności klinicznej leczenia proponowanym antybiotykiem. Opierając się na danych zebranych z wielu ośrodków na świecie ustalono schematy, obejmujące zarówno rodzaj antybiotyku, dawki i czasokres jego podawania, a także stadium i postać boreliozy z Lyme. Ocena lekowrażliwości krętków *Borrelia burgdorferi* wyhodowanych z materiału pobranego od pacjenta i wprowadzenie tzw. terapii celowanej, zgodnej z profilem wrażliwości na leki wyhodowanego szczepu w boreliozie z Lyme, na dzień dzisiejszy nie jest możliwa. Trudności z oznaczeniem lekowrażliwości *in vitro* krętków *B. burgdorferi* wynikają z kilku przyczyn. Dotychczas opracowano tylko jedno płynne podłoże hodowlane, na którym te krętki rosną, przy czym wzrost jest bardzo powolny, gdyż czas podziału komórki wynosi średnio około 14–16 godzin. Ponadto, rzadko udaje się izolacja szczepu z materiału pochodzącego od chorego,

nawet po kilku miesięcznej hodowli, w związku z czym nie ma możliwości oceny różnorodności jak i lekowrażliwości uzyskiwanych izolatów [1, 10, 11, 12].

Jednak potrzeba określania lekowrażliwości krętków *B. burgdorferi* jest niewątpliwa ze względu na obserwowane niepowodzenia w leczeniu, a w związku z tym często zbyt długie podawanie antybiotyków, prowadzące u leczonych chorych do wystąpienia niepożądanych działań stosowanego leku. Szacuje się, że około 10–20% chorych poddanych 2–4 tygodniowej rekomendowanej antybiotykoterapii, nadal zgłasza objawy choroby, takie jak zmęczenie, bóle mięśni i stawów i inne dolegliwości. Objawy takie mogą występować przez wiele miesięcy po leczeniu i określane są jako zespół po leczeniu boreliozy z Lyme (post-treatment Lyme disease). Niektórzy badacze sugerują możliwość przetrwania krętków w organizmie chorego mimo terapii, ale jak dotychczas nie zostało to udowodnione.

Podjęmowane są coraz częściej próby opracowania metod oznaczenia wrażliwości na antybiotyki *in vitro*, ich standaryzacji i uzyskania porównywalnych wyników, z wykorzystaniem różnych modyfikacji proponowanych technik.

\* 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

## 2. Hodowla i wzrost *Borrelia burgdorferi* sensu lato w warunkach *in vitro*

Krętki *B. burgdorferi* sensu lato są bakteriami o bardzo dużych wymaganiach wzrostowych, które nie rosną na żadnych powszechnie stosowanych płynnych i stałych podłożach bakteriologicznych. Można je hodować wyłącznie na bardzo bogatym, płynnym podłożu Barbour-Stonner-Kelly'ego (BSK) i jego modyfikacjach, z dodatkiem surowicy króliczej. Na podłożu tym rosną jednak bardzo wolno, a wynik hodowli uzyskuje się po około 3 miesiącach inkubacji w temperaturze 31–34°C, w warunkach mikroaerofilnych, w atmosferze 5% dwutlenku węgla. W wyższej temperaturze następuje zahamowanie ich wzrostu. Dla uzyskania pojedynczych kolonii płynne podłoże BSK można zestalić agarom, co jednak nie skraca czasu hodowli. Z tego powodu klasyczne metody oznaczenia lekooporności, stosowane dla innych gatunków bakterii, w tym przypadku nie mają zastosowania [1].

Poza podłożem BSK, istnieje możliwość hodowli *B. burgdorferi* w komórkach linii tkankowych. Wykazano, że krętki mogą rosnąć w komórkach wyprowadzonych zarówno z tkanek kleszczy, jak i ssaków [5, 15, 16]. Obserwowano krętki penetrujące komórki eukariotyczne tj. adhezję bakterii na ich powierzchni, następnie wnikanie do wnętrza komórki i tworzenie wakuoli z części błony komórkowej. Wewnątrzkomórkowe namnażanie się krętków obserwowano zarówno w hodowlanych komórkach kleszczy, jak i ludzkich. Po kilku dniach komórki pękały, a uwolnione krętki przechodziły do przestrzeni międzykomórkowych i wnikały do kolejnych zdrowych komórek [4, 5]. Podczas hodowli w komórkach linii wyprowadzonych z tkanek kleszczy, u krętków obserwowano zmiany białek powierzchniowych oraz spadek liczby plazmidów [15].

## 3. Wrażliwość na antybiotyki *Borrelia burgdorferi* *in vitro*

Badania wrażliwości krętków *B. burgdorferi* sensu lato *in vitro* były od początku ograniczone z powodu stosowania niejednorodnych procedur badawczych oraz braku standaryzacji metod. W związku z tym, pochodzące z różnych laboratoriów wyniki badań wrażliwości *in vitro* tych bakterii, w tym wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC) jak i minimalnego stężenia krętkobójczego (MBC) oraz ich definicje, są często rozbieżne, a dane na temat antybiotykowrażliwości niespójne. Powoduje to, że np. wartość MIC dla penicyliny G waha się od 0,003 µg/ml do 8 µg/ml, a MBC od 0,05 µg/ml do > 50 µg/ml [2, 9, 11, 13, 14, 17]. Dodatkowo, dokładniejsze badania są ograniczone z powodu

małej liczby dostępnych izolatów, szczególnie tych, uzyskanych od chorych niepoddających się leczeniu.

Oznaczenie lekowrażliwości krętków *B. burgdorferi* prowadzone jest w podłożu BSK. Podjęte zostały próby opracowania zarówno metody oznaczenia wartości MIC jak i MBC oraz zobiektywizowania odczytu wyników badań. W tym celu opracowano kolorymetryczne oznaczenie w oparciu o odczyt spektrofotometryczny zmian barwy podłoża na różnych etapach badania [9]. Ponieważ wśród wielu czynników, duży wpływ na uzyskiwane wyniki ma gęstość badanej zawiesiny bakteryjnej, faza jej wzrostu oraz czas inkubacji, przyjęto zakres gęstości stosowanego *inoculum* od  $1 \times 10^4$  do  $2,5 \times 10^7$  krętków/ml, a czas inkubacji od 48 godzin do 10 dni.

MIC krętków można oznaczać klasyczną metodą rozcieńczeń w probówkach lub na sterylnych płytkach mikrotitracyjnych. Płytki zapewniają dużą oszczędność stosowanych odczynników. Antybiotyk rozcieńcza się w podłożu BSK i kolejne rozcieńczenia nakłada do probówek lub studzienek na płytce. Do podłoża z antybiotykiem dodaje się tę samą objętość zawiesiny krętków, zawierającą ściśle określoną liczbę komórek bakteryjnych. Ruchliwość krętków kontrolowana jest co 24 godziny [11].

W przypadku MBC postępowanie jest podobne jak w przy oznaczeniu MIC, jednak konieczne jest badanie sprawdzające żywotność [przeżycie] krętków po inkubacji z antybiotykiem. Utratę żywotności krętków po inkubacji z danym antybiotykiem określa się na 50% lub 90%. Na wynik ma wpływ zarówno stężenie badanej substancji, jak i czas inkubacji [17].

Wyniki badań wrażliwości *B. burgdorferi* na antybiotyki *in vitro*, wykazują szeroki zakres wartości MIC, a szczególnie wartości MBC. Oprócz wcześniej wymienionych czynników, na wynik badania wrażliwości krętków na antybiotyki wpływ ma surowica wzbogacająca podłoże hodowlane, która może powodować utratę aktywności bakteriobójczej niektórych antybiotyków, szczególnie, że dla określenia MBC konieczna jest kilku tygodniowa inkubacja krętków. Poza tym, antybiotyki mają najwyższą aktywność przeciwbakteryjną w czasie logarytmicznej fazy wzrostu bakterii. [10].

Heterogenność izolatów *B. burgdorferi* pod względem wrażliwości na antybiotyki *in vitro* była wykazywana przez wielu badaczy. Tabela I przedstawia wyniki oznaczenia wrażliwości szeregu szczepów izolowanych od chorych z rumieniem wędrującym (EM), przed i po leczeniu antybiotykami stosowanymi rutynowo jako leki pierwszego wyboru, które wykonano w jednym laboratorium [11, 12]. Hodując krętki *B. burgdorferi* w podłożu BSK, po 72 godzinach stwierdzano niewielkie różnice w wartościach MIC i MBC zastosowanych antybiotyków dla szczepów izolowanych przed i po leczeniu (Tabela I). Należy jednak zaznaczyć, że

Tabela I  
Średnie wartości MIC dla 5 szczepów *B. burgdorferi* izolowanych od chorych z rumieniem wędrującym przed i po leczeniu antybiotykami [11]

Antybiotyk	Średnie wartości MIC w µg/ml (zakresy) dla szczepów izolowanych:	
	przed leczeniem	po leczeniu
Azytromycyna	0,0019 (0,0002–0,0039)	0,001 (0,0004–0,0019)
Amoksycylina	0,5 (0,0156–2)	0,625 (0,5–0,625)
Cefuroksym	0,125 (0,0312–0,125)	0,125 (0,0312–0,125)
Ceftriakson	0,0625 (0,0078–0,0625)	0,0312 (0,0156–0,0312)
Doksycyklina	0,25 (0,125–0,25)	0,25 (0,125–0,25)

Tabela II  
Wartości MIC i MBC szczepów *B. burgdorferi* sensu lato izolowanych od chorych

Antybiotyk	Średnie wartości MIC i MBC w µg/ml (zakresy) dla izolowanych szczepów*	
	MIC	MBC
Doksycyklina	0,25 (0,0625–0,5)	16,0 (2,0–32,0)
Erytromycyna	0,0312 (0,0079–0,0625)	4,0 (1,0–>4,0)
Klarytromycyna	0,0079 (0,001–0,0156)	1,0 (0,25–4,0)
Amoksycylina	2,0 (0,125–4,0)	> 16,0 (2,0–> 16,0)
Cefuroksym	0,25 (≤0,063–0,25)	> 8,0 (1,0–> 8,0)
Ceftriakson	0,0625 (0,0156–0,125)	4,0(0,25–4,0)

\* zbadano 18 szczepów, w tym: 10 szczepów *B. spielmanii*, 2 szczepy *B. burgdorferi* sensu stricto, 3 szczepy *B. afzelii* i 3 szczepy *B. garinii* [14].

mieściły się one w zakresach przyjętych dla szczepów wrażliwych. Wartości MIC dla amoksycyliny, doksycykliny, ceftriaksonu i cefuroksymu, a więc podstawo-

wych antybiotyków stosowanych w leczeniu różnych stadiów boreliozy z Lyme, były podobne do oznaczeń uzyskanych w innych laboratoriach [7, 8, 11]. Natomiast w tych samych badaniach (Tabela II), wartości MIC dla azytromycyny (0,027–0,22 mg/ml) były wyższe w porównaniu z MIC dla innych szczepów, badanych w Europie oraz w Stanach Zjednoczonych [11, 14]. Obserwowano także różnice wrażliwości na antybiotyki izolatów należących do różnych genogatunków. Wartości MIC i MBC amoksycyliny były znamienne wyższe dla szczepów *B. afzelii* niż dla *B. garinii* [7]. Generalnie stwierdzono, że szczepy *B. garinii* wykazują większą wrażliwość na wiele antybiotyków w porównaniu ze szczepami *B. afzelii*.

Nowe grupy fluorochinolonów (klasa III i IV) są szeroko stosowane u dorosłych w leczeniu wielu zakażeń jako alternatywa dla antybiotyków β-laktamowych. Niektóre fluorochinolony o szerokim spektrum działania, mogą być skuteczne w leczeniu niektórych postaci boreliozy z Lyme, jak rumień wędrujący czy *Lyme arthritis*. Różnica zakresu wartości MIC pomiędzy pefloksacyną i gemifloksacyną jest niebagatelna i wynosi odpowiednio 4–64 i 0,03–0,25 µg/ml (Tabela III). Podobne różnice obserwowano w wartościach MBC poszczególnych klas tych antybiotyków dla wielu szczepów *B. burgdorferi* sensu stricto [13].

Penicilina G i ceftriakson są aktywne przeciw krętkom *B. burgdorferi* hodowanym w podłożu aksenicznym, natomiast tracą swoją skuteczność, gdy krętki są hodowane w linii komórkowej Vero [3]. Wskazuje to, że hodowla krętków w linii komórkowej chroni je przed działaniem antybiotyków. Nie jest to jednak cecha

Tabela III  
Aktywność fluorochinolonów *in vitro* przeciw szczepom *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Klasa	Nazwa	Średnie wartości MIC i MBC w µg/ml (zakresy)*	
		MIC	MBC
I	Norfloksacyna	8,0 (1,0–16,0)	>64,0 (8,0–> 64,0)
	Pefloksacyna	32,0 (4,0–64,0)	>64,0 (16,0–> 64,0)
II	Fleroksacyna	> 16,0 (4,0–> 16,0)	>16,0 (16,0–> 16,0)
	Ofloksacyna	8,0 (1,0–16,0)	>16,0 (8,0–> 16,0)
	Ciprofloksacyna	2,0 (0,25–8,0)	>16,0 (4,0–> 16,0)
III	Lewofloksacyna	4,0 (0,5–8,0)	16,0 (4,0–> 16,0)
	Sparfloksacyna	1,0 (0,06–8,0)	8,0 (2,0–> 16,0)
	Grepafloksacyna	0,5 (0,06–2,0)	8,0 (2,0–> 16,0)
IV	Gatifloksacyna	1,0 (0,25–2,0)	16,0 (4,0–16,0)
	Trowafloksacyna	1,0 (0,25–2,0)	16,0 (1,0–16,0)
	Moksyfloksacyna	2,0 (0,25–2,0)	16,0 (4,0–16,0)
	Clinafloksacyna	1,0 (0,25–4,0)	8,0 (1,0–16,0)
	Sitafloksacyna	0,50 (0,06–4,0)	8,0 (1,0–16,0)
	Gemifloksacyna	0,12 (0,03–0,25)	4,0 (0,25–16,0)

\* zbadano 11 szczepów izolowanych na terenie Stanów Zjednoczonych, Niemiec i Szwajcarii [13].

dotycząca wszystkich antybiotyków, bowiem liczba krętków rosnących w linii komórkowej w obecności erytromycyny i doksycykliny ulegała znacznej redukcji [3].

Krętki wnikając do komórek eukariotycznych, namnażają się w nich i przeżywają [4, 5]. Jeżeli zatem do hodowli dodawane są antybiotyki słabo przenikające do tkanek i komórek gospodarza, to nie będą one skutecznie niszczyły krętków, gdyż ich stężenie wewnątrz komórek będzie zbyt małe. Do tej grupy należą penicylina i ceftriakson. Czynniki decydującymi o zdolności przenikania do tkanek jest: lipofilowość cząsteczki antybiotyku, stopień wiązania z białkami krwi, pH w miejscu docelowym i wiele innych. Do antybiotyków łatwo przenikających do komórek gospodarza należą erytromycyna i doksycyklina.

Chociaż leczenie boreliozy z Lyme w większości przypadków jest skuteczne, szczególnie jeżeli zostanie zastosowane we wczesnej fazie choroby, pewna grupa chorych, jak już wcześniej wspomniano, cierpi z powodu zespołu po-boreliozowego, występującego po leczeniu boreliozy z Lyme. Mechanizm tego zjawiska jest niejasny. Niektórzy badacze sugerują, że część populacji krętków *B. burgdorferi* nabiera oporności na podawane antybiotyki. Nie ma jednak, jak dotychczas jednoznacznych wyników badań. Ostatnio wykazano, możliwość izolacji DNA *B. burgdorferi* od pacjenta z objawami zespołu po-boreliozowego, wskazującego na utrzymywanie się krętków w organizmie gospodarza, mimo podawania antybiotyków. Podobnie, w badaniach prowadzonych na myszach, obserwowano ponowne wykrycie DNA *B. burgdorferi* po 12 miesiącach od podawania antybiotyków. W tkankach tych myszy, mimo niemożności izolacji krętków, wykazano transkrypcję RNA wielu genów tych krętków [7].

Wyniki te sugerują, że *B. burgdorferi* stale może utrzymywać się w organizmie zakażonego człowieka mimo antybiotykoterapii. Wskazuje to, że obecnie stosowany schemat leczenia boreliozy z Lyme nie eliminuje całkowicie opornych szczepów *B. burgdorferi* (*B. burgdorferi* persists), chociaż z drugiej strony, nie ma dowodów wskazujących na obecność żywych bakterii w organizmie tych chorych.

Z biblioteki leków amerykańskiej Agencji Żywności i Leków (FDA – Food and Drug Administration), zawierającej 1524 substancje działające na stacjonarną fazę *B. burgdorferi*, wybrano 27 leków mających znacznie wyższą aktywność niż najważniejsze antybiotyki stosowane w leczeniu boreliozy z Lyme, jak doksycyklina i amoksycylina [6]. Zaobserwowano, że antybiotyki te są aktywne i działają bójczo tylko na krętki namnażające się w fazie logarytmicznego wzrostu, natomiast w fazie stacjonarnej mają niewielką aktywność. W fazie stacjonarnej krętki te tracą spiralną morfologię i przybierają kształt owalny bądź pałeczkowaty oraz tworzą agregaty komórek w formie mikrokolonii. Stwierdzono,

że w warunkach *in vitro* dautomycyna i daptomycyna są aktywne przeciw hodowiom *B. burgdorferi* w fazie stacjonarnej tworzącej mikrokolonie. Dodanie tych antybiotyków, obok doksycykliny i cefuroksymu, do hodowli *B. burgdorferi* o strukturze biofilmu, powoduje całkowitą jego eliminację [8]. Nie można osiągnąć tego efektu działając tylko doksycyliną, cefuroksymu i ceftriaksonem ponieważ jest to grupa antybiotyków działających na krętki tylko w młodych hodowlach, będących w logarytmicznej fazie wzrostu [7, 8].

#### 4. Podsumowanie

Chociaż nastąpił znaczący postęp wiedzy na temat wrażliwości *in vitro* szczepów *B. burgdorferi* sensu lato nadal niewiele wiadomo na temat wzajemnego oddziaływania leków przeciwbakteryjnych i krętków. Nieznane są również mechanizmy, które te bakterie mogłyby wykorzystywać, aby uniknąć działania antybiotyku w warunkach *in vivo*. Obecnie istnieje potrzeba dalszych badań szczepów klinicznych, izolowanych od chorych po zakończeniu terapii, co pozwoliłoby wyjaśnić zagadnienia związane z „opornymi na leczenie” przypadkami boreliozy z Lyme. Zadanie to jest trudne do realizacji ponieważ wykrycie patogenu i izolacja szczepu z próbek materiału klinicznego – pochodzących ze zmian skórnych nie przekracza 40–70% przypadków, 20% w neuroboreliozie i mniej niż 1% w *Lyme arthritis* [1].

Jednak w świetle wzrastającej liczby zachorowań, a w konsekwencji rosnących kosztów leczenia boreliozy z Lyme, zagadnienie to staje się narastającym, ważnym problemem zdrowia publicznego.

#### 5. Piśmiennictwo

1. Aguero-Rosenfeld M.E., Wang G., Swartz I., Wormer G.P.: Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 484–509 (2005)
2. Ates L., Hansen-Hübner C., Norris D.E., Richter D., Kraiczy P., Hunfeld K.-P.: Comparison of *in vitro* activities of tigecycline, doxycycline, and tetracycline against the spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Ticks Tick Borne Dis.* **1**, 30–34 (2010)
3. Brouqui P., Badiaga S., Raoult D.: Eucaryotic cells protect *Borrelia burgdorferi* from the action of penicillin and ceftriaxone but not from the action of doxycycline and erythromycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 1552–1554 (1996)
4. Chmielewski T., Tylewska-Wierzbanowska S.: Interaction between *Borrelia burgdorferi* and mouse fibroblasts. *Pol. J. Microbiol.* **59**, 157–160 (2010)
5. Comstock L.E., Thomas D.D.: Penetration of endothelial cell monolayers by *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **57**, 1626–1628 (1989)
6. Feng J., Wang T., Shi W., Zhang S., Sullivan D., Auwaerter P.G., Zhang Y.: Identification of novel activity against *Borrelia burgdorferi* persisters using an FDA approved drug library. *Emerg. Microbes Infect.* **3**, e49 (2014)

7. Feng J., Auwaerter P.G., Zhang Y.: Drug combination against *Borrelia burgdorferi* persists in vitro: eradication achieved by using daptomycin, cefoperazone and doxycycline. *PLoS ONE*, **10**, e0117207 (2015)
8. Feng J., Zhang S., Shi W., Zhang Y.: Ceftriaxone pulse dosing fails to eradicate bio-like microcolony *B. burgdorferi* persists which are sterilized by daptomycin/doxycycline/cefuroxime without pulse dosing. *Front. Microbiol.* **7**, 1744 (2016)
9. Hunfeld K.-P., Kraiczy P., Wichelhaue T.A., Schäfer V., Brade V.: Colorimetric in vitro susceptibility testing of penicillins, cephalosporins, macrolides, streptogramins, tetracyclines, and aminoglycosides against *Borrelia burgdorferi* isolates. *Intern. J. Med. Microbiol.* **15**, 11–17 (2000)
10. Hunfeld K.-P., Brade V.: Antimicrobial susceptibility of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: what we know, what we don't know, and what we need to know. *Wien. Klin. Wochenschr.* **22**, 659–668 (2006)
11. Hunfeld K.-P., Ruzic-Subljic E., Norris D. E., Kraiczy P., Strle F.: In vitro susceptibility testing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates cultured from patients with erythema migrans before and after antimicrobial chemotherapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 1294–1301 (2005)
12. Hunfeld K.-P., Ruzic-Subljic E., Norris D. E., Kraiczy P., Strle F.: Risk of culture-confirmed borrelial persistence in patients treated for erythema migrans and possible mechanisms of resistance. *Intern. J. Med. Microbiol.* 296 Suppl. **40**, 233–241 (2006)
13. Kraiczy P., Weigand J., Wichelhaus T. A., Heising P., Backes H., Schafer V., Acker G., Brade V., Hunfeld K.-P.: In vitro activities of fluoroquinolones against the spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2486–2494 (2001)
14. Morgenstern K., Bajler G., Norris D. E., Kraiczy P., Hanssen-Hübner C., Hunfeld K.-P.: In vitro susceptibility of *Borrelia spielmanii* to microbial agents commonly used for treatment of Lyme disease. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 1281–1284 (2009)
15. Obonyo M., Munderloch U. G., Fingerle V., Wilske B., Kurtti T.J.: *Borrelia burgdorferi* in tick cell culture modulates expression of outer surface proteins A and C in response to temperature. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 2137–2141 (1999)
16. Tylewska-Wierzbanowska S., Chmielewski T.: The isolation of *Borrelia burgdorferi* spirochetes from clinical material in cell line cultures. *Zbl. Bakt.* **286**, 363–370 (1997)
17. Veinovic G., Cerar T., Strle F., Lotric-Furlan S., Maraspin V., Cimperman J., Ruzic-Subljic E.: In vitro susceptibility of European human *Borrelia burgdorferi* sensu stricto strains to antimicrobial agents. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **41**, 288–291 (2013)



Małgorzata Łyszcz<sup>1</sup>, Anna Gałązka<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut BadawczyWpłynęło w grudniu 2016 r.  
Zaakceptowano w marcu 2017 r.

1. Wstęp. 2. Elektroforeza w gradiencie czynnika denaturującego DGGE, elektroforeza w gradiencie temperatury TGGE. 3. Polimorfizm konformacji pojedynczej nici DNA SSCP. 4. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (Real Time PCR). 5. Podsumowanie

**Genetic differentiation methods of microorganisms in the soil – plant system**

*Abstract:* Biodiversity is a key concept in finding important features of new microorganisms. Microorganisms play an important role in the soil ecosystem and participate, among others, in such processes as the maintenance of soil structure, humification, release of organic compounds, disposal of pollutants and transformation of organic matter. The maintenance of competent state of soil microbial communities, i.e. the appropriate microorganism count, activity and diversity, is a necessary condition for the functioning of a highly complex system such as the soil. Phyllosphere bacteria have the potential to influence plant biogeography and ecosystem function through their influence on plant performance under different environmental conditions, but the drivers of variation in leaf-associated bacterial biodiversity among host plants are not well understood. Hence, undoubtedly, an important research aspect is the selection and development of indicators to evaluate microbial biodiversity of the soil and plant phyllosphere. In this publication, selected molecular methods used for the diversity assessment of microorganisms have been presented.

1. Introduction. 2. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis DGGE, Temperature Gradient Gel Electrophoresis TGGE, 3. SSCP – single strand conformation polymorphism. 4. Real-Time Quantitative PCR. 5. Summary

**Słowa kluczowe:** bioróżnorodność, elektroforeza w gradiencie czynnika denaturującego, polimorfizm nici DNA, Real Time PCR  
**Key words:** biodiversity, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, single strand conformation polymorphism, Real Time PCR

**1. Wstęp**

Mikroorganizmy tworząc wielogatunkowe zbiorowiska, wytwarzają sieć zależności między poszczególnymi grupami fizjologicznymi [9]. Procesy syntezy i degradacji, przeprowadzane przez zbiorowiska mikroorganizmów, powinny być postrzegane jako suma funkcji, za które odpowiadają zespoły drobnoustrojów, a nie tylko pojedyncze gatunki. Badania aktywności mikroorganizmów w zbiorowiskach są niezbędne w celu poznania ekologii drobnoustrojów w biocenozach i powinny być analizowane w powiązaniu z istniejącymi warunkami środowiskowymi.

Różnorodność mikrobiologiczna może być ograniczona w warunkach naturalnych poprzez nieodpowiednie czynniki środowiskowe, do których należą m.in. ograniczone zasoby pokarmowe oraz zaburzenia ekologiczne i fizyczne czynniki przewyższające tolerancję organizmu, jak również interakcje międzygatunkowe uniemożliwiające występowanie lub utrzymanie gatunku w danym środowisku [18]. Stąd też niewątpli-

wie ważnym aspektem badawczym jest dobór i opracowanie wskaźników do oceny i kształtowania bioróżnorodności mikrobiologicznej środowiska glebowego i aktywności mikroorganizmów glebowych w różnych warunkach siedliskowych roślin oraz w różnych systemach gospodarowania [20, 32].

Prawidłową strukturę gleby oraz jej żyzność warunkuje wzmożona aktywność biologiczna gleby, tzn. prawidłowy rozwój, liczbę oraz skład gatunkowy mikroorganizmów, a także ich aktywność enzymatyczna. Drobnoustroje glebowe stanowią bardzo ważną funkcjonalnie grupę, należącą do organizmów zasiedlających glebę. Stąd też w badaniach nad występowaniem mikroorganizmów glebowych nie tylko ważna jest ich sama jakościowa i ilościowa obecność, ale przede wszystkim pełnione przez nie funkcje, ich rola w danym ekosystemie [8].

Fyllosfera wraz z zasiedlającymi ją organizmami ma duże znaczenie środowiskowe i rolnicze, głównie ze względu na wpływ mikroorganizmów na wzrost, rozwój a tym samym plonowanie roślin. Sprawia to, że

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

mikroorganizmy wraz z komórkami gospodarza tworzą kompleksowy ekosystem decydujący o wielu różnych procesach biologicznych. Mikroorganizmy kolonizują różne części roślin, występują na powierzchni liści, na korzeniach, w nasionach oraz międzykomórkowo i wewnątrzkomórkowo w tkankach i w wiązkach przewodzących. Miejsca te cechują się innymi warunkami i innymi wydzielinami, które mogą być źródłem węgla i energii lub czynnikiem hamującym rozwój dla określonych mikroorganizmów. Zasiedlenie powierzchni liści jest uzależnione od wielu czynników środowiskowych, od oddziaływań liść – środowisko oraz fizycznych i genetycznych właściwości rośliny i mikroorganizmów oraz sposobu uprawy i ochrony roślin. Często oddziaływanie to pozytywnie wpływa na rozwój roślin, przykładem może być wiązanie azotu atmosferycznego, poprawa nabycia składników odżywczych, ograniczenie infekcji patogenów roślinnych lub też degradacja niektórych zanieczyszczeń środowiskowych [29, 34]. Badania z zakresu różnorodności mikroorganizmów w środowisku, w tym i na powierzchni roślin są ważnym aspektem nie tylko z naukowego punktu widzenia, ale również z powodu dokładnego zrozumienia interakcji pomiędzy bioróżnorodnością a funkcją i strukturą konsorcjum mikroorganizmów.

W badaniach środowiskowych dąży się do wykorzystywania metod diagnostycznych, które precyzyjnie i w krótkim czasie oceniają stan drobnoustrojów występujących w danym środowisku. Szybkie i ciągłe zmiany środowiska glebowego czy też fytosfery powodują potrzebę tworzenia precyzyjnych testów diagnostycznych. Ponieważ większości drobnoustrojów nie można wyhodować na podłożach mikrobiologicznych, stąd też najskuteczniejszą metodą ich identyfikacji i analiz są metody biologii molekularnej. Badania środowiskowe coraz częściej koncentrują się na próbach oceny zmian w strukturze zespołów mikroorganizmów zachodzących pod wpływem czynników abiotycznych i biotycznych. Poszukuje się specjalnych bioindykatorów, które określają dowolną, genetycznie kontrolowaną cechę fenotypową lub też dowolną różnicę genetyczną wykorzystywaną w celu ujawnienia polimorfizmu osobniczego. W ten sposób określone są różnice występujące między poszczególnymi osobnikami, gatunkami i odmianami. Wskaźniki te nie powinny podlegać wpływom czynników środowiskowych, a ich główną zasadą jest ujawnianie szerokiego zakresu zmienności badanej cechy [32, 40]. Dobry system markerowy jest przede wszystkim powtarzalny, tani, wiarygodny, łatwy w aplikacji i nie wymagający skomplikowanego sprzętu do detekcji uzyskanych produktów. Dobór optymalnego systemu w badaniach genetycznych niejednokrotnie nastęrcza genetykom wiele trudności. Niemniej jednak wśród wielu dostępnych systemów markerowych i związanych z nimi technik można wybrać takie, które

właściwie zidentyfikują zmienność badanych sekwencji nukleotydowych. Poszczególne systemy różnią się między sobą, co wynika z ich specyfiki oraz typu i poziomu polimorfizmu, który określają [9, 40]. Narzędziami umożliwiającym analizę różnorodności mikrobiologicznej są techniki biologii molekularnej, techniki genetyczne, a wśród nich jedną z najważniejszych jest łańcuchowa reakcja polimerazy, czyli PCR (Polymerase Chain Reaction), technika opracowana w latach 1980. Większość metod analizy bioróżnorodności opiera się właśnie na technice PCR. Są to między innymi PCR-RFLP, TRFLP, ARDRA, rep-PCR, RAPD [39].

Poniżej scharakteryzowano wybrane i najbardziej popularne systemy molekularne wykorzystywane w badaniach bioróżnorodności mikroorganizmów, które bazują na technice PCR i właściwościach topnienia DNA: DGGE/TGEE, SSCP i Real Time PCR.

## **2. Elektroforeza w gradiencie denaturującym DGGE, elektroforeza w gradiencie temperatury TGGE**

Jednym z najbardziej skutecznych narzędzi biologii molekularnej, pozwalającym monitorować zmiany genotypowe jest metoda PCR-DGGE. Elektroforeza ta łączy amplifikację metodą łańcuchowej reakcji polimerazy z użyciem specyficznych lub ogólnych starterów z elektroforezą w gradiencie czynnika denaturującego.

Elektroforeza w gradiencie denaturującym DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) [11–12, 45, 53–54] i elektroforeza w gradiencie temperatury TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) [45, 53–54, 65]. Są to wydajne techniki molekularne, w których mogą być rozdzielane fragmenty DNA o takiej samej długości, ale o różnej sekwencji [45, 53–54]. Rozdzielanie fragmentów DNA powstałych w trakcie elektroforezy DGGE i TGGE jest zależne od zmniejszonej ruchliwości elektroforetycznej częściowo stopionych dwuniciowych cząsteczek DNA w żelu poliakrylamidowym zawierającym liniowy gradient denaturatów DNA lub temperatury [45, 53–54]. Pierwotnie techniki te zostały opracowane w celu wykrywania punktowych mutacji w sekwencji DNA [11, 35, 79]. Muyzer i wsp. [55] rozszerzyli stosowanie metody DGGE do analizy mikrobiologicznej bioróżnorodności genetycznej. DNA genomowy ekstrahowany z próbek środowiskowych, np. z gleby jest amplifikowany za pomocą reakcji PCR przy użyciu uniwersalnych starterów, które są skierowane do części sekwencji 16S rRNA bądź 18S rRNA [10, 50]. Pierwotnie proponowany system oparty był na regionie V3 genu 16S rRNA [24]. Heuer i wsp. [25] opisali układ PCR-DGGE w oparciu o region V6 tego samego genu. Region ten charakteryzuje się największą zmiennością w całym genie rRNA, co teoretycznie pozwala



na najbardziej optymalne typowanie niemal wszystkich zbiorowisk bakteryjnych [3, 57].

Początkowo, konsorcja mikroorganizmów porównywano wykorzystując amplikony otrzymane z tak zwanych uniwersalnych starterów, np. specyficznych dla domeny *Bacteria* [2, 24, 55]. Później zostały opracowane specyficzne startery skierowane do grup drobnoustrojów, co skutkuje lepszą oceną niektórych populacji i lepszą definicją złożonych wzorów konsorcjów z takich środowisk jak gleba czy ryzosfera. Niektóre z tych specyficznych starterów skierowane są do docelowych dużych grup bakterii, takich jak  $\alpha$  i  $\beta$ -*Proteobacteria* [1, 2] lub typu *Actinobacteria* [2, 23]. Dokładniejsze startery opracowano także dla rodzaju *Pseudomonas* [2, 16, 42, 48, 83], *Paenibacillus* [2, 7], *Burkholderia* [2, 66]. Opracowane zostały również startery oparte na sekwencji innych genów. Pierwszy zaprojektowany starter w analizie DGGE był oparty na genie *rpoB*, który koduje enzym polimerazę RNA [2, 59]. Do analizy DGGE wykorzystywane są, także inne geny funkcjonalne np. *nifH*, obecny w bakteriach wiążących azot [2, 64], czy gen *mxoF* obecny w *Methylobacterium* spp. i innych bakteriach metylotroficznym [2, 13, 22]. Zaletą analizy na podstawie genów funkcjonalnych jest możliwość identyfikacji mikroorganizmów jak również ocena aktywności zbiorowości w danym procesie w środowisku [2]. Po reakcji amplifikacji otrzymujemy mieszaninę fragmentów o takiej samej długości ale różnej sekwencji nukleotydowej, ponieważ w próbce znajduje się duża liczba różnych genotypów. Każdy z nich ma inną temperaturę topnienia DNA. Używane w procesie amplifikacji uniwersalne startery są bogate w sekwencje GC, mają dołączony tzw. „ogon” = „zacisk” GC, czyli fragment około 30 ÷ 40 par zasad GC, charakteryzujący się wysoką temperaturą topnienia, dzięki temu zapobiegamy całkowitemu rozszczepieniu (dysocjacji) nici DNA (przynajmniej część DNA pozostaje dwuniciowa). W przypadku braku „ogona” GC, DNA będzie ulegało denaturacji na pojedyncze nici [5, 8, 10, 35, 56, 87]. Najczęściej używanym „zaciskiem” GC jest zaprojektowany przez Muzer i wsp. [55]: 5'-CCG CGC CGC CCG GCG CCC CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G-3'. Istnieje jeszcze kilka „zacisków” GC obecnie używanych, które różnią się właściwościami topnienia, a tym samym są przydatne w szczególnych warunkach [54, 79]. Po elektroforezie zostaje utworzony określony wzór, czyli odcisk DNA tzw. „fingerprinting” określający genetyczną bioróżnorodność. Wynik analizy DGGE/TGGE przedstawia obraz składający się z prążków o różnych intensywnościach. Intensywności prążków odpowiadają częstotliwości poszczególnych produktów PCR w mieszaninie reakcyjnej [79]. Wzory DNA można wzajemnie porównywać, a dobrze rozdzielone prążki DGGE mogą zostać wycięte z żelu i mogą

być poddane identyfikacji przy zastosowaniu techniki sekwencjonowania (Rys. 1) [87].

Rozdzielanie jest oparte na różnicy w ruchliwości częściowo stopionych cząsteczek DNA w żelach poliakrylamidowych, zawierających liniowy gradient denaturantów DNA (mocznik i formamid). W gradiencie denaturacji, fragmenty DNA migrują pod wpływem pola elektrycznego, gdy fragment DNA osiąga pozycję w gradiencie, w którym się „topi”, to mobilność fragmentu szybko się zmniejsza [79]. Różnice w sekwencji w obrębie fragmentów DNA powodują różnicę w temperaturze topnienia, a tym samym wpływają na rozdział w denaturujących żelach gradientowych [10, 30, 51, 57, 66]. Po osiągnięciu swojego punktu denaturacji, jednoniciowe fragmenty DNA wykazują zmniejszoną ruchliwość elektroforetyczną zwaną retardacją [33]. Różne warianty sekwencji fragmentów DNA będą więc odzwierciedleniem migracji w różnych pozycjach w żelu, zgodnie ze stężeniem środka denaturującego [10]. Teoretycznie sekwencje DNA wykazujące różnice tylko w jednej z par zasad mogą być rozdzielone techniką DGGE [10, 47]. Metoda TGGE wykorzystuje tę samą zasadę, jak DGGE, ale opiera się na gradiencie temperatur zamiast denaturantów chemicznych [10, 30, 35, 56, 63].

Główne trudności i ograniczenia metody DGGE/TGGE to:

- dobór odpowiedniego startera do przedstawiania całej populacji mikroorganizmów,
- optymalizacja warunków elektroforezy,
- ograniczona czułość w wykrywaniu rzadkich członków populacji mikroorganizmów,
- oddzielenie tylko małych fragmentów DNA do 500 par zasad,
- odchylenia w reakcji PCR, które są mogą nie wyrazić prawdziwej różnorodności, ponieważ tylko gatunki dominujące ilościowo wykrywa się z powodu dużej ilości dostępnych wzorów DNA,
- zmienna efektywność ekstrakcji DNA – ocenia się, że metodą DGGE można wykryć tylko 1–2% populacji gatunków dominujących obecnych w reprezentatywnej próbce środowiskowej,
- fragmenty DNA różniące się sekwencją mogą mieć podobne cechy mobilności w żelu poliakrylamidowym,
- zaburzenia obrazu różnorodności zespołu mikroorganizmów z powodu występowania wielu genów 16S rRNA o nieco zmiennej sekwencji [5, 10, 41–42, 44, 54–55, 73, 80].

Z kolei zaletami metod DGGE / TGGE są:

- śledzenie zmian w populacji drobnoustrojów w odpowiedzi na bodźce,
- powtarzalność metod i niskie ich koszty,
- możliwość analizowania wielu próbek równocześnie [10, 30, 35, 55].

Metody DGGE/TGGE znajdują szerokie zastosowanie w badaniach dotyczących ekologii mikroorganizmów, a zwłaszcza w wykrywaniu i porównywaniu populacji drobnoustrojów, a także w analizie mikrobiologicznej różnorodności w obrębie różnych środowisk, w tym także gleb skażonych [5, 41].

Ji i wsp. [28] w glebach sztucznie zanieczyszczonych związkami z grupy monoaromatycznych węglowodorów (benzen, toluen, etylobenzen oraz ksylen), analizowali zmiany w obrębie populacji mikroorganizmów, co w rezultacie wskazywało na wzrost liczby bakterii z grupy *Acinetobacter* i *Bacillus*. Inne obserwacje dotyczące bakterii z grupy *Sphingomonas* wyizolowanych z gleb zanieczyszczonych różnymi stężeniami WWA (wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne) wykazały, że najmniejszą bioróżnorodność (w obrębie tego rodzaju) wykazują gleby zanieczyszczone WWA [37]. W glebie zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi często wykształca się bardzo aktywna autochtoniczna grupa drobnoustrojów wykorzystująca składniki zanieczyszczeń jako jedyne źródło węgla [14, 15].

Z kolei celem pracy Vendan i wsp. [82] było określenie zmiany w profilach PCR-DGGE zbiorowisk bakterijskich związanych z ryzosferą żeńszczenia. Zaobserwowano różnice w dominacji intensywności pasm DNA w profilu, wskazujące na wahania w strukturze populacji mikroorganizmów. Niektóre zespoły były intensywne w profilu DGGE gleby z ryzosfery, a inne były bardzo słabe, co wskazuje, że ich poziom w populacji był niski. W glebie dominowały rzędy *Actinomycetales* z *Actinobacteria*, *Sphingomonadales* i *Rhizobiales* z  $\alpha$ -*Proteobacteria*. Zaobserwowano, że gleba ryzosferowa jednorocznego jak i dwuletniego żeńszczenia jest bogata w bakterie z typu *Actinobacteria* i  $\alpha$ -*Proteobacteria*. Mieszany skład organizmów odnotowano w trzecim i czwartym roku badań. Skład populacyjny bakterii w ryzosferze może zmieniać się dynamicznie i może mieć duży wpływ na rozwój roślin. Z kolei wiek rośliny jest jednym z ważniejszych czynników, które wpływają na mikrobiologiczną populację związaną z ryzosferą rośliny.

Yang i wsp. [86] analizowali mikroorganizmy zasiedlające fyllosferę roślin uprawnych tj. cztery odmiany drzew cytrusowych, bawełnę, kukurydzę, buraki cukrowe i zieloną fasolę. W badaniach wykorzystali technikę DGGE z ogólnymi starterami do genu 16S rRNA. Badania wykazały, że struktura konsorcjum mikroorganizmów była podobna w różnych odmianach tego samego gatunku rośliny (odmiany drzew cytrusowych), a unikalna w różnych gatunkach roślin. W grupie drzew cytrusowych, podobne struktury mikroorganizmów wyróżniono w dwóch odmianach.

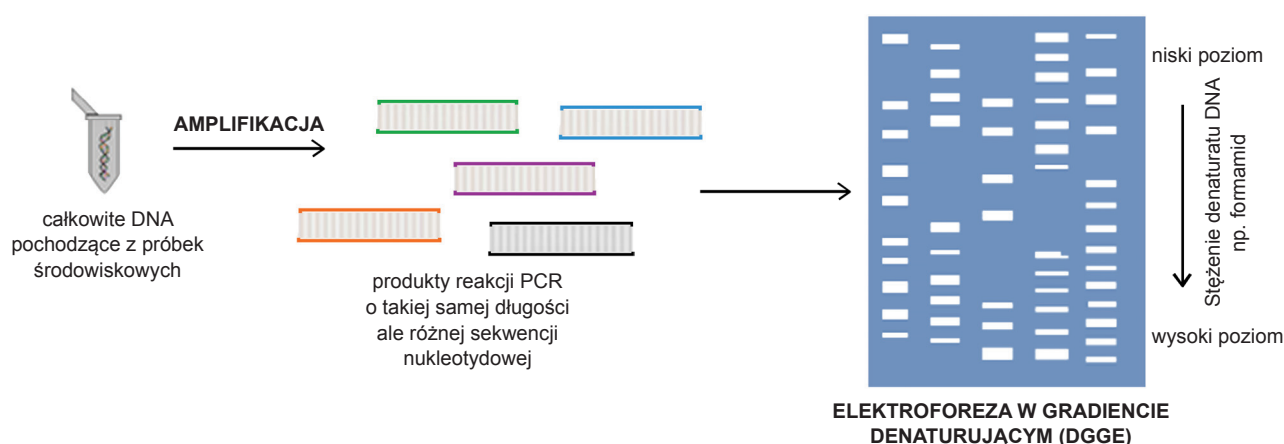
Gomes i wsp. [19] badali bakterijską różnorodność i dynamikę populacji w ryzosferze dwóch odmian kukurydzy (Nitroflint i Nitrodent) uprawianych na

glebach tropikalnych techniką elektroforezy TGGE opartej na analizie molekularnej genu 16S rRNA. Analiza DNA została wykonana z bezpośrednio pobranych próbek glebowych w trzech różnych etapach wzrostu roślin. Wyznaczono liczbę bakterii tlenowych. Wzory prążków najbardziej dominujących populacji bakterii były generowane przez technikę TGGE opartą o gen 16S rRNA powielony z całkowitego DNA przy udziale specyficznych dla eubakterii starterów. Aby zmniejszyć złożoność „odcisków palców” – „fingerprints” TGGE i analizować mniej liczne populacje, wykorzystano startery specyficzne dla różnych grup filogenetycznych ( $\alpha$ -*Proteobacteria* i  $\beta$ -*Proteobacteria* oraz *Actinomycetales*). Porównanie wzorów TGGE wskazują, że różnorodność bakteryjna analizowana w różnych fazach wzrostu roślin dla obu odmian była podobna. Porównanie profili TGGE  $\alpha$ - i  $\beta$ -*Proteobacteria* i promieniowców obu odmian potwierdziły tę obserwację. Profile TGGE odzwierciedlają silne zmiany sezonowe w populacji bakterii w ryzosferze, które mogą być również obserwowane z wzorów TGGE  $\alpha$ - i  $\beta$ -*Proteobacteria* i w mniejszym stopniu dla promieniowców. Wzory prążków z ryzosfery młodych roślin wykazywały zmniejszoną złożoność. Sekwencjonowanie dominujących populacji wykazało, że na wszystkich etapach wzrostu roślin zidentyfikowano komórki bakterii z rodzaju *Arthrobacter*.

Technikę TGGE z amplifikacją PCR fragmentu 16S rDNA zastosowano również z powodzeniem do porównania populacji bakterii znajdujących się w ryzosferze i fyllosferze transgenicznego ziemniaka z ekspresją lizozymu T4 i nietransgenicznego ziemniaka. Wzory prążków TGGE fragmentów rDNA z ryzosfery były prawie identyczne dla rośliny transgenicznej i nietransgenicznej. W przeciwieństwie do tego, profile uzyskane z próbek z fyllosfery wykazywały mniejszy stopień złożoności, ale pokazywały dużo większe różnice pomiędzy roślinami [23–24, 54].

### 3. Polimorfizm konformacji jednoniciowych fragmentów DNA, SSCP

Polimorfizm konformacji jednoniciowych fragmentów DNA, SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), jest to tzw. technika „odcisków palca” – „fingerprinting” mająca na celu rozdział elektroforetyczny fragmentów DNA o tej samej długości zgodnie z ich różnicami w ruchliwości, wywołanymi zmianami w strukturze drugorzędowej [5, 33]. Metoda ta umożliwia różnicowanie cząsteczek DNA o takiej samej długości, ale różnej sekwencji nukleotydowej [10]. Technika SSCP została opracowana w celu wykrywania znanych lub nowych polimorfizmów lub mutacji punktowych w DNA [10, 30, 35, 58]. Metoda PCR-

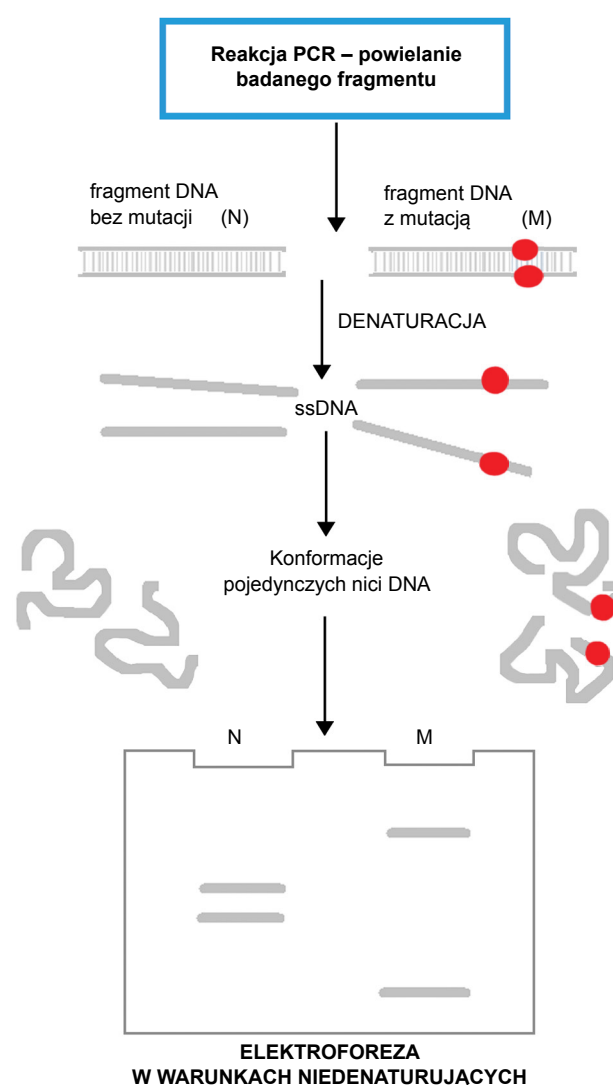


Rys. 1. Schemat techniki DGGE  
Według [55], zmodyfikowano.

-SSCP zaliczana jest w biologii molekularnej do jednej z najczęściej używanych technik przesiewowych, dzięki której można ujawnić nieznanne mutacje w określonych genach [38]. Podstawą techniki PCR-SSCP jest denaturacja fragmentów DNA, czyli produktów PCR uzyskanych z zastosowaniem specyficznych starterów dla genu 16S rRNA, które następnie szybko się ochładza, przez co otrzymujemy jednoniciowe cząsteczki DNA – ssDNA. Bezpośrednio po ochładzaniu cząsteczki rozdzielane są drogą elektroforezy poliakrylamidowej w warunkach niedenaturujących (Rys. 2) [33, 35–36].

Rozdzielanie oparte jest na subtelnych różnicach w sekwencji (dotyczy często pojedynczych par zasad), co skutkuje zmianą złożonej struktury drugorzędowej, co z kolei prowadzi do widocznej różnicy w ruchliwości w żelu podczas elektroforezy [62]. Jednoniciowe cząsteczki DNA-ssDNA o takiej samej długości rozdzielane są na żelu poliakrylamidowym na podstawie różnic spowodowanych ich złożoną strukturą drugorzędową (zmianą konformacji) [10, 30, 33, 36, 38]. Gdy fragmenty DNA są jednakowej wielkości i nie ma substancji denaturującej, to ruchliwość elektroforetyczna będzie zależna od sekwencji nukleotydowej DNA [30, 35]. Fragmenty DNA o zmienionej konformacji (strukturze drugorzędowej) charakteryzują się inną mobilnością niż fragmenty, w których nie występuje mutacja [38]. Głównym ograniczeniem techniki SSCP jest fakt, że niektóre pojedyncze nici DNA mogą występować w więcej niż jednej stabilnej konformacji. W wyniku tego, ta sama sekwencja DNA może wytwarzać wiele prążków w żelu, reprezentujących więcej niż jeden zespół mikroorganizmów [10, 35, 76]. Dodatkowym utrudnieniem tej metody jest duża szybkość reannealingu nici DNA po początkowej denaturacji w czasie elektroforezy, który można usunąć przy zastosowaniu fosforylowanego startera w czasie reakcji PCR, a następnie zastosować specyficzne trawienie fosforylowanej nici przez egzonukleazę [62]. Metoda ta

cechuje się niskim stopniem różnicowania mikroorganizmów w porównaniu do np. AFLP – (Amplified Fragment Length Polymorphism) czy PFGE – (Pulsed-Field



Rys. 2. Schemat techniki PCR-SSCP  
Na podstawie [5], zmodyfikowano.

Gel Electrophoresis). Ponadto, wielkość analizowanego produktu sięgająca tylko do 400 pz jest dodatkowym ograniczeniem tej metody [33].

Zalety techniki PCR-SSCP są podobne jak w technice DGGE/TGGE z dodatkową korzyścią, że nie wymagają zastosowania tzw. ogona GC, gradientowej budowy żeli poliakrylamidowych oraz specjalistycznej aparatury [5, 10, 30, 36, 62]. W związku z tym jest łatwiejszą techniką w porównaniu do DGGE [62]. Podobnie jak w metodzie DGGE, prążki DNA mogą być wycinane z żelu, wzmacniane i podawane sekwencjonowaniu. Jednakże, technika PCR-SSCP jest skuteczna tylko w przypadku małych fragmentów (pomiędzy 150 i 400 par zasad) [56, 62]. Technika ta charakteryzuje się również wysoką powtarzalnością w porównaniu do innych technik „odcisków palca” „fingerprinting” [33].

Smalla i wsp. [69] badali zbiorowiska bakteryjne w czterech glebach ornyc (gleba bielkowa, glina brunatna, piaszczysto ilasta i gliniasta). Analizy dokonano za pomocą technik należących do metod „odcisków palca” – „fingerprinting” – DGGE, TGGE oraz SSCP. Do badań użyto fragmenty genu 16S rRNA powielone z całkowitego DNA w czterech powtórzeniach dla każdego rodzaju gleby. Wszystkie metody doprowadziły do podobnych wniosków: (a) grupy „odcisków palca”, korelują z właściwościami fizyko-chemicznymi gleb, (b) występuje mała zmienność pomiędzy czterema powtórzeniami tej samej gleby, (c) wzory prążków bielkowych i gleb brunatnych są bardziej podobne do siebie, niż do pozostałych dwóch gleb, oraz (d) „odciski palców” różnych typów gleby, ujawniły istotne różnice w teście permutacji.

Badania Gasser i wsp. [17], potwierdzają hipotezę, że ryzosfera jest ciekawym rezerwuarem bakterii, które są producentami polihydroksyalkanianu. Niewiele wiadomo na temat ekologii bakterii produkujących polihydroksyalkanian. Aby uzyskać przegląd występowania i różnorodności bakterii produkujących polihydroksyalkanian występujących w mikrośrodkach roślinnych wyizolowano całkowite DNA mikroorganizmów pochodzące z różnych gatunków roślin (rzepak, rdest, oliwka, burak cukrowy, truskawka i winorośl) oraz od różnych mikrośrodków (fyllosfera, karposfera, ryzosfera i endosfera) i analizowano pod kątem występowania genów *phaC*. Do analizy występowania tej specyficznej grupy mikroorganizmów zastosowano technikę PCR-SSCP ze starterami specyficznymi dla genów kodujących *phaC*, kluczowego enzymu w syntezie polihydroksyalkanianu. Ponadto, analizy zostały potwierdzone poprzez ilościową reakcję PCR (qPCR – quantitative PCR). Wyniki pokazują, że występuje wysoki stopień specyficzności szczepów wobec roślin. Brak pozytywnych wyników dla mikrośrodków nadziemnych (fyllosfera i karposfera), natomiast w próbkach pochodzących z endo- i ryzosfery wykazano występowanie *phaC*.

Ryzosfera buraka cukrowego zawierała najwyższą liczbę szczepów z wynikiem pozytywnym. Poza tym, wykryto nowe gatunki bakterii wytwarzające polihydroksyalkanian, na przykład *Burkholderia terricola*, *Lysobacter gummosus*, *Pseudomonas extremaustralis*, *Pseudomonas brassicacearum* i *Pseudomonas orientalis*.

#### 4. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym, Real-time PCR

Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym oparta jest na metodzie PCR opracowanej przez Kary'ego Mullis'a w 1980, która pozwala naukowcom na zamplikowanie określonych fragmentów DNA ponad miliard razy [51–52, 78]. Metody oparte na technice PCR są bodźcem napędzającym biologię molekularną i ułatwiają badaczom manipulowanie DNA. PCR w czasie rzeczywistym stanowi kolejny skok technologiczny w biologii molekularnej, który stwarza nowe możliwości dla naukowców na całym świecie. Real-time PCR jest połączeniem ogromnej czułości reakcji PCR z dokładnością zapewnioną przez monitorowanie produktów PCR w czasie rzeczywistym [78]. W tradycyjnej technice PCR uzyskane produkty analizuje się w fazie stacjonarnej (fazie *plateau*) czyli po zakończeniu reakcji PCR. Na tym etapie reakcji ilości produktów PCR są zbliżone, mimo, że powstały w wyniku powielenia matryc, których wyjściowe stężenia były zróżnicowane. W fazie stacjonarnej brak proporcjonalnej zależności między stężeniem produktu reakcji PCR, a ilością kopii amplifikowanej sekwencji matrycowej. W związku z tym ten etap nie daje możliwości dokładnego wyznaczenia wyjściowej ilości sekwencji matrycowej. Wykorzystanie metody PCR do analiz ilościowych wymaga zastosowania takiego etapu reakcji, w którym zostanie utrzymana liniowa zależność między ilością kopii amplifikowanej sekwencji DNA, a wyznaczonymi parametrami kinetycznymi reakcji PCR. Określenie tych parametrów wymaga użycia technik umożliwiających dokładne śledzenie przebiegu reakcji PCR [43, 70]. PCR w czasie rzeczywistym rozwiązuje ten problem przez wykorzystanie faktu, że wydajna amplifikacja DNA występuje na wczesnym etapie procesu reakcji i w związku z tym pomiar otrzymanego produktu następuje w fazie wykładniczej [78].

Na początku lat dziewięćdziesiątych ubiegłego stulecia Higuchi i wsp. [26] w Roche Molecular Systems i Chiron po raz pierwszy zademonstrowali reakcje PCR w czasie rzeczywistym. Do mieszaniny reakcyjnej PCR dodano typowy barwnik fluorescencyjny o nazwie bromek etydyny (EtBr), który interkaluje do dwuniciowego DNA. Fluorescencja bromku etydyny zwiększa się w wyniku związania go z kwasami nukleinowymi. Reakcja prowadzona była w świetle ultrafioletowym

(UV), które powoduje fluorescencję EtBr, a za pomocą kamery wideo sprzężonej z komputerem prowadzona była wizualizacja gromadzącego się DNA [49, 70, 78]. Pod wpływem światła UV bromek etydyny wbudowany w dwuniciowe DNA fluoryzuje, a intensywność świecenia w kolejnych cyklach reakcji wzrasta wraz ze stężeniem amplikonu [43, 70]. W związku z tym możliwe było monitorowanie zmian stężenia produktu w mieszaninie reakcyjnej PCR podczas trwania reakcji [6, 78]. Następnie, technologia ta szybko stała się konkurencyjna w stosunku do innych metod i powszechnie stosowana [78]. PCR w czasie rzeczywistym odnosi się po prostu do amplifikacji DNA (PCR), która jest monitorowana. Pozwala ona badaczowi lepiej określić ilość wyjściowego DNA w próbce przed amplifikacją metodą PCR [78]. PCR w czasie rzeczywistym jest metodą „zbierania danych” w trakcie procesu PCR, łącząc w ten sposób amplifikację i detekcję w jednym kroku [85]. W reakcji real-time PCR dwuniciowe sekwencje DNA amplifikowane są gwałtownie, gdy wszystkie składniki mieszaniny reakcyjnej są świeże i dostępne.

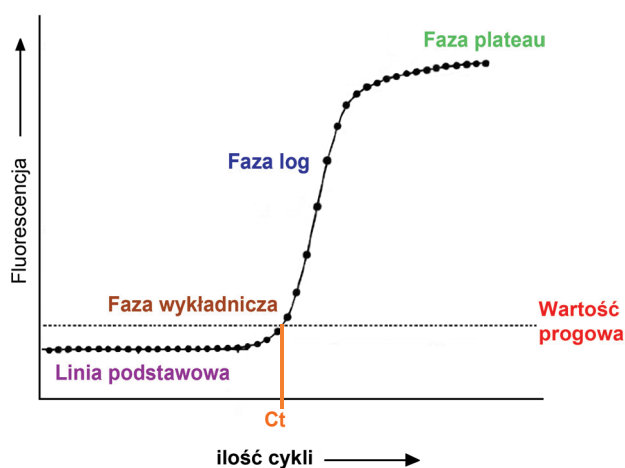
Krzywa kinetyczna reakcji rozpoczyna się od linii podstawowej, a następnie przechodzi do fazy wykładniczej amplifikacji, a następnie przez liniową fazę (zwaną także fazą *log*) i ostatecznie kończy się fazą *plateau* [61, 75, 84–85]. Podczas liniowej fazy (zwykle pierwszych 10–15 cykli) reakcja PCR dopiero się zaczyna, a emisja fluorescencji jest niska. W tym czasie wyznaczana jest tzw. fluorescencja tła (background). We wczesnej fazie wykładniczej intensywność fluorescencji rośnie, ponieważ zwiększa się ilość powstających produktów [43, 70, 85]. Fluorescencja osiąga wartość progową ( $F_t$ , fluorescence threshold) tzn. jest ona znacznie większa niż poziom tła, zwykle  $10 \times$  odchylenie standardowe (SD) od linii podstawowej (wielokrotność odchylenia standardowego tła) [74, 77]. Cykl, w którym to następuje znany jest w literaturze jako  $C_t$  – cykl progowy ( $C_t$ , threshold cycle) lub  $C_p$  – punkt graniczny, ( $C_p$ , crossing point). Wartość progowa jest reprezentatywna dla wyjściowej liczby kopii w oryginalnej matrycy i jest używana do obliczania wyników doświadczalnych. Im więcej kopii amplifikowanych sekwencji DNA znajduje się na początku reakcji, tym mniej cykli potrzeba, żeby intensywność fluorescencji przekroczyła poziom tła [21, 70, 77, 85]. Podczas fazy *log*-liniowej, PCR osiąga optymalną amplifikację w idealnych warunkach reakcji. Natomiast w etapie *plateau*, następuje ograniczenie składników reakcji, a intensywność fluorescencji spada (Rys. 3) [4, 85].

Bezwzględne oznaczenie ilościowe wymaga zastosowania seryjnych rozcieńczeń standardów o znanych stężeniach, w celu wygenerowania krzywej wzorcowej. Krzywą standardową tworzy liniowa zależność pomiędzy  $C_t$  i początkowa ilość całkowitego cDNA, co pozwala na określenie stężenia niewiadomych prób na

podstawie ich wartości  $C_t$  [21, 85]. Metoda ta zakłada, że wszystkie standardy i próbki mają w przybliżeniu równą efektywność amplifikacji [85]. Ponadto, stężenia rozcieńczeń standardów powinny obejmować poziomy zakresów łatwych do wyliczenia i wykrywalnych w specyficznym urządzeniu do real-time PCR [85].

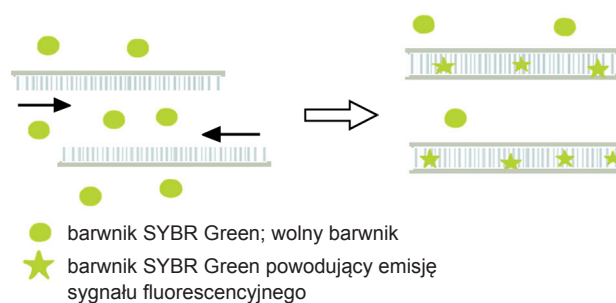
Kluczem w reakcji Real-time PCR jest zdolność do monitorowania przebiegu amplifikacji w czasie rzeczywistym. Jest to realizowane dzięki szczególnej chemicznej detekcji [78]. Ogólnie, chemiczne detektory dzielimy na specyficzne i niespecyficzne [68]. Zastosowanie niespecyficznych cząsteczek fluorescencyjnych jest stosunkowo prostą techniką. Opiera się ona na wiązaniu barwników, np. SYBR Green czy wspomniany bromek etydyny, które interkalują pomiędzy dwie sąsiadujące pary zasad w cząsteczce podwójnej nici DNA, zniekształcając strukturę podwójnej helisy [47, 65]. Barwnik związany z DNA powoduje emisję sygnału fluorescencyjnego, natomiast barwnik znajdujący się w roztworze (to znaczy, że barwnik nie jest związany z DNA; wolny barwnik), charakteryzuje się niską fluorescencją [68, 71]. SYBR Green fluoryzuje 50 razy jaśniej niż bromek etydyny, gdy jest związany z podwójną nicią DNA. W miarę postępu reakcji PCR, następuje zwiększenie ilości SYBR Green, który wiążąc się do dwuniciowego amplikonu, daje wzrost fluorescencji, która z kolei jest proporcjonalna do stężenia produktu (Rys. 4) [49, 71].

Wzrost sygnału fluorescencyjnego jest spowodowany przez wszystkie powielone produkty DNA powstałe podczas reakcji, które niekoniecznie są specyficzne dla pożądanego produktu. Przy użyciu tej metody, startery muszą być starannie dobrane, a reakcja PCR zoptymalizowana tak, aby uniknąć tworzenia produktów nieswoistych np. dimery starterów [68, 70–71]. Spośród dostępnych chemicznych metod detekcji w reakcji PCR w czasie rzeczywistym, zastosowanie barwników interkalujących jest najmniej kosztowne, nie wymaga syntezy specyficznych sond docelowych, i może być wykorzystywany z każdą parą starterów do mierzenia dowolnego genu. Tak więc, jest on szczególnie użyteczny w opracowywaniu analizy Real-time PCR, gdy znane są startery potrzebne do wytworzenia pojedynczego produktu z wysoką wydajnością (pośród dostępnych do wykrywania chemicznych PCR w czasie rzeczywistym, jest to najmniej kosztowne, a nie wymaga syntezy sondy i może być używany z dowolną parą starterów. Tak więc, jest on szczególnie użyteczny w opracowywaniu testu ilościowego w czasie rzeczywistym, gdy startery są już dostępne, które są znane do wytworzenia pojedynczego produktu z wysoką wydajnością [69, 71–72]. Innymi opisanymi specyficznymi barwnikami wiążącymi się do dsDNA są np. BEBO, YOYO-1, TOTO-1, itd. jednak nie są szeroko stosowane [78].



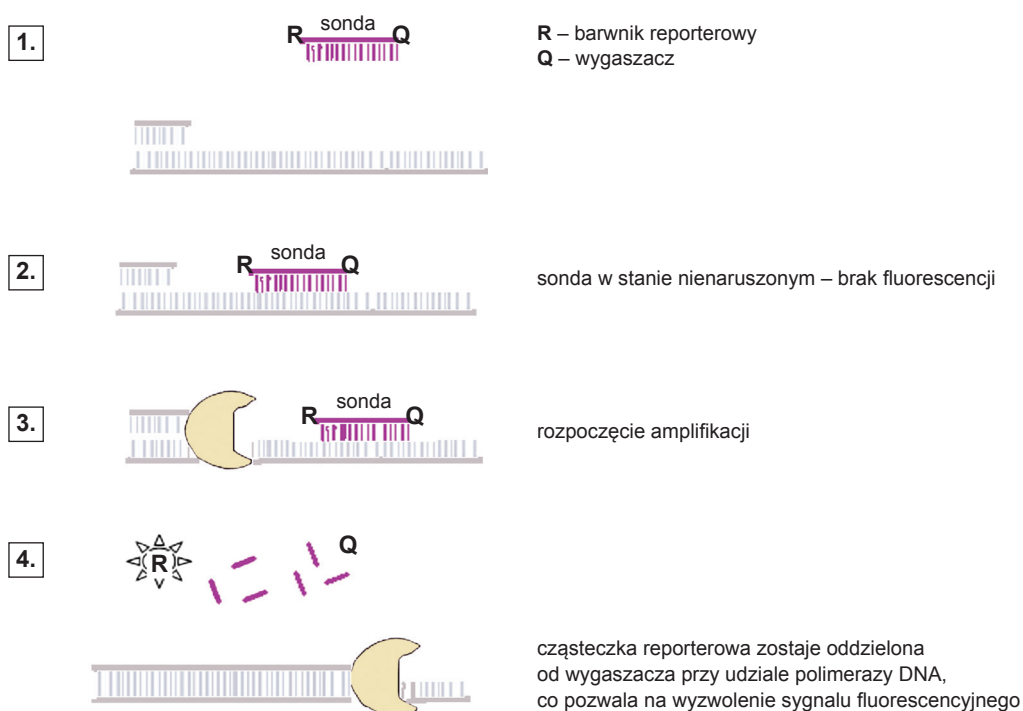
Rys. 3. Wykres fluorescencji w zależności od cyklu Real-time PCR. Przedstawiono fazy reakcji na podstawie [80–81], zmodyfikowano.

W celu zapewnienia, zwiększenia sygnału fluorescencyjnego, zwiększenia czułości i specyficzności monitorowania przebiegu amplifikacji w czasie rzeczywistym można zastosować hybryzację fluorescencyjnych sond oligonukleotydowych. Ustanowienie tego rodzaju analizy będzie bardziej czasochłonne i pracochłonne, ale dla przeprowadzanych badań będzie to miało pozytywny wpływ [68]. Jedną z najczęściej stosowanych strategii jest zastosowanie sond molekularnych np. typu TaqMan [68]. Pod względem struktury sondy to jednoniciowe oligonukleotydy, które są podwójnie znakowane. Sonda na końcu 5' jest reporterem fluorescencyjnym (barwnik fluorescencyjny), natomiast koniec



Rys. 4. Schemat przedstawiający emisję sygnału fluorescencyjnego po związaniu się barwnika SYBR Green do dwuniciowego DNA. Na podstawie [66], zmodyfikowano.

3' zawiera przyłączony wygaszacz [43, 68, 70, 78]. Jeśli sonda jest w stanie niezhybrydowanym, wygaszacz i reporter są blisko siebie tzn., że są przyłączone do tego samego krótkiego oligonukleotydu to wygaszacz absorbuje fluorescencję reportera i nie zostanie wykryty żaden sygnał [70, 78]. Jest to przykład fluorescencyjnego transferu energii rezonansowej (zwane również jako transfer Förster), w którym energia przekazywana jest od „dawcy” – reporter do „biorcy” – wygaszacz [43, 70]. Podczas amplifikacji sonda oligonukleotydowa jest degradowana przez polimerazę DNA mającą aktywność 5'-egzonukleazową, przez co cząsteczka reporterowa jest oddzielona od wygaszacza co pozwala na wyzwolenie sygnału fluorescencyjnego [68, 78]. Przykładowymi fluorochromami wygaszającymi są TAMRA, DABCYL i BHQ, natomiast wśród barwników reporterowych można wyróżnić FAM, VIC, NED, TET itd. (Rys. 5) [78].



Rys. 5. Schemat przedstawiający analizę molekularną Real-time PCR z wykorzystaniem sondy typu TaqMan. Według [66, 70, 84] zmodyfikowano.

Bakteryjne wędnięcie lucerny (*Medicago sativa*), spowodowane przez *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* (Cmi) jest ważną chorobą lucerny występującą na całym świecie. Patogen ten pochodzi z Ameryki Północnej, a teraz pojawia się także w wielu innych krajach, Ameryki Południowej, Azji, Afryki i Oceanii [46]. Diagnoza zakażenia Cmi jest trudna, często bywa oceniana na podstawie objawów bakteryjnego wędnięcia, jednak może być mylona z innymi chorobami [46] lub uszkodzeniami spowodowanymi herbicydami. Dlatego ważne było zastosowanie szybkiej metody diagnostycznej potwierdzającej obecność patogenu. Dotychczas stosowane metody wykrywania i identyfikacji tego patogenu polegały na klasycznych badaniach bakteriologicznych [46] lub badaniach serologicznych [31]. Celem badań Marfeat i wsp. [46] była ocena próby identyfikacji Cmi metodą PCR oraz opracowanie testu real-time PCR do wykrywania i ilościowego oznaczania Cmi w DNA ekstraktach z roślin. Prowadzone analizy opierały się na międzygenowym regionie ITS (Internal Transcribed Spacer) występującym pomiędzy genami 16S i 23S rRNA. Badaniom poddano DNA pochodzące z zakażonych i niezakażonych roślin lucerny. Wyniki wskazują, że technika PCR w czasie rzeczywistym jest obecnie rutynowo stosowana do monitorowania bakteryjnego wędnięcia roślin lucerny oraz w celu potwierdzenia występowania tożsamości kultur Cmi. Jest to przydatne narzędzie badawcze w badaniach epidemiologicznych patogenów, przyczyniające się do lepszego kontrolowania choroby.

Saragih i wsp. [67] użyli ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym (qPCR) – jako narzędzia do wykrywania i identyfikacji *Cordyceps militaris* w glebie. *Cordyceps militaris* jest grzybem entomopatogenym, który atakuje larwy i poczwarki motyli w różnych środowiskach np. w ściółce liści lub górnych warstwach gleby. Spośród ośmiu par starterów, para starterów CM2946F i CM3160R, temperatura wydłużania wynosząca 65°C oraz liczba cykli równa 60 to najlepsze połączenie starterów i warunków, gdyż tylko takie połączenie wykazało specyficzność objawiającą się z pojedynczym pikiem krzywej topnienia w qPCR. W wyniku reakcji otrzymano jeden produkt o wielkości 167 par zasad i przy zastosowaniu programu BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool) określono podobieństwo sekwencji, wskazując na 99% stopień pokrewieństwa genomowego z *C. militaris*. Sposób ten wydaje się skuteczny w wykrywaniu *C. militaris* w glebie i użyteczny do szybkiego i niezawodnego ilościowego oznaczania tej bakterii w różnych ekosystemach.

W glebie występuje kosmopolityczny grzyb, *Thielaviopsis basicola*, który powoduje choroby w wielu uprawach rolnych np. w Chinach jest czynnikiem sprawczym czarnej zgnilizny na roślinach tytoniu. Wczesna diagnoza i wykrycie patogena w glebie są

niezbędne do kontrolowania tej choroby w warunkach polowych. Celem badań Huang i Kang [27] było opracowanie skutecznych i czułych metod, nadających się do wykrywania na dużą skalę *T. basicola*. W celu szybkiego i specyficznego wykrywania i oznaczania *T. basicola* zastosowano analizę real-time PCR. W oparciu o sekwencje nukleotydowe fragmentu ITS *Thielaviopsis spp.*, zaprojektowano startery i sondy typu TaqMan. Łącząc test QPCR z wydajnym protokołem izolacji DNA można osiągnąć wysoki poziom detekcji. Taka analiza pozwala na wykrycie *T. basicola* w glebie w ciągu 4–5 godzin, a zanotowana granica wykrywalności wynosi 3 zarodniki na reakcję qPCR.

W ważnych ekonomicznie uprawach występuje *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. Bakteria ta jest endofitycznym diazotrofej, który promuje wzrost i rozwój roślin. Biorąc pod uwagę, że obecnie konieczne jest opracowanie szybkich metod monitorowania interakcji roślina-bakteria, celem badań Pereira i wsp. [60] było opracowanie metody PCR w czasie rzeczywistym do ilościowego oznaczania PGPB *H. seropedicae* w ryzosferze siewek kukurydzy. W tym celu zostały zaprojektowane odpowiednie pary starterów a ich specyficzność została zweryfikowana poprzez zastosowanie materiału genetycznego DNA pochodzącego z 12 różnych gatunków bakterii. Test za pomocą qPCR ze starterami HERBAS1 i HERBAS2 zastosowano do wykrywania i ilościowego oznaczenia szczepu *H. seropedicae* SmR1 w zaszczepionych korzeniach kukurydzy hodowanej *in vitro* w doniczkach. Materiał do badań zbierany był 1, 4, 7 i 10 dni po zaszczepieniu. Szacunkowa liczba kopii DNA bakterii na gram korzeni w przypadku roślin uprawianych w warunkach *in vitro* wynosiła około 10<sup>6</sup>. Test z użyciem starterów HERBAS1 i HERBAS2 może być użyteczny do monitorowania interakcji roślina – bakterii *H. seropedicae* SmR1.

## 5. Podsumowanie

Najbogatszym rezerwuarem mikroorganizmów jest środowisko naturalne ze szczególnym uwzględnieniem ekosystemu glebowego i roślinnego. Gleba i rośliny to wysoce złożone i bogate pod względem liczebności i różnorodności mikroorganizmów środowiska. Mikroorganizmy zasiedlające glebę odgrywają kluczową rolę w prawidłowym przebiegu większości procesów zachodzących w glebie. Różnorodność i struktura zbiorowisk mikroorganizmów glebowych mają szczególne znaczenie dla funkcjonowania gleb. Mikroorganizmy zasiedlające powierzchniowe lub wewnętrzne tkanki roślin często pozytywnie wpływają na ich rozwój, przykładem może być wiązanie azotu atmosferycznego, poprawa nabycia składników odżywczych, ograniczenie infekcji patogenów roślinnych. Niewątpliwie

ważnym aspektem badań mikrobiologicznych jest dobór i opracowanie wskaźników do oceny i kształtowania bioróżnorodności mikrobiologicznej środowiska glebowego i roślinnego. Obecnie analiza różnorodności biologicznej mikroorganizmów zasiedlających dane środowiska głównie opiera się na badaniach z zakresu biologii molekularnej. Są to metody szybkie, czułe i powtarzalne. Warto wspomnieć, że dają one możliwość bezpośredniej oceny mikroorganizmów bez konieczności ich hodowli. Techniki DGGE/TGEE, SSCP i Real Time PCR są jednymi najczęściej wykorzystywanych metod genetycznych wykorzystywanych do oceny bioróżnorodności.

Publikacja została opracowana w ramach realizacji zadania 1.4 Programu Wieloletniego IUNG-PIB na lata 2016–2020.

## Piśmiennictwo

- Adhitya A., Thomas F.I.M., Ward B.B.: Diversity of assimilatory nitrate reductase genes from plankton and epiphytes associated with a seagrass bed. *Microbial Ecol.* **54**, 587–597 (2007).
- Andreote F.D., Azevedo J.L., Araújo W.A.: Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. *Braz. J. Microbiol.* **40**, 417–432 (2009)
- Brons J.K., van Elsas J.D.: Analysis of Bacterial Communities in Soil by Use of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Clone Libraries, as Influenced by Different Reverse Primers. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 2717–2727 (2008)
- Bustin S.A.: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* **25**, 169–193 (2000)
- Cetecioglu Z., Ince O., Ince B.: Gel Electrophoresis Based Genetic Fingerprinting Techniques on Environmental Ecology (w) Gel electrophoresis – advanced techniques, red. S. Magdeldin, Rijeka, Croatia, 2012, s. 51–66
- Cleary T.J., Roudel G., Casillas O., Miller N.: Rapid and specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* by using the Smart Cycler instrument and a specific fluorogenic probe. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4783–4786 (2003)
- Da Silva K.R.A., Salles J.F., Seldin L., van Elsas J.D.: Application of a novel *Paenibacillus*-specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus* spp. in the maize rhizosphere. *J. Microbiol. Meth.* **54**, 213–231 (2003)
- Dorigo U., Volatier L., Humbert J.F.: Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Res.* **39**, 2207–2218 (2005)
- Duelli P., Obrist M.K.: Biodiversity indicators: the choice of values and measures. *Agriculture, Ecosystems & Environment.* **98**, 87–98 (2003)
- Fakruddin M., Mannan K.S.B.: Methods for Analyzing Diversity of Microbial Communities in Natural Environments. *Ceylon J. Sci. (Biol. Sci.)* **42**, 19–33 (2013)
- Fischer S.G., Lerman L.S.: DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1579–1583 (1983)
- Fischer S.G., Lerman L.S.: Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell*, **16**, 191–200 (1979)
- Fjellbirkeland A., Torsvik V., Ovreas L.: Methanotrophic diversity in an agricultural soil as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis profiles of *pmoA*, *mxhF* and 16S rDNA sequences. *Anton. Leeuw. Int. J.G.* **79**, 209–217 (2001)
- Gałązka A., Gałązka R.: Phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils artificially polluted using plant-associated-endophytic bacteria and *Dactylis glomerata* as the bioremediation plant. *Pol. J. Microbiol.* **64**, 239–250 (2015)
- Gałązka A., Król M., Perzyński A.: The Efficiency of Rhizosphere Bioremediation with *Azospirillum* sp. and *Pseudomonas stutzeri* in Soils Freshly Contaminated with PAHs and Diesel Fuel. *Pol. J. Environ. Stud.* **21**, 345–353 (2012)
- Garbeva P., van Veen J.A.; van Elsa, J.D.: Assessment of the diversity, and antagonism towards *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes. *FEMS Microbiol. Ecol.* **47**, 51–64 (2004)
- Gasser I., Muller H., Berg G.: Ecology and characterization of polyhydroxyalkanoate-producing microorganisms on and in plant. *FEMS Microbiol. Ecol.* **70**, 142–150 (2009)
- Głowaciński Z. Różnorodność gatunkowa – jej interpretacja i obliczanie. W: Różnorodność biologiczna: pojęcia, oceny, zagadnienia ochrony i kształtowania, *Zeszyty Naukowe Komitetu „Człowiek i Środowisko”*, **15**, 57–70 (1996)
- Gomes N. C. M., Heuer H., Schönfeld J., Costa R., Mendonça-Hagler L., Smalla K.: Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant Soil.* **232**, 167–180 (2001)
- Harper J.L., Hawksworth D.L.: Biodiversity: measurement and estimation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **345**, 5–12 (1994)
- Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M.: Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **6**, 986–994 (1996)
- Henckel T., Friedrich M., Conrad R.: Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1980–1990 (1999)
- Heuer H., Krsek M., Baker P., Smalla K., Wellington E.M.H.: Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3233–3241 (1997)
- Heuer H., Smalla K.: Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities (w) *Modern Soil Microbiology*, red. J.D. van Elsas, J.T. Trevors, E.M.H. Wellington, Marcel Dekker, New York. 1997, s. 353–373
- Heuer H., Krsek M., Baker P., Smalla K., Wellington E.M.H.: Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3233–3241 (1997)
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R.: Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, **11**, 1026–1030 (1993)
- Huang J., Kang Z.: Detection of *Thielaviopsis basicola* in soil with real-time quantitative PCR assays. *Microbiol. Res.* **165**, 411–417 (2010)
- Ji S.C., Kim D., Yoon J.H., Lee C.H.: Metagenomic Analysis of BTEX-Contaminated Forest Soil Microcosm. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 668–672 (2007)
- Kembel S.W., O'Connor T.K., Arnold H.K., Hubbell S.P., Wright S.J., Green J.L.: Relationships between phyllosphere bacterial communities and plant functional traits in a neotropical forest. *PANS*, **111**, 13715–13720 (2014)



30. Kirk J.L., Beaudette L.A., Hart M., Moutoglou P., Klironomos J.N., Lee H., Trevors J.T.: Methods of studying soil microbial diversity. *J. Microbiol. Meth.* **58**, 169–188 (2004)
31. Kokoskova B., Pankova I., Krejzar V.: Characteristics of polyclonal antisera for detection and determination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*. *Plant Protect. Sci.* **36**, 46–52 (2000)
32. Krajowa strategia ochrony i zrównoważonego użytkowania różnorodności biologicznej wraz z Programem działań na lata 2007–2013. Załącznik do uchwały nr 270/2007 Rady Ministrów z dnia 26.10.2007
33. Krawczyk B.: Diagnostyka molekularna w zakażeniach szpitalnych. *Postę. Mikrobiol.* **46**, 367–378 (2007)
34. Kucharska K., Wachowska U.: Mikrobiom roślin uprawnych. *Post. Mikrobiol.* **53**, 4: 352–359 (2014)
35. Kumar R., Joshi S.R.: Microbial Ecology of Soil: Studying the diversity of microorganisms in the most complex of the environments – A review. *Adv. Appl. Microbiol.* **19**, 267–279 (2015)
36. Lee D.H., Zo Y.G., Kim S.J.: Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR single strand conformation polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3112–3120 (1996)
37. Leys N.M.E., Ryngaert A., Bastiaens L., Verstraete W., Top E.M., Springael D.: Occurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1944–1955 (2004)
38. Libczyńska A., Woźniak A., Wawrocka A., Krawczyński M.R.: Techniki wykorzystywane w diagnostyce molekularnej chorób jednogenowych. *Nowiny Lekarskie*, **75**, 486–490 (2006)
39. Łyszcz M., Gałązka A.: Metody oparte o amplifikację DNA techniką PCR wykorzystywane w ocenie bioróżnorodności mikroorganizmów glebowych. *Kosmos, Varia*; no **2**, 2017 (w druku)
40. Łyszcz M., Gałązka A.: Wybrane metody molekularne wykorzystywane w ocenie bioróżnorodności mikroorganizmów glebowych. *Post. Mikrobiol.* **55**, 309–319 (2016)
41. Maarit-Niemi R., Heiskanen I., Wallenius K., Lindstrom K.: Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *J. Microbiol. Meth.* **45**, 155–165 (2001)
42. Maarit-Niemi R., Heiskanen I., Wallenius K., Lindstrom K.: Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *J. Microbiol. Meth.* **45**, 155–165 (2001)
43. Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A.: Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* **15**, 1292–1305 (2002)
44. MacNaughton S.J., Stephen J.R., Venosa A.D., Davis G.A., Chang Y.J., White D.C.: Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3566–3574 (1999)
45. Malik S., Beer M., Megharaj M., Naidu R.: The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environ. Int.* **34**, 265–276 (2008)
46. Marefat A., Ophel-Keller K., McKay A.: A real-time PCR assay for detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* in Lucerne. *Australas. Plant. Path.* **36**, 262–269 (2007)
47. Miller K.M., Ming T.J., Schulze A.D., Withler R.E.: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE): a rapid and sensitive technique to screen nucleotide sequence variation in populations. *BioTechniques*, **27**, 1016–1030 (1999)
48. Milling A., Smalla K., Maidl F.X., Schloter M., Munch J.C.: Effects of transgenic potatoes with an altered starch composition on the diversity of soil and rhizosphere bacteria and fungi. *Plant Soil*, **266**, 23–39 (2004)
49. Morrison T.B., Weis J.J., Wittwer C.T.: Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification, *Biotechniques*, **24**, 954–958 (1998)
50. Mühling M., Woolven-Allen J., Murrell J.C., Joint I.: Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *ISME J.* **2**, 379–392 (2008)
51. Mullis K.B., Faloona F.A.: Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods. Enzymol.* **155**, 335–350 (1987)
52. Mullis K.B.: The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am.* **262**, 56–61, (1990)
53. Muyzer G., Brinkhoff T., Nubel U., Santegoeds C., Schafer H., Wawer C.: Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology (w) *Molecular Microbial Ecology Manual*, red. A. Kowalchuk, F.J. de Bruijn., A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, 2004, s. 743–769
54. Muyzer G., Smalla K.: Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Anton. Leeuw.* **73**, 127–141 (1998)
55. Muyzer G., Waal E.C.D., Uitterlinden A.G.: Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **5**, 695–700 (1993)
56. Muyzer, G.: DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 317–322 (1999)
57. Nakatsu C.H.: Soil Microbial Community Analysis Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Soil Sci. Soc. Am.* **71**, 562–571 (2007)
58. Orita M., Suzuki Y., Sekiya T., Hayashi K.: A rapid and sensitive detection of point mutations and genetic polymorphisms using polymerase chain reaction. *Genomics.* **5**, 874–879 (1989)
59. Peixoto R.S., Coutinho H.L.D., Rumjanek N.G., Macrae A., Rosado A.S.: Use of *rpoB* and 16S rRNA genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. *Lett. Appl. Microbiol.* **35**, 316–320 (2002)
60. Pereira T.P., Do Amaral F.P., Dall'Asta P., Brod F.C.A., Aris A.C.M.: Real-time PCR quantification of the plant growth promoting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 in maize roots. *Mol. Biotechnol.* **56**, 660–670 (2014)
61. Rao X., Lai D., Huang X.: A New Method for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Data Analysis. *J. Comput. Biol.* **20**, 703–711 (2013)
62. Rastogi G., Sani R.K.: Molecular Techniques to Assess Microbial Community Structure, Function, and Dynamics in the Environment (w) *Microbes and Microbial Technology Agricultural and Environmental Applications*, red. I. Ahmad, F. Ahmad, J. Pichtel, Springer Science+Business, New York Dordrecht Heidelberg London. 2011, s. 29–57
63. Rincon-Florez V.A., Carvalhais L.C., Schenk P.M.: Culture-Independent Molecular Tools for Soil and Rhizosphere Microbiology. *Diversity*, **5**, 581–612 (2013)
64. Rosado A.S., Duarte G.F., Seldin L., Van Elsa J.D.: Genetic diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2770–2779 (1998)
65. Rosenbaum V., Riesner D.: Temperature-gradient gel electrophoresis. Thermodynamic analysis of nucleic acids and proteins in purified form and in cellular extracts. *Biophys. Chemist.* **26**, 235–246 (1987)
66. Salles J.F., De Souza F.A., van Elsas J.D.: Molecular method to assess the diversity of *Burkholderia* species in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1595–1603 (2002)
67. Saragih S.A., Takemoto S., Hisamoto Y., Fujii M., Sato H., Kamata N.: Quantitative real-time PCR (qPCR) – Based tool for detection and quantification of *Cordyceps militaris* in soil. *J. Invertebr. Pathol.* **124**, 70–72 (2015)

68. Sluijter J.P.G., Pasterkamp G., de Kleijn D.P.V.: Quantitative Real-Time PCR (w) Cardiovascular Research New Technologies, Methods, and Applications, red. G. Pasterkamp, D. de Kleijn, Springer, New York, 2005, 75–83
69. Smalla K., Oros-Sichler M., Milling A., Heuer H., Baumgarte S., Becker R., Neuber G., Kropf S., Ulrich A., Tebbe C.C.: Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: do the different methods provide similar results. *J. Microbiol. Methods*. **69**, 470–479 (2007).
70. Studzińska A., Tyburski J., Daca P., Tretyn A.: PCR w czasie rzeczywistym. Istota metody i strategie monitorowania przebiegu reakcji. *Biotechnologia*. **1**, 71–85 (2008)
71. Sugden D., de Winter P.: Quantification of mRNA Using Real Time RT-PCR (w) Molecular Biomethods Handbook, red. J.M. Walker, R. Rapley, Humana Press, Totowa, NJ, 2008, s. 149–168
72. Sugden D.: Quantitative PCR (w) Medical BioMethods Handbook, red. J.M. Walker, R. Ralph, Humana Press, New York, 2005, s. 327–345
73. Theron J., Cloete T.E.: Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Crc. Cr. Rev. Microbiol.* **26**, 37–57, (2000)
74. Tichopad A., Didier A., Pfaffl M.W.: Inhibition of real-time RT-PCR quantification due to tissue-specific contaminants. *Mol. Cell. Probes*. **18**, 45–50 (2004)
75. Tichopad A., Dilger M., Schwarz G., Pfaffl M.W.: Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res.* **3**, 1–6 (2003)
76. Tiedje J.M., Asuming-Brempong S., Nusslein K., Marsh T.L., Flynn S.J.: Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl. Soil. Ecol.* **13**, 109–122 (1999)
77. Tyburski J., Studzińska A., Daca P., Tretyn A.: PCR w czasie rzeczywistym. Metody analizy danych. *Biotechnologia*, **1**, 86–96 (2008)
78. Valasek M.A., Repa J.R.: The power of real-time PCR. *Adv. Physiol. Educ.* **29**, 151–159 (2005)
79. Valášková V., Baldrian P.: Denaturing gradient gel electrophoresis as a fingerprinting method for the analysis of soil microbial communities. *Plant. Soil. Environ.* **55**, 10, 413–423 (2009)
80. Vallaeys T., Topp E., Muyzer G., Macheret V., Laguerre G., Soulas G.: Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbiol. Ecol.* **24**, 279–285 (1997)
81. VanGuilder H.D., Vrana K.E., Freeman W.M.: Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques*. **44**, 619–626 (2008)
82. Vendan R.T., Lee S.H., Yu Y.J., Rhee Y.H.: Analysis of Bacterial Community in the Ginseng Soil Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). *Indian J. Microbiol.* **52**, 286–288 (2012)
83. Widmer F., Seidler R.J., Gillevet P.M., Watrud L.S., Di Giovanni G.D.: A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2545–255 (1998)
84. Wilhelm J., Pingoud A.: Real-time polymerase chain reaction. *Chem. Biochem.* **4**, 1120–1128 (2003)
85. Wong M.L., Medrano J.F.: Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*. **39**, 75–85 (2005)
86. Yang C.H., Crowley D.E., Borneman J., Kee N.T.: Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 3889–3894 (2001)
87. Ziemińska-Buczyńska A., Cema G., Kalbarczyk M., Żabczyński S.: Wykorzystanie metody PCR-DGGE do badania zmienności genotypowej bakterii zasiedlających złoża tarczowe oczyszczające modelowe ścieki koksownicze. *Ochr. Śr.* **36**, 3–8 (2014)

## METODY GENOTYPOWE I FENOTYPOWE WYKORZYSTYWANE W TYPOWANIU DROBNOUSTROJÓW DO CELÓW EPIDEMIOLOGICZNYCH

Marcin Brzozowski<sup>1</sup>, Paweł Kwiatkowski<sup>1</sup>, Danuta Kosik-Bogacka<sup>2</sup>,  
Joanna Jursa-Kulesza<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Katedra Mikrobiologii, Immunologii i Medycyny Laboratoryjnej,  
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Medycznej, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Wpłynęło w kwietniu 2017 r.  
Zaakceptowano w maju 2017 r.

1. Wstęp. 2. Metody fenotypowe. 2.1. Biotypowanie. 2.2. Typowanie fagowe. 2.3. Analiza profili lekowrażliwości. 2.4. Metody analizy białek. 2.5. Spektroskopia mas. 3. Metody genotypowe. 3.1. Genotypowanie bez wykorzystania sekwencjonowania. 3.1.1. REA-PFGE. 3.1.2. RFLP i PCR-RFLP. 3.1.3. AFLP. 3.1.4. RAPD. 3.1.5. Mikromacierze (CHIP DNA). 3.1.6. MLVA. 3.2. Metody genotypowe wykorzystujące sekwencjonowanie. 3.2.1. Technologie sekwencjonowania. 3.2.2. MLST i SLST. 3.2.3. WGS – wgSNP, cgMLST, wgMLST. 3.2.4. Zalety i wady WGS. 4. Popularność metod typowania bakterii w badaniach biomedycznych na podstawie analizy bazy PubMed. 5. Podsumowanie

### The application of genotyping and phenotyping techniques for epidemiological analysis of microorganisms

**Abstract:** The research on similarity between bacteria in outbreak investigations enables the identification of bacterial strain responsible for infections, their source and modes of transmission. These investigations are also necessary for the analysis of spreading of bacteria, not only locally, e.g. in a hospital in a specific country, but also internationally and globally. Therefore, it is of great importance to have the most up to date knowledge regarding different methods used in bacterial typing. This review discusses and compares methods facilitating bacterial typing at a strain level. Phenotyping methods analysed in this article are: Biotyping, Antimicrobial Susceptibility Typing, Phage Typing and protein-based methods. Genotyping techniques reviewed in this article are based on digestion of genomic DNA, methods using amplification of DNA, and based on sequencing DNA. This would include Multilocus Sequence Typing (MLST) and Whole Genome Sequencing (WGS). Methods used in identification of bacterial strains are being constantly improved, and gaining more in depth knowledge and familiarising with their effectiveness enables better analysis and control of epidemiological situation e.g. in hospitals.

1. Introduction. 2. Phenotyping methods. 2.1. Biotyping. 2.2. Phage typing. 2.3. Antimicrobial susceptibility typing. 2.4. Protein-based methods. 2.5. Mass spectrometry. 3. Genotyping methods. 3.1. Genotyping without DNA sequencing. 3.1.1. REA-PFGE. 3.1.2. RFLP and PCR-RFLP. 3.1.3. AFLP. 3.1.4. RAPD. 3.1.5. Microarrays. 3.1.6. MLVA. 3.2. Genotyping using DNA sequencing. 3.2.1. Sequencing technologies. 3.2.2. MLST and SLST. 3.2.3. WGS – wgSNP, cgMLST, wgMLST. 3.2.4. Advantages and disadvantages of WGS. 4. Popularity of typing methods in biomedical research – PubMed database analysis. 5. Conclusions

**Słowa kluczowe:** dochodzenie epidemiologiczne, metody fenotypowe, metody genotypowe, typowanie drobnoustrojów, sekwencjonowanie  
**Key words:** bacterial strain typing, epidemiological surveillance, genotyping methods, phenotyping methods, sequencing

### 1. Wstęp

Typowanie szczepów bakterii w epidemiologii umożliwia wykrycie epidemii, ustalenie jej źródła, sposobu transmisji i określenie obszaru na którym występuje. Narastająca wirulencja i oporność szczepów bakterii na antybiotyki oraz środki dezynfekcyjne, jak i możliwość modyfikacji bakterii w celach bioterrorystycznych powoduje, że typowanie szczepów staje się coraz ważniejszym badaniem we współczesnej mikrobiologii [53]. Typowanie bakterii na poziomie szczepu szczególnie pomocne jest w przypadku wykrywania zakażeń i epidemii szpitalnych [88]. Wykrycie epidemii na oddziałach leczniczych może okazać się niemożliwe przy stosowaniu rutynowej diagnostyki [43]. W Unii Europejskiej (UE) zakażenia w zakładach opieki zdrowotnej są bezpośrednią przyczyną około 37 tysięcy zgo-

nów rocznie. Bezpośrednie koszty wynikające z zakażeń szpitalnych wynoszą około 7 miliardów dolarów rocznie [23, 99]. W krajach rozwijających się odsetek pacjentów chorujących w wyniku zakażeń szpitalnych wynosi 15,5%, co stanowi wartość co najmniej dwukrotnie wyższą niż w krajach UE [1]. Jednym z czynników etiologicznych zakażeń szpitalnych jest pałeczka ropy błękitnej (*Pseudomonas aeruginosa*), która posiada cechy pozwalające jej przetrwać w różnych środowiskach. Zasiadła ona przeważnie wilgotne środowiska, w tym urządzenia sanitarne oraz rurki intubacyjne hospitalizowanych pacjentów [27, 70]. W przypadku zakażeń dróg oddechowych u osób chorych na mukowiscydozę usunięcie jej jest praktycznie niemożliwe [27]. Oporne na karbapenemy szczepy bakterii *Pseudomonas*, *Acinetobacter* i *Enterobacteriaceae* odpowiedzialne za wywoływanie zakażeń szpitalnych zostały

\* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Katedra Mikrobiologii, Immunologii i Medycyny Laboratoryjnej, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin; tel. 91 466 16 52; e-mail: asiaju@pum.edu.pl

uznane w 2017 roku przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) jako te, dla których potrzeba opracowania nowych antybiotyków jest największa [100].

Do tej pory opisano wiele metod typowania bakterii. Techniki te różnią się od siebie głównie nakładem pracy niezbędnym do przeprowadzenia badania, kosztem, stopniem trudności wykonania, umiejętnością rozróżniania szczepów bakterii (dyskryminacja) [35] i prawidłowym zaklasyfikowaniem do jednego szczepu bakteryjnego wszystkich epidemicznie powiązanych izolatów odpowiedzialnych za znane ognisko epidemiczne (Epidemiologic Concordance) [86]. Stwierdzono, że metody typowania bakterii uznaje się za użyteczne w dochodzeniu epidemiologicznym, jeżeli posiadają wystarczająco dużą siłę dyskryminacji i epidemiologicznej konkordancji, są proste w użyciu, pozwalają na typowanie wszystkich izolatów, a uzyskane wyniki są powtarzalne wewnątrzlaboratoryjnie. Dobra metoda powinna być również wystandaryzowana, aby można było uznać ją za odtwarzalną w innych laboratoriach. W przypadku typowania szczepów bakterii używane są zarówno metody fenotypowe, jak i genotypowe [29, 58].

Przedstawiona praca przeglądowa omawia wybrane metody typowania bakterii na podstawie najnowszych danych z piśmiennictwa.

## 2. Metody fenotypowe

W diagnostyce epidemiologicznej stosowane są metody fenotypowe, które klasyfikują bakterie na podstawie cech fenotypowych mikroorganizmów. Do tych metod zalicza się biotypowanie, serotypowanie, typowanie bakteriofagowe, ocena profili lekowrażliwości oraz metody analizy białek [29].

W związku z tym, że mikroorganizmy mają zdolność do zmian ekspresji genów w zależności od środowiska, dwa genetycznie identyczne organizmy mogą fenotypowo być rozpoznawane jako różne. Poza tym istnieje możliwość powstania pojedynczych mutacji punktowych, insercji lub delecji, wśród izolatów jednego szczepu, co może wpłynąć na zmianę fenotypu [58]. Przykładem może być szczep gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*) ludzko-specyficznego, u którego mutacja punktowa zmieniała jego tropizm na króliczo-specyficzny [92] lub mutacje insercyjne w genie *oprD*, które spowodowały brak wrażliwości bakterii *P. aeruginosa* na karbapenemy [98].

### 2.1. Biotypowanie

Biotypowanie polega na określeniu biotypu lub wariantu ekologicznego bakterii [59]. Termin wariant ekologiczny używany jest w odniesieniu do biotypu, który jest powiązany z danym gatunkiem zwierzęcia [20]. Biotypowanie bakterii polega na ich klasyfikacji na podstawie cech biochemicznych oraz na oce-

nie typu wzrostu kolonii bakteryjnej [20, 59]. Koszt wykonania biotypowania nie jest wysoki, a do wykonania badań można wykorzystać różne testy automatyczne (VITEK, Phoenix) lub manualne (API) systemy oznaczania cech biochemicznych [16, 19, 61]. Istnieje również możliwość oznaczenia biotypu za pomocą prostych testów biochemicznych, w tym wytwarzania H<sub>2</sub>S, produkcji DNaz oraz test na ureazę. Biotypowanie nie wymaga konieczności posiadania specjalistycznego sprzętu oraz jest łatwe w przeprowadzeniu. Mimo niskiego potencjału różnicującego metoda w niektórych laboratoriach wciąż jest wykorzystywana ze względu na jej niewielki koszt [8]. Badania przeprowadzone przez Minharro i wsp. [25] wykazały przydatność łączenia biotypowania z metodą genotypową jednoczesnej amplifikacji wielu loci o zróżnicowanej liczbie tandemowych powtórzeń (Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis, MLVA). W badaniu za pomocą biotypowania scharakteryzowano szczep *Brucella abortus* MLVA16. Badania te przyczyniły się także do lepszego zrozumienia epidemiologii i transferu szczepów *B. abortus* w Brazylii.

### 2.2. Typowanie fagowe

Bakteriofagi są wirusami, które mogą powodować lizę bakterii. Właściwość tą wykorzystano do opracowania metody fenotypowej polegającej na podziale szczepów bakterii ze względu na to, czy ulegają one lizie wywołanej przez specyficzne bakteriofagi [96]. Technika ta była przez wiele lat metodą referencyjną, wykorzystywaną w badaniach epidemiologicznych gronkowca złocistego oraz pałeczek salmonelli [2, 6]. Do fagotypowania używa się sprawdzonych w badaniach epidemiologicznych zestawów bakteriofagów [6]. Siła dyskryminacji tej metody zależy od doboru zestawu fagów oraz badanych bakterii [96]. W badaniu nie wykorzystuje się drogiego specjalistycznego sprzętu, co stanowi zaletę tej metody [5]. Natomiast metoda wymaga doświadczenia pracowników oraz pomocy ośrodków referencyjnych w celu utrzymania i unowocześniania systemu, co stanowi jej wadę. Najnowsze badania wykazały, że stare zestawy bakteriofagów wykorzystywane do badań epidemiologicznych mogą dziś już nie działać w taki sam sposób jak dawniej. Wykazano, że DNA fagów referencyjnych rekombinowało z DNA fagów, które występowały naturalnie w badanych szczepach bakterii, mogło to zmienić ich specyficzność względem badanych szczepów [78]. Wykazano również, że wykorzystanie tylko tej techniki może być niewystarczające do zidentyfikowania szczepu i źródła odpowiedzialnego za epidemię. W Danii w latach 2007–2008 fagotypowanie wykorzystano do badań epidemiologicznych pałeczek *Salmonella* Typhimurium. W ciągu roku stwierdzono 1300 nowych zakażeń, jednak zastosowanie tej metody nie przyczyniło się do wykrycia źródła

zakażenia. Dokonanie pełnej identyfikacji epidemii było możliwe po zastosowaniu dwóch innych metod: MLVA oraz elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym (Restriction Enzyme Analysis Pulse Field Gel Electrophoresis, REA-PFGE) [5].

### 2.3. Analiza profili lekowrażliwości

Jedną z fenotypowych metod typowania bakterii jest badanie profilu oporności na antybiotyki. Założono, że identyczne bakterie odpowiedzialne za powstawanie epidemii charakteryzują się identyczną lub podobną wrażliwością na antybiotyki. Metoda ta jest prosta oraz tania ze względu na rutynowość wykonywania antybiogramów [91]. Zaletą jest powszechne standaryzowanie wykonywania testów wrażliwości na antybiotyki [24]. Użyteczność tej metody zależy od stabilności oporności na leki mikroorganizmów. Brak stabilności może powodować, że wykorzystanie analizy profilu lekowrażliwości może być nieprzydatne nawet we wstępnym różnicowaniu szczepów bakterii [91]. Na podstawie najnowszych badań wykazano brak korelacji pomiędzy profilami oporności a wynikami badań genotypowych bakterii *Lactobacillus* [101], *Listeria monocytogenes* [41] oraz *Klebsiella pneumoniae* [80], co może wskazywać na niewielką przydatność tej metody w typowaniu szczepów. Sugeruje się stosowanie analizy profilu oporności w połączeniu z innymi technikami genotypowymi. [80].

Udowodniono, że stosowanie analizy profilu lekowrażliwości bakterii w połączeniu z analizą bioinformatyczną może podnieść efektywność wykrywania epidemii. Badania programu statystycznego WHO-NET-SaTScan (WS) wykazują możliwość weryfikacji występowania epidemii szpitalnych na podstawie profilu oporności izolatów i danych klinicznych. Metoda wykorzystująca program WS charakteryzuje się wyższą czułością w wykrywaniu epidemii szpitalnych niż rutynowe metody oparte na sumowaniu przypadków izolacji różnych bakterii od pacjentów w określonym czasie. Dodatkowo wykorzystanie programu WS pozwala na analizę występowania epidemii w czasie rzeczywistym. Przeprowadzenie takiego badania jest proste i mało czasochłonne. Potencjał różnicujący w porównaniu do metody referencyjnej REA-PFGE jest wciąż niski, dlatego sugeruje się wykorzystanie tej techniki we wstępnym rozpoznawaniu epidemii szpitalnych [34, 84].

### 2.4. Metody analizy białek

Metody analizy białek obecnie podzielono na metody wykorzystujące elektroforezę oraz na nowe metody identyfikujące białka za pomocą spektroskopii masowej. Jedną z metod typowania opartych na rozdziale elektroforetycznym badających białka jest MLEE (Multi-Locus Enzyme Electrophoresis). Szczepy w metodzie MLEE

różnicuje się w oparciu o ruchliwość elektroforetyczną izoenzymów komórkowych rozpuszczalnych w buforach wodnych. Ruchliwości izoenzymów zależy od ich składu aminokwasowego oraz ułożenia przestrzennego. Nośnikami elektroforetycznymi są zwykle żele skrobiowe lub poliakryloamidowe. W celu uwidocznienia badanych enzymów na żelu dokonuje się jego reakcji ze specyficznym dla niego związkiem substratowym. Uzyskane wzory izoenzymów komórkowych są charakterystyczne dla danego szczepu [10, 81].

Metoda ta jest wykorzystywana do analizy bakterii, grzybów i pierwotniaków [10]. Siła dyskryminacji techniki MLEE jest uznawana za wysoką, jednakże jest niższa niż metod molekularnych, takich jak MLST i PFGE [37]. Technika ta była wykorzystywana w typowaniu szczepów m.in. *Mycobacterium tuberculosis* lub *S. aureus* [13, 26]. Niższa siła różnicowania szczepów może być spowodowana przez identyczną ruchliwość elektroforetyczną różnych wariantów enzymów oraz z powodu braku zmian w sekwencji aminokwasowej enzymu w przypadku niewielkich substytucji w genach je kodujących [56].

### 2.5. Spektroskopia mas

Od pewnego czasu prowadzone są badania nad wykorzystaniem spektroskopii masowych (MS) do typowania szczepów bakteryjnych. MS wykorzystuje się do identyfikacji bakterii z użyciem aparatów MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time-of-Flight Mass Spectrometry). Przydatność tej metody do określenia szczepu bakterii była przedmiotem badań w ostatnich latach. Wyniki tych badań wskazują, że wykorzystanie aparatów MALDI-TOF-MS w przyszłości może być przydatne do typowania szczepów. Badanie przy użyciu tego aparatu określono jako proste, szybkie oraz tanie [77]. Za pomocą MALDI TOF przeprowadzono retrospektywne badania izolowanych od bydła bakterii *Mannheimia haemolytica*, w których wykazano istnienie dwóch głównych genotypów, co było zgodne z wynikiem uzyskanym na podstawie sekwencjonowania całego genomu [55]. W innych badaniach, w których do typowania szczepów *Enterococcus faecalis* użyto metody ADSRRS (Amplification of DNA Fragments Surrounding Rare Restriction Sites) oraz MALDI-TOF MS wykazano, że obydwie techniki mogą być wykorzystywane do identyfikacji szczepów mikroorganizmów [64]. Wyższą siłą dyskryminacji charakteryzowała się technika MALDI-TOF MS. Zaobserwowano także różnice w podziale izolatów na szczepy w zależności od zastosowanej metody. Według autorów spowodowane było to przez różnice w metodologii. W metodzie ADSRRS badane są polimorfizmy miejsc restrykcyjnych, a w przypadku MALDI-TOF MS białka „housekeeping” [64].

Najnowsze dane z piśmiennictwa naukowego dotyczące narzędzi do analiz szczepów wskazują na możliwości wykorzystania w przyszłości tandemowych spektrometrów mas (MS/MS) o wysokiej rozdzielczości do analizy wielu tysięcy białek w krótkim czasie (Shotgun Proteomics). Do badań wykorzystuje się strawione białka wcześniej pozyskane z lizatów komórkowych. Najnowsze analizatory MS/MS różnicują białka różniące się nawet jednym aminokwasem [82]. Badania białek przy użyciu nowoczesnych aparatów MS nazywane są proteomiką następnej generacji [3]. Analizy wykorzystujące spektrometr MS/MS mogą zostać przeprowadzone w ciągu jednego dnia [22]. Ocena przydatności tej metody w typowaniu bakterii jest obecnie w trakcie badań. Pierwsza publikacja naukowa z wykorzystaniem chromatografu cieczowego (MS/MS) wskazuje na przydatność tej metody nie tylko w typowaniu bakterii, ale również w badaniach białek bakteryjnych. Określenie dokładnej przydatności tej techniki w typowaniu szczepów wymaga dalszych badań [82].

### 3. Metody genotypowe

Metody genotypowe pozwalają na typowanie bakterii na podstawie różnic w ich genomach. Występowanie tych różnic może być spowodowane rekombinacjami genetycznymi lub mutacjami powstałymi podczas replikacji. Stwierdzono, że im więcej różnic w DNA mikroorganizmów tym są one mniej spokrewnione. Metody genotypowe często charakteryzują się większą siłą dyskryminacji oraz konkordancji od metod fenotypowych. Spowodowane jest to zmiennością fenotypową bakterii w zależności od środowiska oraz występowaniem zależności cech fenotypowych od genotypowych, niewielkie zmiany w genotypie mogą odpowiadać dużym zmianom fenotypowym. Zmiana cech fenotypowych może również wystąpić w wyniku horyzontalnego transferu genów pomiędzy mikroorganizmami, a transfer genów nie musi wpływać na wynik z badania genotypowego.

W prezentowanej pracy metody genotypowe podzielono na dwie główne grupy. Do pierwszej z nich zaliczono metody, w których nie wykorzystuje się sekwencjonowania DNA, w tym: REA-PFGE, RFLP, PCR-RFLP, AFLP, RAPR, MLVA i typowanie przy pomocy CHIPów-DNA. Natomiast do drugiej grupy zaliczono metody wykorzystujące odczyt kolejności nukleotydów w DNA.

#### 3.1. Genotypowanie bez wykorzystania sekwencjonowania

##### 3.1.1. REA-PFGE

Metoda REA-PFGE (Restriction Enzyme Analysis – Pulsed Field Gel Electrophoresis) została opracowana

w 1984 roku i po wielu modyfikacjach została uznana za „złoty standard” w typowaniu molekularnym drobnoustrojów [79]. Technika ta używana jest w laboratoriach badawczych do analiz szczepów bakteryjnych wyizolowanych z środowisk szpitalnych i pozaszpitalnych [43, 87]. Metoda REA-PFGE jest przydatnym narzędziem w wykrywaniu lokalnych endemii lub epidemii wywołanych przez jeden szczep bakteryjny oraz w celu określenia źródła pochodzenia nowych zakażeń. Jednak metodę tą trudno jest stosować w wielośrodkowej diagnostyce epidemiologicznej ze względu na jej złożoność, czasochłonność i brak standaryzacji procedur stosowania [97]. Pomimo tych wad wykorzystano metodę PFGE w międzynarodowych badaniach epidemiologicznych prowadzonych przez PulseNet (International Molecular Subtyping Network for Food-borne Disease Surveillance) [95]. Analiza makrorestrykcyjna genomowego DNA w połączeniu z elektroforezą w zmiennym polu elektrycznym wymaga izolacji i trawienia DNA rzadko tnącym enzymem restrykcyjnym. Pofragmentowane DNA umieszczone w żelu agarozowym poddawane są elektroforezie w pulsowym polu elektrycznym. Pulsacja pola elektrycznego polega na okresowej zmianie kierunku tego pola o określony kąt. Wymusza to zmianę konformacji i reorientację cząsteczek co jest niezbędne do ich migracji w żelu. Czas wymagany do reorientacji (zwiniecie, obrót i relaksacja) zależy od wielkości molekuł DNA. Dłuższe cząsteczki DNA wymagają dłuższego czasu na reorientację, co powoduje ich wolniejszą migrację w żelu. Na szybkość migracji fragmentów kwasów nukleinowych wpływają również inne czynniki, w tym wartość natężenia pola elektrycznego, czas trwania elektroforezy, kąt zmiany kierunku pola elektrycznego, skład użytego żelu agarozowego, temperatura oraz skład buforu użytego do elektroforezy [30]. W zależności od rozmieszczenia elektrod w komorach do elektroforezy wyróżnia się kilka odmian techniki PFGE. Najbardziej znanymi odmianami tej techniki są elektroforeza w zmiennym, homogenym polu o kształcie sześciokąta foremnego (Contour Clamped Homogenous Electric Field Electric Electrophoresis, CHEF), w której dwa pola elektryczne skierowane są do siebie pod kątem 120°, system PACE (Programmable Autonomously Controlled Electrodes) oparty na CHEF, w którym wszystkie elektrody kontrolują każdy parametr elektroforezy oraz elektroforeza w odwracalnym polu elektrycznym (Field Inversed Gel Electrophoresis, FIGE), w której kierunek pola elektrycznego jest co pewien czas zmieniany o 180° [66]. Wynikiem rozdziału elektroforetycznego jest charakterystyczny dla danego szczepu układ prążków DNA na żelu. Do analizy pokrewieństwa szczepów na podstawie wzorów DNA na żelu wykorzystuje się programy komputerowe lub metodę analizy zaproponowaną przez Tenover i wsp. [89]. W metodzie tej określa się stopień

pokrewieństwa poszczególnych szczepów bakterii na podstawie ilości tak samo ułożonych prążków. Izolaty, których układ prążków jest identyczny uznawane są jako nie do odróżnienia, w przypadku różnic od 2 do 3 prążków blisko spokrewnione, a od 4 do 6 możliwe spokrewnione. W przypadku gdy pomiędzy izolatami występuje więcej niż 7 różnic w ułożeniu prążków takie izolaty uważane są jako szczepów niespokrewnione.

### 3.1.2. RFLP i PCR-RFLP

Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (Restriction Fragments Length Polymorphism, RFLP) jest techniką wykorzystywaną w typowaniu bakterii i polega na analizie różnic w długości fragmentów DNA powstałych w wyniku trawienia genomowego DNA enzymami restrykcyjnymi często tnącymi. Uzyskane w ten sposób fragmenty DNA poddaje się elektroforezie i przenosi na specjalną membranę, a następnie DNA jest hybrydyzowane z wyznakowanymi sondami. Połączenie sond z DNA powoduje powstanie wzoru prążków na membranie charakterystycznych dla różnych klonów bakteryjnych [31, 53]. Metoda RFLP jest często wykorzystywana do typowania szczepów *M. tuberculosis* oraz *Yersinia pseudotuberculosis* [31, 94].

PCR-RFLP jest modyfikacją podstawowej wersji techniki RFLP. Pierwszym etapem analizy PCR-RFLP jest amplifikacja znanego genu lub fragmentu DNA, który następnie poddawany jest działaniu odpowiedniego enzymu. Uzyskane fragmenty DNA po rozdzieleniu elektroforetycznym dają różne wzory restrykcyjne, wynikające z polimorfizmu amplifikowanej sekwencji i umożliwiają identyfikację różnych szczepów mikroorganizmów. Zaletami techniki PCR-RFLP jest szybkość, prostota wykonania oraz niski koszt badania [65]. Potencjał różnicujący tej techniki jest niezbyt wysoki, co jest wynikiem analizy jedynie miejsc restrykcyjnych dla badanego amplikonu, a nie całego genomu. Na siłę różnicującą metody wpływa również wybór amplifikowanej sekwencji oraz odpowiednich enzymów. Metoda ze względu na swoją niską siłę dyskryminacji nie jest zalecana do stosowania w długoterminowych badaniach epidemiologicznych. W przypadku konieczności stosowania tej techniki do typowania bakterii izolowanych w długich odstępach czasu należy zastosować jej odmianę PCR-RFLP dla wielu locus (Multi-Locus PCR-RFLP). Jednakże badanie wielu miejsc w genomie wiąże się ze wzrostem kosztów i pracochłonności metody oraz większą trudnością w interpretacji wyników [68].

### 3.1.3. AFLP

Metoda AFLP-PCR (Amplified Fragment Length Polymorphism) po raz pierwszy została opisana w 1995 roku [93]. W technice tej wykorzystuje się dwa enzymy restrykcyjne jeden często (np. *MspI*) i drugi

średnio (np. *EcoRI*) tnący dające tzw. lepkie końce 5'. Polega na połączeniu krótkich dwuniciowych fragmentów DNA (adaptorów) za pomocą enzymu ligazy z lepkiymi końcami pofragmentowanego wcześniej DNA. Po ligacji następuje amplifikacja selektywna. PCR przeprowadza się z zastosowaniem starterów o sekwencji identycznej do sekwencji oligonukleotydu ligowanego adaptora, wydłużonych na końcu 3' o sekwencję miejsca restrykcyjnego oraz od jednego do czterech nukleotydów selekcyjnych. Amplifikacja fragmentu DNA zachodzi tylko w sytuacji pełnej komplementarności końca 3' startera do fragmentu restrykcyjnego. W przypadku badania dużych genomów (grzyby, pasożyty) przed PCR selektywnym dodatkowo stosuje się amplifikację wstępną. Sekwencje starterów do preamplifikacji w porównaniu do użytych w amplifikacji selektywnej są wydłużone na końcu 3' o jeden selektywny nukleotyd [93, 21].

W pierwotnej wersji metody AFLP jeden ze starterów wykorzystywanych do amplifikacji selektywnej był znakowany izotopowo. W udoskonalonej wersji tej metody do znakowania używa się barwników fluorescencyjnych. Znakowanie starterów stosuje się w celu odczytania wyników po elektroforezie. Fluorescencyjne wyznakowanie umożliwia również analizę wyników za pomocą automatycznych sekwenatorów kapilarnych. Ze względu na złożoność uzyskiwanych wyników badania wymagana jest ich analiza za pomocą programów komputerowych [21, 74]. Zaletami metody AFLP jest wysoki współczynnik dyskryminacji porównywalny do techniki PFGE i losowej amplifikacji polimorficznych fragmentów (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD), możliwość korzystania z niewielkich ilości matrycy DNA, wysoka powtarzalność wyników oraz prostota ich archiwizacji, natomiast wadą tej techniki jest dość wysoki koszt badania oraz duża pracochłonność [45, 74]. Metoda AFLP zaliczana jest do technik opartych o ligację adaptorów oligonukleotydowych. Do metod wykorzystujących adaptory w reakcji PCR należą: ADSRRS, IRS-PCR (Infrequent Restriction Site PCR), PCR-MP (PCR Melting Profiles) [48], LM PCR/Shifter (Ligation-Mediated PCR) [47].

### 3.1.4. RAPD

Metoda RAPD generuje profile genetyczne z użyciem dużej liczby losowych krótkich starterów o długości od 8 do 12 nukleotydów. Metoda ta nie wymaga znajomości sekwencji badanego DNA. Krótkie startery łączą się podczas reakcji PCR z wieloma komplementarnymi fragmentami DNA. Powstałe podczas amplifikacji fragmenty DNA są rozdzielane elektroforetycznie, a uzyskany układ prążków DNA na żelu jest charakterystyczny dla różnych szczepów bakterii [49].

Metoda wykorzystująca arbitralne startery (Application of Polymerase Chain Reaction with Arbitrary

Primer, AP-PCR) jest jedną z wersji techniki RAPD. W wielu badaniach nie rozróżnia się tych metod. W technice AP-PCR amplifikacja składa się z trzech etapów, pierwszy etap przebiega w warunkach reakcji, umożliwiających starterom przyłączenie się do matrycy w wielu niespecyficznych miejscach. Natomiast w kolejnych etapach amplifikacji ustala się warunki blokujące niekomplementarne połączenia starterów z DNA [74]. Zaletami metody RAPD jest brak konieczności znajomości sekwencji DNA w celu przeprowadzenia badania, niski koszt i łatwość wykonania. Wadą metody jest niska powtarzalność wyników zależna od wielu czynników, w tym jakości matrycy DNA, użytych odczynników oraz warunków reakcji PCR co stwarza trudności w wykorzystaniu tej techniki do badań wielośrodkowych [49, 74]. W porównaniu do PFGE metoda RAPD charakteryzuje się niższym współczynnikiem dyskryminacji, przy czym RAPD wykazuje się większą typowością szczepów [4].

### 3.1.5. Mikromacierze (CHIP DNA)

Mikromacierze są płytkami z regularnie ułożonymi polami z przytwierdzonym do nich DNA. Każde pole zawiera inną znaną sekwencję DNA tzw. sondę. Zastosowanie mikromacierzy umożliwia ilościowe wykrywanie danych sekwencji DNA w genomach dzięki hybridyzacji sond z badanym materiałem genetycznym. Procedura badania polega na wyznakowaniu wyizolowanego DNA. Do znakowania wykorzystuje się różne znaczniki m.in. fluorescencyjne, chemiluminescencyjne lub radioizotopy. Następnie wyznakowane DNA poddaje się hybridyzacji z sondami DNA na macierzy. Niehybrydizowane fragmenty DNA są usuwane. Sygnał pochodzący z wyznakowanego DNA połączonego z sondami jest odczytywany za pomocą skanera. Uzyskane dane są następnie analizowane przy użyciu specjalistycznego oprogramowania [12]. Od kilkunastu lat trwają badania nad mikromacierzami, które eliminowałyby konieczność znakowania badanego DNA oraz co się z tym wiąże zakupu aparatury do odczytu. W tym celu zaproponowano wykorzystanie elektronicznych sensorów, które wykrywałyby sekwencje DNA łączące się do sond [7]. Najnowsze wyniki badań wykazały wysoką efektywność 2D-grafenowych tranzystorów polowych (FET) i specjalnych sond dwuniciowych w wykrywaniu polimorfizmów pojedynczych nukleotydów na macierzy. Podczas łączenia się badanego DNA do sondy mierzone ładunek elektrycznym układem. Na podstawie wartości zmian ładunku analizowano jaka sekwencja łączyła się z sondą [36].

Wprowadzone w ostatnich latach mikromacierze o wysokiej gęstości pól dochodzących nawet do setek tysięcy umożliwiają wykrywanie bardzo dużej ilości sekwencji [46]. Do typowania bakterii wykorzystuje się mikromacierze typu CHIP-DNA. Umożliwiają

one identyfikację szczepów oraz uzyskanie informacji dotyczących ekspresji genów i oporności na antybiotyki [17]. Sekwencje, które nie znajdują się na macierzy nie mogą być wykryte [74]. Prowadzone są badania z użyciem chipów DNA do określenia serotypów szczepów bakterii *Escherichia coli* wytwarzających shiga-toksyny, które są nietypowe lub częściowo typowe za pomocą klasycznych zestawów surowic [28].

Przydatność mikromacierzy do typowania bakterii została wykazana w wielu wcześniejszych badaniach, w których stwierdzono wysoką konkordancję chipów DNA z sekwencjonowaniem całego genomu (Whole Genome Sequencing, WGS) [40, 85]. Jednak ilość informacji dostarczana za pomocą WGS jest znacznie większa od uzyskanych przy użyciu mikromacierzy. Obecnie koszt chipów DNA jest porównywalny z kosztem typowania za pomocą WGS. W przyszłości może to spowodować zastąpienie metod typowania bakterii za pomocą hybridyzacji, sekwencjonowaniem całego genomu [85].

### 3.1.6. MLVA

MLVA to technika molekularna typowania mikroorganizmów różnicująca bakterie na podstawie zmiennej liczby powtórzeń tandemowych (Variable Number of Tandem Repeats, VNTR) w ich DNA. Duża zmienność VNTR w obrębie mikroorganizmów umożliwia identyfikację szczepów bakterii. Badanie MLVA polega na amplifikacji sekwencji VNTR oraz określeniu ich długości. Na podstawie pomiaru długości różnych sekwencji VNTR mikroorganizmy dzielone są na szczepy [63].

Metodę wykorzystuje się do identyfikacji szczepów bakterii szybko ewoluujących, których różnicowanie może być niemożliwe przy zastosowaniu innych metod molekularnych, w tym PFGE. W sieci PulseNet technika MLVA wykorzystywana jest jako metoda uzupełniająca dla PFGE i umożliwia różnicowanie bakterii posiadających podobny wzór PFGE [14]. Zaobserwowany w badaniach brak różnorodności pulstypów bakterii *E. coli* O157:H7 izolowanych w Kanadzie, spowodował problemy w różnicowaniu przypadkowych pojedynczych zakażeń od potencjalnych epidemii. Dopiero połączenie stosowania metod MLVA i PFGE pozwoliło na optymalne różnicowanie szczepów *E. coli* O157:H7 [72].

Wysoki współczynnik dyskryminacji metody spowodowany jest szybkimi zmianami w regionach o zmiennej liczbie tandemowych powtórzeń. Duża dynamika zmian w regionach VNTR bakterii rzeczywiście spokrewnionych może być przyczyną błędnego zaklasyfikowania ich do bakterii niespokrewnionych [67]. W porównaniu do metody PFGE procedura MLVA jest dużo prostsza i szybsza, a samą metodę łatwiej jest standaryzować. Ze względu na brak standaryzacji dla wielu bakterii, protokoły jej wykonania są udoskonalane [54].



### 3.2. Metody genotypowe wykorzystujące sekwencjonowanie

Sekwencjonowanie jest coraz częściej wykorzystywanym narzędziem do typowania bakterii. Spowodowane jest to stałym spadkiem kosztów wykonania badania, a także ulepszaniem sekwenatorów oraz metod sekwencjonowania przez naukowców i koncerny biotechnologiczne. Postęp, który dokonał się w ostatnich latach w tym obszarze nauki jest ogromny.

#### 3.2.1. Technologia sekwencjonowania

W 1977 roku powstała pierwsza powszechnie używana technika sekwencjonowania, zwana metodą Sangera. Pierwsze aparaty wykorzystywane do automatycznego sekwencjonowania DNA odczytywały sekwencję o długości do 1000 pz. W przypadku badań z zastosowaniem dłuższych sekwencji nukleotydowych stosowano metodę „shotgun” polegającą na sekwencjonowaniu fragmentów DNA nachodzących na siebie. Uzyskane sekwencje DNA następnie są łączone w całość. Jedną z technik, która była kamieniem milowym w rozwoju sekwencjonowania było pirosekwencjonowanie pozwalające na odczyt kolejności nukleotydów w czasie rzeczywistym [33]. Do rozwoju sekwencjonowania przyczyniło się wprowadzenie nowych sekwenatorów tzw. drugiej generacji umożliwiających szybki odczyt milionów sekwencji DNA. Ogromną popularność zyskał system wprowadzony przez firmę Solexa produkowany później przez firmę Illumina. W technice tej badane oligonukleotydy łączone są za pomocą adaptorów do stałego podłoża, a następnie amplifikowane i sekwencjonowane. Podczas przyłączania kolejnych zasad zachodzą barwne reakcje wskazujące, który nukleotyd został przyłączony do badanej sekwencji [33, 37]. Wykorzystując tę technologię firma Illumina jako pierwsza stworzyła aparat HiSeqX, który jest w stanie zsekwencjonować ludzki genom za kwotę mniejszą niż 1000\$ [38].

Jedną z najnowszych metod sekwencjonowania jest sekwencjonowanie pojedynczych cząsteczek DNA w czasie rzeczywistym (Single Molecule Real Time Sequencing, SMRT). Firmą produkującą tego typu sekwenatory jest Pacific Biosciences. Metoda opracowana przez tę firmę rozpoczyna się od immobilizacji badanego DNA z polimerazą na powierzchni specjalnego falowodu optycznego o wielkości w skali nano (Zero-Mode Waveguides, ZMW). Podczas amplifikacji do DNA wbudowywane są nukleotydy wyznakowane barwnikami fluorescencyjnymi o różnym spektrum emisyjnym. Powoduje to powstawanie sygnałów świetlnych, które są wyłapywane za pomocą falowodu ZMW [33, 71, 90].

Do najnowszych technik sekwencjonowania kolejnej generacji należy również odczyt sekwencji DNA przy wykorzystaniu nanoporów. Sekwencjonowanie przy użyciu tej technologii przypomina w działaniu licznik

Coultera lub technologię TRPS (Tunable Resistive Pulse Sensing), które stosowane są do mierzenia wielkości cząsteczek w skali mikro lub nano. Sekwencjonowanie przeprowadza się w komorach z roztworami elektrolitów oddzielonych membraną, na której znajduje się por o wielkości nie większej niż kilka nanometrów. W każdej komorze zlokalizowane są również elektrody. Podłączenie napięcia elektrycznego do komory wymusza ruch jonów roztworu przez nanopor. Podczas przechodzenia ujemnie naładowanej nici DNA przez nanopor następuje częściowe zablokowanie przepływu elektrolitów. Ze względu na różnice w wielkości nukleotydów, każdy z czterech nich powoduje inną zmianę w przepływie jonów. Na podstawie zmian w przepływie jonów można określić kolejność wbudowanych nukleotydów w nici DNA [32]. Pierwszą firmą, która opracowała sekwenatory w technologii nanoporów jest Oxford Nanopore Technologies. Obecnie oferowany przez tę firmę aparat MinION, wielkością przypomina telefon komórkowy. Urządzenie to nie jest drogie, najtańszy zestaw startowy z aparatem MinION kosztuje około 1000\$ [62]. Wadą tych sekwenatorów jest duży odsetek błędów (kilkadziesiąt procent) podczas odczytu kolejności nukleotydów DNA. Stwierdzono, że ilość błędów zmniejsza się wraz z pojawianiem się nowszych, udoskonalonych sekwenatorów wykorzystujących nanopory [44].

#### 3.2.2. MLST i SLST

Metody MLST (Multi-Locus Sequence Typing) i SLST (Single-Locus Sequence Typing) to metody typowania służące do identyfikacji szczepów mikroorganizmów na podstawie różnic w sekwencjach ich genów. W technice MLST bada się sekwencje genów niezbędnych do przeżycia mikroorganizmów tzw. housekeeping [74]. Geny te są uważane za reprezentatywne dla całego genomu. Zazwyczaj sekwencjonuje się 6–7 genów o długości od 450 do 500 pz [67]. Natomiast w metodzie SLST sekwencjonowaniu podlega jeden fragment DNA. Często stosowaną techniką SLST jest typowanie *spa*, w której badany jest polimorficzny region genu kodującego białko A bakterii *S. aureus*. Technika ta pomimo niższego potencjału różnicującego niż PFGE, jest bardzo często wykorzystywana do różnicowania szczepów *S. aureus*. Metoda ta charakteryzuje się niskim kosztem, jest łatwa i szybka w przeprowadzeniu oraz wysoce powtarzalna [74]. Wyniki uzyskane z wykorzystaniem metody MLST są powtarzalne i łatwo porównywalne pomiędzy laboratoriami. Technika ta jest głównie wykorzystywana do globalnych badań epidemiologicznych, jednakże może być stosowana do badań szczepów na małym obszarze [54, 74]. W wielośrodkowych badaniach epidemiologicznych z użyciem metody MLST pomocne są globalne bazy danych sekwencji i typów sekwencyjnych (ST), których adresy internetowe

zamieszczone są w bibliografii [39, 60, 69]. Bazy danych zapewniają również dostęp do instrukcji wykonania badań techniką MLST ponad stu mikroorganizmów [39, 74]. Wadami MLST są wysoki koszt oraz pracochłonność w porównaniu do innych technik. Jednakże według niektórych autorów zastosowanie najnowszych sekwencjatorów może obniżyć koszty i czas wykonania badania prawie dziesięciokrotnie w porównaniu do standardowego badania MLST. Badanie przeprowadzone przez Chen i wsp. [15] wykazały, że przy wykorzystaniu jednego z najnowszych sekwencjatorów (PacBio RS II) do typowania grzybów *Cryptococcus neoformans* średni koszt analizy w porównaniu do konwencjonalnego MLST, opartego o sekwencjonowanie Sangera, jest mniejszy około dziewięciokrotnie, a w przypadku pirosekwencjonowania w aparacie Roche 454 pięciokrotnie (~9\$ za jeden genom).

Obok klasycznej metody MLST stosowane są również jej rozwinięcia, w tym eMLST (extended MLST), rMLST (ribosomal MLST), cgMLST (core genome MLST) i wgMLST (whole genome MLST). Badanie eMLST jest to rozszerzenie standardowej metody o badanie dodatkowych miejsc w genomie lub wydłużenie długości badanych sekwencji [15, 103]. Technika rMLST polega na badaniu różnic w 53 genach kodujących podjednostki białek rybosomalnych [42]. Metody te charakteryzują się większą siłą dyskryminacji niż konwencjonalny MLST. W technikach cgMLST i wgMLST do przeprowadzenia typowania niezbędne są informacje dotyczące całego genomu, dlatego omówiono je w podrozdziale dotyczącym WGS.

Wraz ze wzrostem wydajności i spadkiem kosztów sekwencjonowania bezpośrednio badanie DNA w próbkach środowiskowych (metagenomika) staje się efektywną metodą charakterystyki mikroorganizmów. Zaletą metagenomiki jest pominięcie etapu izolacji i hodowli, co znacznie przyspiesza przeprowadzenie badania. Metoda MLST znalazła również zastosowanie w metagenomice. Zolfo i wsp. [103] wykazali możliwość efektywnego typowania bakterii z próbek środowiskowych przy użyciu programu MetaMLST. Autorzy ci stwierdzili, że metoda umożliwia identyfikację 96% badanych typów sekwencyjnych (ST) w metagenomach, przy 100% specyficzności. Metoda ta została wykorzystana do analizy setek metagenomów skóry, jamy ustnej i przewodu pokarmowego. Ponadto zastosowanie MetaMLST umożliwiło poznanie szczepu bakterii *Helicobacter pylori* pozyskanego z mumii, której wiek szacuje się na 5300 lat [103].

### 3.2.3. WGS- wgSNP, cgMLST, wgMLST

Seqwencjonowanie całych genomów jest coraz częściej wykorzystywaną techniką w typowaniu mikroorganizmów. W porównaniu do innych technik ilość informacji dostarczonych jako wynik sekwencjono-

wania całego genomu jest dużo większa. Z jednego badania można uzyskać informacje pozwalające na różnicowanie bakterii na podstawie ich całego DNA jak i danych umożliwiających przeprowadzenie analiz MLST, rMLST oraz typowania spa [11]. Wyróżniono kilka głównych koncepcji w opisywaniu różnic w sekwencji DNA pomiędzy mikroorganizmami: (1) metodę, w której porównuje się polimorfizm pojedynczych nukleotydów (whole genome Single-Nucleotide Polymorphism, wgSNP), (2) metodę, w której porównuje się polimorfizm typu insercja-lub-delecja oraz (3) podejście tzw. „gene-by-gene”.

Analiza wgSNP polega na różnicowaniu badanych sekwencji na podstawie występowania różnych wariantów SNP w DNA. Stwierdzono, że im więcej różnic SNP pomiędzy dwoma organizmami tym są one mniej spokrewnione. W przeszłości dużym problemem w przypadku tej metody była konieczność posiadania referencyjnych genomów, do których badane sekwencje SNP były porównywane. Jednakże dostępne dziś nowe narzędzia bioinformatyczne według badań pozwalają na rozwiązanie tego problemu [9, 52]. W porównaniu do metod cgMLST i wgMLST metoda ta charakteryzuje się minimalnie większą siłą dyskryminacji.

Inną metodą analizy różnic w sekwencji DNA jest analiza polimorfizmu typu insercja-lub-delecja (indel). Niewiele wiadomo na temat występowania indeli i mechanizmów ich ewolucji u mikroorganizmów. Wielkość mutacji indel może wahać się od 1 pz do nawet kilkumilionów. Wyróżnia się indele małe o długości do 100 pz oraz duże o długości  $\geq 100$  pz [83, 102]. W przypadku dużych indeli występuje często problem z ich identyfikacją za pomocą narzędzi bioinformatycznych. Steglich i wsp. [83] wykazali możliwości efektywnego wykrywania indeli długich o wielkości do 2 321 pz za pomocą programu ScanIndel, który wykrywał długie indele z czułością 97%.

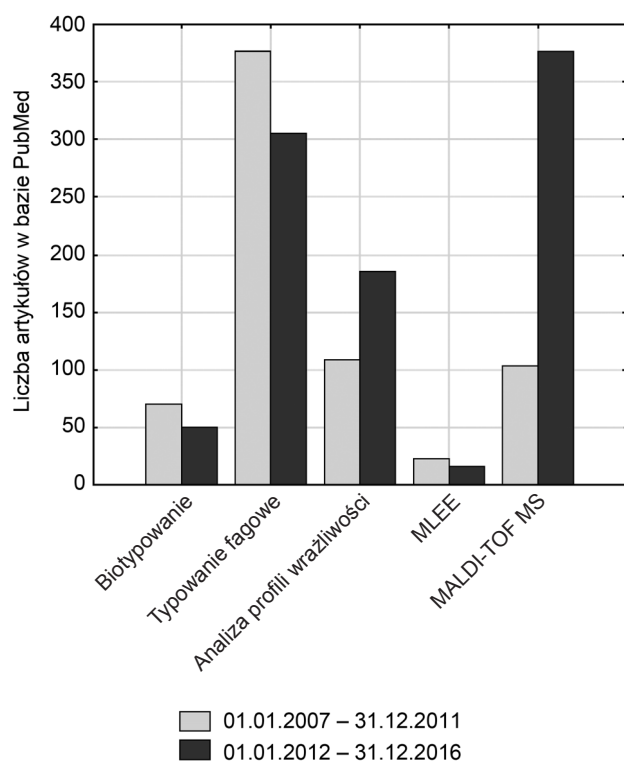
Metody cgMLST i wgMLST są coraz częściej stosowanymi metodami różnicowania typowania mikroorganizmów. W metodach tych badane sekwencje porównuje się z sekwencjami genów referencyjnych. Sposób ten nazywany jest podejściem „gene-by-gene”. Identyczne podejście stosowane jest w metodzie MLST, badane sekwencje „house-keeping gene” porównywane są z genami referencyjnymi. W technice cgMLST badane są sekwencje genów zakonserwowanych ewolucyjnie dla danego gatunku, które występują np. u 95% wszystkich szczepów z danego gatunku. W metodzie wgMLST oprócz genów konserwatywnych badane są dodatkowo geny pomocnicze. Technika ta może być badaniem całogenomowym pod warunkiem poszerzenia badania o międzygenowe regiony DNA oraz pseudogeny. W odróżnieniu od metod analizy SNP, w analizach „gene-by-gene” oznacza się ujawnione allele, które następnie porównuje się pomiędzy badanymi mikroorganizmami [18, 56, 73].

### 3.2.4. Zalety i wady WGS

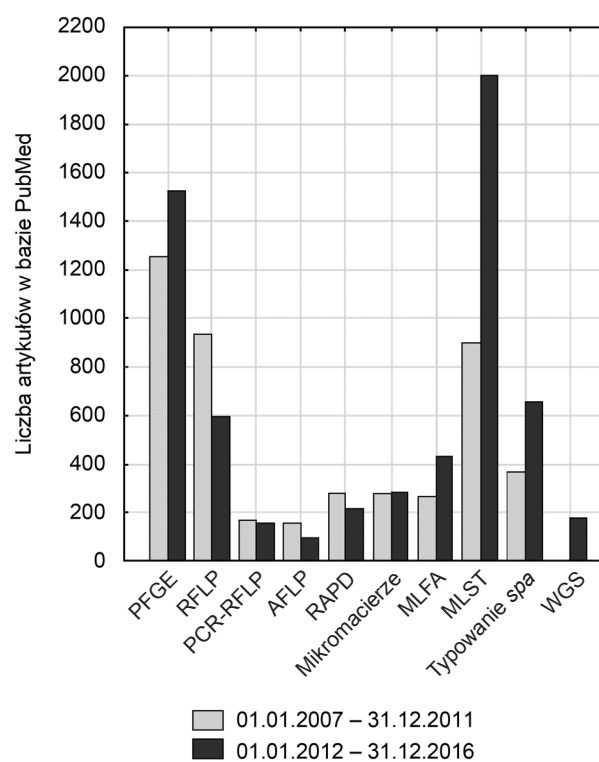
Współczynnik dyskryminacji WGS jest nieporównywalny z innymi technikami. Za pomocą badań wgSNP wykazano, że w genomie *S. aureus* opornego na metycylinę musi nastąpić średnio 467 pojedynczych mutacji, żeby różnica była wykrywana przy pomocy metody PFGE. Ponadto w badaniach z użyciem WGS udowodniono, że niektóre szczepy badane za pomocą metody PFGE uznawane za identyczne były w rzeczywistości różne [76]. Uzyskane za pomocą sekwencjonowania informacje są wysoce powtarzalne, a różnice pomiędzy szczepami mogą być dokładnie mierzone za pomocą programów bioinformatycznych [51]. Kolejną zaletą WGS jest możliwość odczytywania informacji z sekwencji nukleotydowej dotyczących cech wirulencji oraz wrażliwości na antybiotyki badanych bakterii. Jednakże obecność sekwencji kodującej dany czynnik nie zawsze musi oznaczać, że bakteria będzie go wytwarzać [50, 76].

Metoda typowania WGS nie jest pozbawiona wad. Ilość informacji generowanych podczas sekwencjonowania jest ogromna, przez co występuje problem z ich cyfrowym przechowywaniem. Pomimo, że pojemność nośników danych w komputerach wzrosła w ciągu ostatnich dwudziestu lat 10 000-krotnie, to badacze obawiają się, że jest to zbyt mało. Ilość informa-

cji generowanych podczas sekwencjonowania narasta dziś znacznie szybciej niż możliwość przechowywania danych. Dużym problemem jest również szybkość analizy badanych sekwencji. Jeżeli ilość informacji z sekwencjonowania będzie przyrastać w obecnym tempie lub szybciej, to nawet najszybsze komputery nie będą w stanie przetwarzać ich w efektywny sposób. Również dużym problemem jest wizualizacja wyników sekwencjonowania. Na diagramach, wykresach oraz grafikach niemożliwe będzie przedstawienie wszystkich informacji uzyskanych w skutek sekwencjonowania genomu. Koszt przeprowadzenia typowania WGS dzięki rozwojowi sekwenatorów nowych generacji jest coraz mniejszy. Jednak w przypadku wdrożenia techniki do rutynowej diagnostyki epidemiologicznej koszty WGS prawdopodobnie byłyby wciąż zbyt wysokie, ponieważ wiele małych i średnich laboratoriów medycznych nie posiada wystarczających środków na zakup tak drogiej aparatury. Kolejnym dużym problemem jest złożoność typowania WGS i obecnie niewielka ilość specjalistów potrafiących wykonać badanie oraz prawidłowo zinterpretować wyniki [51, 74]. Jednak ze względu na stały rozwój technologii sekwencjonowania uważa się, że w przyszłości sekwencjonowanie całego genomu może stać się „złotym standardem” nie tylko w typowaniu szczepów bakteryjnych, ale również w diagnostyce mikroorganizmów.



Rys. 1. Publikacje naukowe wykorzystujące metody fenotypowe  
Analiza liczby publikacji naukowych dla metod fenotypowych wykorzystywanych w typowaniu bakterii na podstawie danych zawartych w bazie PubMed w dwóch podanych przedziałach czasowych.



Rys. 2. Publikacje naukowe wykorzystujących metody genotypowe  
Analiza liczby publikacji naukowych dla metod genotypowych wykorzystywanych w typowaniu bakterii na podstawie danych zawartych w bazie PubMed w dwóch podanych przedziałach czasowych.

#### 4. Popularność metod typowania bakterii w badaniach biomedycznych na podstawie analizy bazy PubMed

W celu sprawdzenia częstości wykorzystania różnych metod typowania bakterii w ostatnich 10 latach w badaniach biomedycznych wykorzystano bibliograficzną bazę danych z dziedziny medycyny i nauk pokrewnych (PubMed). W wyszukiwarce bazy w opcjach zaawansowanych wpisano kombinacje słów kluczowych na podstawie pracy Sabat i wsp. [74]. Wykorzystano następujące kombinacje słów kluczowych dla metod fenotypowych: biotyping [AND] typing, serotyping [AND] typing, phage typing, susceptibility profile [AND] typing, MLEE [AND] typing, MALDI-TOF MS [AND] typing; oraz dla metod genotypowych: PFGE [AND] typing, RFLP [AND] typing, PCR-RFLP [AND] typing, AFLP [AND] typing, RAPD [AND] typing, microarray [AND] typing, MLVA [AND] typing, MLST [AND] typing, SLST [AND] typing

oraz WGS [AND] typing. Przyjęto, że zainteresowanie daną metodą rośnie, gdy liczba publikacji naukowych w danym przedziale czasowym jest większa niż w poprzednim przedziale czasowym. Przeanalizowano wszystkie typy publikacji naukowych w dwóch przedziałach czasowych: od 01.01.2007 do 31.12.2011 roku oraz od 01.01.2012 do 31.12.2016 roku.

Ilości wyników uzyskanych podczas przeszukiwania bazy PubMed świadczą, że metody genotypowe były częściej opisywane w publikacjach niż metody fenotypowe. Na podstawie analizowanych publikacji naukowych dla metod fenotypowych w typowaniu bakterii stwierdzono, że w latach 2007–2011 i 2012–2016 w badaniach najczęściej opisywano odpowiednio metody typowania fagowego i MALDI-TOF MS (Rys. 1). Ponadto odnotowano wzrost zainteresowania metodami MALDI-TOF MS i analizą profili lekowrażliwości, natomiast spadek metodami MLEE i typowania fagowego. Jednakże w przypadku analizy profili lekowrażliwości według naszej analizy

Tabela I  
Porównanie różnych metod wykorzystywanych w typowaniu mikroorganizmów

Metoda typowania szczepów	Potencjał różnicujący	Czas wykonania <sup>1</sup> (dni)	Enzymy restrykcyjne (ERs)	Startery	Najważniejsza aparatura	Najważniejsze materiały lub odczynniki
Biotypowanie	niski	1	brak	brak	brak	testy biochemiczne
Analiza profili lekowrażliwości	niski	1	brak	brak	brak	krążki z antybiotykami, e-testy
Typowanie fagowe	średni	1	brak	brak	brak	zestaw fagów do typowania
MLEE	średni/wysoki	kilka dni	brak	brak	aparat do elektroforezy	bufory i roztwory barwiące
MALDI-TOF MS	wysoki	1	brak	brak	spektrometr MALDI-TOF MS	brak informacji
REA-PFGE	wysoki	2–4	rzadko tnące	brak	komora PFGE, moduły zasilający i chłodzący	ERs, proteazy
PCR-RFLP	średni	1	często tnące	startery flankujące wskazaną sekwencję	termocykler	ERs, startery, polimeraza
AFLP	wysoki	2	para dwóch różnych ERs	startery selektywne	termocykler	ERs, ligaza, adaptory, startery, polimeraza
RAPD	wysoki	1	brak	startery arbitralne (8–12 nt)	termocykler	startery, polimeraza
CHIP DNA	wysoki	1–2	często tnące	brak	stacja przygotowania DNA i odczytu mikromacierzy	zestaw do izolacji i znakowania DNA, CHIP-DNA
MLVA	wysoki	1	brak	startery flankujące sekwencję VNTR	termocykler	startery, polimeraza
MLST i SLST	wysoki	1–2	brak	startery flankujące sekwencję genów housekeeping	sekwenator	startery, polimeraza i zależne od używanego sekwenatora
WGS	bardzo wysoki	1–2	brak	brak	sekwenator	zależne od używanego sekwenatora

<sup>1</sup> Czas wykonania badania liczony od momentu wyhodowania bakterii na podłożu

duże zainteresowanie tą metodą wynika z faktu częstego wykorzystywania tej techniki do charakteryzowania szczepów, a nie ze względu na jej efektywność w typowaniu mikroorganizmów. Natomiast analizując wykorzystanie metod genotypowych w typowaniu bakterii zauważono, że w latach 2007–2011 i 2012–2016 najczęściej stosowano odpowiednio metody PFGE i MLST (Rys. 2). Stwierdzono także wzrost zainteresowania badaczy metodami genotypowymi w typowaniu bakterii, w tym metodami PFGE, MLST oraz WGS.

## 5. Podsumowanie

Typowanie szczepów mikroorganizmów jest szczególnie ważne w przypadku wykrywania epidemii, określenia dróg oraz wektorów umożliwiających szerzenie się patogenów. W ciągu ostatnich pięćdziesięciu lat opracowano wiele technik umożliwiających różnicowanie szczepów mikroorganizmów. Wśród technik typowania patogenów wyróżniono metody fenotypowe i genotypowe. Metody fenotypowe w porównaniu do metod molekularnych posiadają często dużo niższy wskaźnik dyskryminacji oraz konkordancji co może spowodować, że nie będą w stanie potwierdzić lub zaprzeczyć istnieniu epidemii na danym obszarze. Przewagą metod fenotypowych nad genotypowymi może być fakt, że obecność sekwencji kodujących dane białko nie musi oznaczać, że jest ono produkowane. Pomimo, że w wielu przypadkach metody fenotypowe nie są wystarczające do efektywnego przeprowadzenia dochodzenia epidemiologicznego, to wciąż mogą być przydatne w opisywaniu badanych epidemii. Metody genotypowe ze względu na dużą siłę różnicowania szczepów są dziś rutynowo używane w diagnostyce epidemiologicznej, jednak ich wykorzystanie wiąże się z wyższymi kosztami badania niż w przypadku innych technik. W tabeli I porównano omawiane metody typowania bakterii. Prawdopodobnie w przyszłości obecnie stosowane metody typowania zostaną zastąpione przez nowsze techniki, w tym analizę białek za pomocą spektroskopii masowej oraz sekwencjonowanie całych genomów bakteryjnych. Jednak wysoka cena urządzeń koniecznych do przeprowadzenia badań ogranicza jej przydatność w rutynowej diagnostyce. Prawdopodobnie problem ten w niedalekiej przyszłości zostanie wyeliminowany ze względu na spadek cen zarówno sekwencjonowania, jak i aparatury wykorzystywanej do tego celu.

## Piśmiennictwo

- Allegranzi B., Pittet D. i wsp.: Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *Lancet*, **15**, 228–241 (2011)
- Anderson E.S., Ward L.R., Saxe M.J., de Sa J.D.: Bacteriophage-typing designations of *Salmonella* Typhimurium. *J. Hyg. (Lond)*, **78**, 297–300 (1977)
- Armengaud J.: Next-generation proteomics faces new challenges in environmental biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **38**, 174–182 (2016)
- Ashayeri-Panah M., Eftekhar F., Ghamsari M.M., Parvin M., Feizabadi M.M.: Genetic profiling of *Klebsiella pneumoniae*: comparison of pulsed field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA. *Braz. J. Microbiol.* **44**, 823–828 (2013)
- Baggesen D.L., Sgesen G., Nielsen E.M., Wegener H.C.: Phage typing of *Salmonella* Typhimurium – is it still a useful tool for surveillance and outbreak investigation? *Euro Surveill.* **15**, 19471 (2010)
- Bannerman T.L., Hancock G.A., Tenover F.C., Miller J.M.: Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 551–555 (1995)
- Barbaro M., Bonfiglio A., Raffo L., Alessandrini A., Facci P., Barak I.: Fully electronic DNA hybridization detection by a standard CMOS biochip. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **118**, 41–46 (2006)
- Barker R.M., Old D.C.: The usefulness of biotyping in studying the epidemiology and phylogeny of salmonellae. *J. Med. Microbiol.* **29**, 81–88 (1989)
- Berthouly-Salazar C., Mariac C., Couderc M., Pouzadoux J., Floc'h J.B., Vigouroux Y.: Genotyping-by-sequencing snp identification for crops without a reference genome: using transcriptome based mapping as an alternative strategy. *Frontiers in Plant Sci.* **7**, 777 (2016)
- Boerlin P., Bille J. i wsp.: Typing *Candida albicans* oral isolates from human immunodeficiency virus-infected patients by multilocus enzyme electrophoresis and DNA fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 1235–1248 (1996)
- Boughton P.: Whole genome MLST analysis. Scientistlive, <http://www.scientistlive.com/content/whole-genome-mlst-analysis> (09.03.2017)
- Bumgarner R.: DNA microarrays: Types, Applications and their future. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **101**, 22.1.1–22.1.11 (2013)
- Caierão J., Paiva J.A., Sampaio J.L., Silva M.G., Santos D.R., Coelho F.S., Fonseca Lde S., Duarte R.S., Armstrong D.T., Regua-Mangia A.H.: Multilocus enzyme electrophoresis analysis of rapidly-growing mycobacteria: an alternative tool for identification and typing. *Int. J. Infect. Dis.* **42**, 11–16 (2016)
- Centers for Disease Control and Prevention: Multiple Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis (MLVA), <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/mlva.html> (02.01.2016)
- Chen Y., Yu Y. i wsp.: Development of an extended multilocus sequence typing for genotyping of *Brucella* isolates. *J. Microbiol. Methods*, **86**, 252–254 (2011)
- Colodner R., Bisharat N. i wsp.: Identification of the Emerging Pathogen *Vibrio vulnificus* Biotype 3 by Commercially Available Phenotypic Methods. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 4137–4140 (2004)
- Coyne S., Guigon G., Courvalin P., Périchon B.: Screening and Quantification of the Expression of Antibiotic Resistance Genes in *Acinetobacter baumannii* with a Microarray. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 333–340 (2010)
- de Been M., Willems R.J. i wsp.: Core genome multilocus sequence typing scheme for high-resolution typing of *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* **53**, 3788–3797 (2015)
- De La Higuera A., Gutiérrez J., Liébana J., Garcia-Mendoza A., Castillo A.: A new biotyping method for *Streptococcus mutans* with the API ZYM system. *Clin. Microbiol. Infect.* **5**, 88–91 (1999)

20. Devriese L.A.: A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from animal species. *J. Appl. Bacteriol.* **56**, 215–220 (1984)
21. Duim B., Savelkoul P.: Typing of bacteria using Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) analysis (w) Experimental approaches for assessing genetic diversity among microbial pathogens, red. A. van Belkum, B. Duim, J.P. Hays, WET, Wageningen, 2003, s. 83–84
22. Dworżański J.P.: Bottom-Up Proteomics Methods for Strain-Level Typing and Identification of Bacteria (w) Applications of Mass Spectrometry in Microbiology, red. P. Demirev, T.R. Sandrin, Springer International Publishing, Switzerland, 2016, s. 114
23. European Centre for Disease Prevention and Control: Healthcare-associated infections, [http://ecdc.europa.eu/en/health-topics/Healthcare-associated\\_infections/Pages/index.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/health-topics/Healthcare-associated_infections/Pages/index.aspx) (29.11.2016)
24. European Centre for Disease Prevention and Control: Setting breakpoints, [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/eucast\\_setting\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/eucast_setting_breakpoints/) (28.12.2016)
25. Minharmo S., Lage A.P. i wsp.: Biotyping and Genotyping (MLVA16) of *Brucella abortus* Isolated from Cattle in Brazil, 1977 to 2008. *PLoS ONE*, **8**, e81152 (2013)
26. Fitzgerald J.R., Meaney W.J., Hartigan P.J., Smyth C.J., Kapur V.: Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Epidemiol. Infect.* **119**, 261–269 (1997)
27. Fothergill J.L., Walshaw M.J., Winstanley C.: Transmissible strains of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infections. *Eur. Respir. J.* **40**, 227–238 (2012)
28. Gangiredla J., Jackson S.A., Elkins C.A., Feng P. C.: Novel microarray design for molecular serotyping of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from fresh produce. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 4677–4682 (2014)
29. Giedrys-Kalemba S.: Typowanie molekularne w dochodzeniu epidemiologicznym (w) Zakażenia szpitalne podręcznik dla zespołów kontroli zakażeń, red P. B. Heczko, J. Wójkowska-Mach, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2009, s. 113–114
30. Goering R.V.: Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect. Genet. Evol.* **10**, 866–875 (2010)
31. Green E., Ob L.C., Okoh A.I., Nchabeleng M., Villiers B.E., Letsoalo T., Hoosen A.A., Bessong P.O., Ndip R.N.: IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Typing of Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains from Northeast South Africa. *JHPN*. **31**, 1–10 (2013)
32. Haquea F., Lib J., Wuc H.C., Liangd X.J.: Peixuan Guoa Solid-state and biological nanopore for real-time sensing of single chemical and sequencing of DNA. *Nano Today*, **8**, 56–74 (2013)
33. Heather J.M., Chain B.: The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, **107**, 1–8 (2016)
34. Huang S.S., Platt, R. i wsp.: Automated Detection of Infectious Disease Outbreaks in Hospitals: A Retrospective Cohort Study. *PLoS Medicine*, **7**, e1000238 (2010)
35. Hunter P.R., Gaston M.A.: Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 2465–2466 (1988)
36. Hwang M.T., Landon P.B., Lee J., Choi D., Mo A.H., Glinsky G., Lal R.: Highly specific SNP detection using 2D graphene electronics and DNA strand displacement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 7088–7093 (2016)
37. Illumina: Illumina Sequencing Technology, [http://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight\\_sequencing.pdf](http://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf) (02.01.2016)
38. Illumina: Illumina Sequencing Technology, <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/hiseq-x.html> (06.03.2017)
39. International Fungal Multi Locus Sequence Typing Database, [mlst.mycologylab.org](http://mlst.mycologylab.org) (02.01.2016)
40. Jackson S.A., Patel I.R., Barnaba T., LeClerc J.E., Cebula T.A.: Investigating the global genomic diversity of *Escherichia coli* using a multi-genome DNA microarray platform with novel gene prediction strategies. *BMC Genomics*, **12**, 349 (2011)
41. Jia J., Bi Z.W., Chen Y.Z., Hou P.B., Zhang M., Shao K., Bi Z.Q.: Antibiotic resistance and molecular typing of *Listeria monocytogenes* from foods in Shandong province from 2009 to 2010. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*, **45**, 1065–1067 (2011)
42. Jolley K.A., Maiden M.C.J.: Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain. *Microbiology*, **158**, 1005–1015 (2012)
43. Jursa-Kulesza J., Kordek A., Kopron K., Wojciuk B., Giedrys-Kalemba S.: Molecular studies of an impetigo bullosa epidemic in full-term infants. *Neonatology*, **96**, 61–68 (2009)
44. Karlsson E., Lärkeryd A., Sjödin A., Forsman M., Stenberg P.: Scaffolding of a bacterial genome using MinION nanopore sequencing. *Sci. Rep.* **5**, 11996 (2015)
45. Koeleman J.G.M., Stoof J., Biesmans D.J., Savelkoul P.H.M., Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E.: Comparison of Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis, Random Amplified Polymorphic DNA Analysis, and Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting for Identification of *Acinetobacter* Genomic Species and Typing of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 2522–2529 (1998)
46. Kostić T., Sessitsch A.: Microbial diagnostic microarrays for the detection and typing of food- and water-borne (bacterial) pathogens. *Microarrays*, **1**, 3–24 (2012)
47. Krawczyk B., Leibner-Ciszak J., Stojowska K., Kur J.: The new LM-PCR/shifter method for the genotyping of microorganisms based on the use of a class IIS restriction enzyme and mediated PCR. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 1366–1344 (2011)
48. Krawczyk B.: Diagnostyka Molekularna w zakażeniach szpitalnych. *Post. Mikrobiol.* **46**, 367–378 (2007)
49. Kumari, N., Thakur S.K.: Randomly amplified polymorphic DNA-a brief review. *AJAVS*. **9**, 6–13 (2014)
50. Kwong J.C., McCallum N., Sintchenko V., Howden B.P.: Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. *Pathology*, **47**, 199–210 (2015)
51. Land M., Ussery D.W. i wsp.: Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Funct. Integr. Genomics*, **15**, 141–161 (2015)
52. Leggett R.M., MacLean D.: Reference-free SNP detection: dealing with the data deluge. *BMC Genomics*, **15**, S10 (2014)
53. Li W., Raoult D., Fournier P.E.: Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**, 892–916 (2009)
54. Lindstedt B.A., Åkerström S. i wsp.: Use of multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) in eight European countries, 2012. *Euro Surveill.* **18**, 20385 (2013)
55. Loy J.D., Clawson M.L.: Rapid typing of *Mannheimia haemolytica* major genotypes 1 and 2 using MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods*. **136**, 30–33 (2017)
56. Maiden M.C., Spratt, B.G. i wsp.: Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 3140–3145 (1998)
57. Maiden M.C.J., McCarthy N.D.: MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nature Reviews Microbiology*, **11**, 728–736 (2013)
58. Microrao: Typing Methods, <http://microrao.com/micronotes/typing.pdf> (28.12.2016)
59. Międzobrodzki J., Małachowa N., Markiewski T., Białecka A., Kasprzowicz A.: Differentiation of *Staphylococcus aureus* isolates based on phenotypical characters. *Postępy Hig. Med. Dośw.* **30**, 322–327 (2008)

60. MLST, [www.mlst.net](http://www.mlst.net) (02.01.2016)
61. Munson E.L., Doern G.V.: Comparison of Three Commercial Test Systems for Biotyping *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae*. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 4051–4053 (2007)
62. Nanoporetech: Store, <https://store.nanoporetech.com/devices.html> (02.03.2017)
63. National Institute for Public Health and the Environment (RIVM): Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis, <http://www.mlva.net/> (02.01.2017)
64. Nowakiewicz A., Ziółkowska G., Zięba P., Gnat S., Trościańczyk A., Adaszek, Ł.: Characterization of Multidrug Resistant *E. faecalis* Strains from Pigs of Local Origin by ADSRRS-Fingerprinting and MALDI-TOF MS; Evaluation of the Compatibility of Methods Employed for Multidrug Resistance Analysis. *PLoS ONE*, **12**, e0171160 (2017)
65. Ota M., Asamura H., Oki T., Sada M.: Restriction enzyme analysis of PCR products. *Methods Mol. Biol.* **578**, 405–414 (2009)
66. Parizad E.G., Valizadeh A.: The Application of Pulsed Field Gel Electrophoresis in Clinical Studies. *JCRD*, **10**, DE01-DE04 (2016)
67. Pérez-Losada M., Cabezas P., Castro-Nallar E., Crandall K.A.: Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infect. Genet. Evol.* **16**, 38–53 (2013)
68. Pingault N.M., Riley T.V.: *Moraxella* (w) Molecular Typing in Bacterial Infections, red. I. Filippis, M.L. McKee, Springer, New Delhi, 2013, s. 214
69. Public databases for molecular typing and microbial genome diversity, [www.pubmlst.org](http://www.pubmlst.org) (02.01.2016)
70. Ramírez-Estrada S., Borgatta B., Rello J.: *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia management. *Infect. Drug Resist.* **9**, 7–18 (2016)
71. Rhoads A., Au K.F.: PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, **13**, 278–289 (2015)
72. Rumore J.L., Tschetter L., Nadon C.: The Impact of Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis on PulseNet Canada *Escherichia coli* O157:H7 Laboratory Surveillance and Outbreak Support, 2008–2012. *Foodborne Pathog. Dis.* **13**, 255–261 (2016)
73. Sabat A.J., Budimir A., Nashev D., SheLeSh R., van Dijk J.M., Laurent F., Grundmann H., Friedrich A.W.: Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill.* **18**, 20380 (2013)
74. Sabat A.J., Friedrich A.W. i wsp.: Complete-genome sequencing elucidates outbreak dynamics of CA-MRSA USA300 (ST8-spa t008) in an academic hospital of Paramaribo, Republic of Suriname. *Sci. Rep.* **7**, 41050 (2017)
75. Saghrouni F., Ben Abdeljelil J., Boukadida J., Ben Said M.: Molecular methods for strain typing of *Candida albicans*: a review. *J. Appl. Microbiol.* **114**, 1559–1574 (2013)
76. Salipante S.J., SenGupta D.J., Cummings L.A., Land T.A., Hoogstraal D.R., Cookson B.T.: Application of whole-genome sequencing for bacterial strain typing in molecular epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* **53**, 1072–1079 (2015)
77. Sandrin T.R., Goldstein J.E., Schumaker S.: MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. *Mass Spectrom. Rev.* **32**, 188–217 (2013)
78. Schmieger H.: Molecular survey of the Salmonella phage typing system of Anderson. *J. Bacteriol.* **181**, 1630–1635 (1999)
79. Schwartz D.C., Cantor C.R.: Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, **37**, 67–75 (1984)
80. Selander R.K., Caugant D.A., Ochman H., Musser J.M., Gilmour M.N., Whittam T.S.: Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 873–884 (1986)
81. Sękowska A., Gospodarek E., Kamińska D.: Antimicrobial susceptibility and genetic similarity of ESBL-positive *Klebsiella pneumoniae* strains. *Arch. Med. Sci.* **8**, 993–997 (2012)
82. Shao W., Zhang M., Lam H., Lau, S.C.K.: A peptide identification-free, genome sequence-independent shotgun proteomics workflow for strain-level bacterial differentiation. *Sci. Rep.* **5**, 14337 (2015)
83. Steglich M., Nübel U.: The challenge of detecting indels in bacterial genomes from short-read sequencing data. *J. Biotechnol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.02.026> (2017)
84. Stelling J., Platt, R. i wsp.: Automated use of WHONET and SaTScan to detect outbreaks of *Shigella* spp. using antimicrobial resistance phenotypes. *Epidemiol. Infect.* **138**, 873–883 (2010)
85. Straus L., Mellmann, A., i wsp.: Detecting *Staphylococcus aureus* Virulence and Resistance Genes: a Comparison of Whole-Genome Sequencing and DNA Microarray Technology. *J. Clin. Microbiol.* **54**, 1008–1016(2016)
86. Struelens M.J.: Molecular epidemiologic typing systems of bacterial pathogens: current issues and perspectives. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **93**, 581–585 (1998)
87. Suffredini E., Lopez-Joven C., Maddalena L., Croci L., Roque A. (2011). Pulsed-field gel electrophoresis and PCR characterization of environmental *Vibrio parahaemolyticus* strains of different origins. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 6301–6304 (2011)
88. Sydnor E.R., Perl T.M.: Hospital Epidemiology and Infection Control in Acute-Care Settings. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**, 141–173 (2011)
89. Tenover F., Arbeit R., Goering R., Mickelsen P., Murray B., Pershing D., Swaminathan B.: Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2233–2239 (1995)
90. Thompson J.F., Milos, P.M. The properties and applications of single-molecule DNA sequencing. *Genome Biol.* **12**, 217 (2011)
91. Van Belkum A., Struelens M. i wsp.: Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 1–46 (2007)
92. Viana D., Penadés J.R. i wsp.: A single natural nucleotide mutation alters bacterial pathogen host-tropism. *Nat. Genet.* **47**, 361–366 (2015)
93. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Pot J., Peleman J., Kuiper M.: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **23**, 4407–4414 (1995)
94. Voskresenskaya E., Savin C., Leclercq A., Tseneva G., Carniel E.: Typing and Clustering of *Yersinia pseudotuberculosis* Isolates by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Using Insertion Sequences. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 1978–1989 (2014)
95. Wasyl D., Elsedawy A., Lukinmaa S.: PulseNet Europe międzynarodowa sieć typowania molekularnego w nadzorze epidemiologicznym chorób szerszących się drogą pokarmową. *Medycyna Wet.* **64**, 123–126 (2008)
96. Williams M.L., LeJeune J.T.: Phages and bacterial epidemiology (w) Bacteriophages in health and disease, red. P. Hyman, S.T. Abedon, Centre for Agriculture and Bioscience International, Wallingford, 2012, s. 78
97. Wolska K., Szweda P.: Genotyping Techniques for Determining the Diversity of Microorganisms (w) Genetic Diversity in Microorganisms, red. M. Caliskan, InTech, 2012, 53–55 (2012)
98. Wolter D.J., Hanson N.D., Lister P.D.: Insertional inactivation of *oprD* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* **1**, 137–143 (2004)
99. World Health Organisation: Report on the Burden of Endemic Health Care-Associated Infection Worldwide, A systematic review of the literature, [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/80135/1/9789241501507\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/80135/1/9789241501507_eng.pdf) (12.03.2017)

100. World Health Organisation: WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed, <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/> (12.03.2017)
101. Xu F.L., Guo Y.C., Wan H.X., Fu P., Zeng H.W., Li Z.G., Pei X.Y., Liu X.M.: PFGE genotyping and antibiotic resistance of *Lactobacillus* distributed strains in the fermented dairy products. *Ann. Microbiol.* **62**, 255–262 (2012)
102. Ziółkowski P.A., Babula-Skowrońska D., Kaczmarek M., Cieśla A., Sadowski J.: Sekwencjonowanie porównawcze genomów: generowanie markerów genetycznych typu INDEL i SNP. *Biotechnologia*, **4**, 53–68 (2010)
103. Zolfo M., Tett A., Jousson O., Donati C., Segata N.: MetaMLST: multi-locus strain-level bacterial typing from metagenomic samples. *Nucleic Acids Res.* **45**, e7 (2016)





Warszawa, 08.06.2017 r.

Szanowni Państwo Członkowie PTM

Poniżej przekazujemy szereg informacji o naszej aktualnej działalności.

1. Został uruchomiony system rejestracji uczestników Konferencji „90 lat PTM”.

**Zmianie uległy niektóre terminy związane z Konferencją.**

**Do 19.06.br. jest ustalony nowy termin nadsyłania abstraktów na naszą Konferencję.**

**Zniżka na opłatę rejestracyjną obowiązuje do 07 lipca br.**

Zależy nam, aby w konferencji uczestniczyły zwłaszcza osoby wybrane w Oddziałach jako delegaci na Walne Zgromadzenie Delegatów PTM w Bydgoszczy. Zgodnie z obowiązującym Statutem PTM osoby, które otrzymały mandat delegata pełnią swoją funkcję przez 4 lata, czyli cały okres trwania kadencji ZG PTM. Osoby te zachowują więc swój mandat na Nadzwyczajne Walne Zgromadzenie Delegatów w Krakowie, na którym będziemy zmieniać Statut PTM. Bardzo zachęcamy do udziału w Konferencji

2. Zwróciliśmy się do firmy EthicalMedTech – Conference Vetting System ([www.ethicalmedtech.eu](http://www.ethicalmedtech.eu)) o umieszczenie naszej Konferencji na ich platformie, co miało świadczyć o transparentności i etyczności postępowania podczas organizacji naszej Konferencji. Podnosiły tę sprawę firmy BioMérieux oraz Izba Producentów i Dystrybutorów Diagnostyki Laboratoryjnej Związków Pracodawców. Z otrzymanej odpowiedzi wynika jednak, że na razie do systemu nie są wprowadzane konferencje krajowe i tym samym sprawa jest nieaktualna. Wobec tego ponownie poprosiliśmy powyższe firmy o rozważenie możliwości wsparcia finansowego naszego Towarzystwa, poprzez zostanie Członkiem Wspierającym PTM, zamieszczenie reklam związanych z mikrobiologią w czasopiśmie PTM oraz udział jako sponsorzy lub wystawcy na naszej Konferencji.

3. Pani dr hab. Jolanta Solecka prof. NIZP – PZH wyraziła zgodę na objęcie funkcji Redaktora Naczelnego Polish Journal of Microbiology (PJM) (Editor-in-Chief). Pani prof. dr hab. Elżbieta Anna Trafny – członek Prezydium ZG PTM, zgodziła się działać w Redakcji PJM jako Zastępca Redaktora Naczelnego (Deputy Editor). Obsługa redakcji PJM będzie prowadzona przez zespół prof. J. Soleckiej w NIZP – PZH. Przekazanie spraw przez dotychczasowy zespół i objęcie obowiązków redakcji PJM przez nowy zespół osób odbywać się będzie stopniowo w ciągu kilku miesięcy br.

**Prosimy o przesyłanie do biura PTM propozycji osób ze stopniem naukowym doktora z Państwa Oddziałów, którzy mogliby podjąć się recenzowania manuskryptów przesyłanych do działów PJM:** Environmental Microbiology, Medical Microbiology, Microscopic Fungi, Molecular Microbiology, Virology.

4. W czerwcu br. zacznie działać nowa strona internetowa kwartalnika Postępy Mikrobiologii, po czym przystąpimy do porządkowania strony internetowej PJM.
5. Główna Komisja Rewizyjna, po otrzymaniu wyjaśnień, przyjęła raport finansowy PTM za 2016 r. przygotowany przez firmę Unirach z Bydgoszczy.
6. W dniu 07.06.br. zorganizowaliśmy zebranie Prezydium ZG PTM w trybie korespondencyjnym, aby przyjąć szereg uchwał, w tym o przyjęciu 20 nowych członków zwyczajnych PTM, Srebrnego Członka Wspierającego PTM oraz o objęciu patronatem PTM II Ogólnopolską Konferencję „Działania przeciwdrobnoustrojowe”.
7. Trzeba rozważyć problem obniżenia kosztów wydawania czasopism PM i PJM, wydaje się celowe zrezygnowanie z obligatoryjnego rozsyłania zeszytów czasopism do członków PTM. Dysponujemy internetowymi, aktualnie poprawianymi, wydaniem PM i PJM, do których wszyscy mają dostęp za darmo. W przypadku wersji papierowych zeszytów czasopism – ich druk i wysyłka są bardzo kosztowne. Zmniejszenie nakładu do 120 drukowanych egzemplarzy rozsyłanych do bibliotek oraz członków Rad Redakcyjnych i Redakcji czasopism pozwoli na zmianę formy druku na cyfrowy – tańszy. Zmiany te można by wprowadzić od nowego roku. Jeżeli ktoś chciałby otrzymywać wersję papierową zeszytów, już nie w ramach rocznej składki PTM, lecz w drodze prenumeraty, wnosiłby dodatkową opłatę, która obniżona byłaby dla członków PTM. Sprawa będzie omawiana na Nadzwyczajnym Walnym Zgromadzeniu Delegatów, na razie jest sygnalizowana członkom ZG PTM do przemyślenia.

Nieopisana w Statucie zasada darmowego rozsyłania zeszytów czasopism do członków PTM obowiązywała od dawna i była dużym, ale kosztownym przywilejem. Obecnie Towarzystwa nie stać na tę formę, a w dobie dostępu do wersji internetowej, traci również sens drukowania zeszytów. Wiele czasopism przechodzi obecnie na ogólnie dostępne wersje elektroniczne.

8. Będziemy się kontaktować z Institute of Scientific Information (ISI) w Filadelfii (USA) zawiadującą przyznawaniem Impact Factor, aby uzyskać informacje, co możemy zmienić w formie naszych czasopism, aby nie utracić aktualnego współczynnika IF, a wprowadzić zmiany zmierzające do zmniejszenia kosztów wydawniczych, np. wydania tylko internetowe lub zmniejszenia nakładu tylko do 120 egzemplarzy (tańszy druk cyfrowy).
9. Rozważany jest pomysł, aby w *Postęпах Mikrobiologii* zamieszczać artykuły w języku angielskim, autorów krajowych i zagranicznych, co powinno poprawić cytowalność tego czasopisma.
10. Rozważany jest pomysł, aby podczas wszystkich konferencji współorganizowanych przez PTM, członkowie naszego Towarzystwa otrzymywali zniżki na opłaty rejestracyjne. Obecnie ma to miejsce w przypadku konferencji „90 lat PTM” i konferencji „Mikrobiologia Farmaceutyczna”. Organizatorzy przyszłych konferencji z udziałem PTM proszeni są o przemyślenie przedstawionej propozycji.
11. Rozważany jest pomysł, aby w przypadku pozyskania Członka Wspierającego PTM czy sponsora, przez dany Oddział Terenowy PTM, połowa środków finansowych przekazana przez Członka Wspierającego PTM lub sponsora mogła być wykorzystana na potrzeby statutowe przez Oddział PTM, który pozyskał dodatkowe środki finansowe.
12. Bardzo się cieszymy, że firma Aesculap Chifa Sp. z o.o., ul. Tysiąclecia 14, 64-300 Nowy Tomyśl, przystąpiła do PTM jako Srebrny Członek Wspierający PTM.
13. Zauważalny jest w ostatnim czasie wzrost płacenia zaległych składek PTM, za co bardzo dziękujemy.  
Liczby osób płacących składkę PTM za dany rok: do 24.03.br. wynosiły: 2015 r. – 646, 2016 r. – 674, 2017 r. – 179. a na dzień 05.06.br. wynoszą – i wzrosły odpowiednio: 2015 r. – 669 (+ 23), 2016 r. – 735 (+ 61), 2017 r. – 524 (+ 345).
14. Informujemy, że laureatem tegorocznej nagrody FEMS-Lwoff Award został Pan prof. Jeff Errington, Dyrektor The Centre for Bacterial Cell Biology w Newcastle University.
15. Złożyliśmy wniosek do FEMS o dofinansowanie Konferencji „90 lat PTM” w ramach FEMS Meeting Organizer Grant.
16. Pani prof. Beata Sadowska poinformowała, iż przygotowała wstępny dokument zawierający stanowisko PTM oraz propozycję rozwiązań kwalifikacyjnych dla absolwentów kierunku Mikrobiologia ubiegających się o wpis na Listę Diagnostów Laboratoryjnych, który został przesłany Pani dr J. Jursie-Kulaszy oraz Pani dr E. Stefaniuk z prośbą o przeanalizowanie.
17. Na naszą prośbę Redaktorzy Naczelni czasopism *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* oraz *Przegląd Epidemiologiczny* wyrazili zgodę na udostępnienie materiałów archiwalnych ze swoich czasopism, dotyczących zasłużonych polskich mikrobiologów. Materiały te zostaną zamieszczone na stronie internetowej PTM w zakładce Historia > Wspomnienia o Mikrobiologach, za co bardzo dziękujemy.
18. Na stronie internetowej PTM zamieszczane są informacje przekazywane przez Zarządy Oddziałów Terenowych PTM dotyczące lokalnej działalności. Prosimy o zapoznanie się ze stroną PTM, która jest na bieżąco aktualizowana.
19. Prężnie działa strona PTM na facebooku, liczba polubień przekroczyła wartość 300. Dziękujemy Paniom, które wprowadzają nowe informacje na stronę facebooka i stronę PTM.
20. Na przełomie maja i czerwca odbyła się VI Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Mikrobiologia Farmaceutyczna, współorganizowana przez PTM, na której omówiono zasady funkcjonowania Sekcji Mikrobiologia Farmaceutyczna. Na naszej stronie internetowej w zakładce Struktura > Sekcje znajdują się propozycje utworzenia szeregu Sekcji zajmujących się szczególnymi obszarami mikrobiologii. Osoby zainteresowane współpracą, wymianą informacji, doświadczeń i wiedzy w danych obszarach mikrobiologii mogą przystępować do danych sekcji – jednej lub kilku. Zachęcamy do włączania się w działalność tych Sekcji.

Pozdrawiamy serdecznie,

SEKRETARZ  
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów  
*A. Laudy*  
dr n. farm. Agnieszka F. Laudy

PREZES  
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów  
*Stefan Tyski*  
prof. dr hab. Stefan Tyski

**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-tej 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 i Uniwersytet Jagielloński.

Termin nadsyłania streszczenia plakatu: 19.06.2017 r.

Termin powiadomienia o akceptacji streszczenia: 26.06.2017 r.

Opłaty zjazdowe:

Osoby do 35 roku życia (w tym studenci) członkowie PTM

W terminie do dnia 07.07.2017 r.: 100 zł; w terminie po 07.07.2017 r.: 150 zł

Osoby do 35 roku życia (w tym studenci) nie będący członkami PTM – udział czynny

W terminie do dnia 07.07.2017 r.: 200 zł; w terminie po 07.07.2017 r.: 250 zł

Członkowie PTM

W terminie do dnia 07.07.2017 r.: 300 zł; w terminie po 07.07.2017 r.: 400 zł

Osoby nie będące członkami PTM

W terminie do dnia 07.07.2017 r.: 400 zł; w terminie po 07.07.2017 r.: 500 zł



**Konferencja BioMillenium 2017**  
**„Trendy i rozwiązania w biotechnologii i mikrobiologii”**,  
**Gdańsk, 6–8 września 2017 r.**

Szanowni Państwo

W imieniu Komitetu Organizacyjnego mamy zaszczyt zaprosić Państwa do udziału w Konferencji BioMillenium 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, molekularna

Konferencja rozpocznie się wykładem przedstawiającym sylwetkę, zainteresowania i osiągnięcia naukowe zmarłego w tym roku prof. hab. dr Józefa Kur, 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 BioMillenium 2017

Kontakt: 583 472 417 – sekretariat oraz 583 472 383; 583 476 412; 583 472 406; 583 472 302



**Mikrobiologia w Ochronie Zdrowia i Środowiska**  
**– MIKROBIOT 2017,**  
**Łódź, 19–21 września 2017 r.**

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 pod patronatem PTM



## II Ogólnopolska Konferencja „Działania przeciwdrobnoustrojowe” Bydgoszcz, 16.09.2017 r.

Katedra i Zakład Mikrobiologii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu wraz ze Stowarzyszeniem „Rozwój Mikrobiologii” organizują **II Ogólnopolską Konferencję „Działania przeciwdrobnoustrojowe”**.

Pragniemy spotkać się w szerokim gronie specjalistów, aby poznawać nowe możliwości, jak również ograniczenia działań przeciwdrobnoustrojowych oraz zagrożenia wynikające z obecności drobnoustrojów.

Powyższe zagadnienia są wyzwaniem dla współczesnej medycyny, farmacji, kosmetologii, higieny, epidemiologii i mikrobiologii. W związku z tym, tematyka Konferencji adresowana jest nie tylko do osób zajmujących się dezynfekcją i sterylizacją, ale także do osób związanych z produkcją żywności, leków, kosmetyków, mikrobiologów różnych specjalności oraz diagnostów laboratoryjnych, immunologów, epidemiologów i lekarzy.

Powyższe zagadnienia będą omawiane w aspekcie klinicznym, diagnostycznym i prewencyjnym. Przewidziliśmy dla Państwa trzy sesje naukowe:

1. Procesy dezynfekcji i sterylizacji w obszarze medycznym i przemysłowym
2. Działania przeciwdrobnoustrojowe w szpitalu i w warunkach polowych
3. Związki o działaniu przeciwdrobnoustrojowym oraz sesje plakatowe.

W ramach każdej sesji przewidziane są krótkie wystąpienia ustne uczestników.

### INFORMACJE O KONFERENCJI:

Aule A i B budynku REKTORATU  
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy  
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu  
85-067 Bydgoszcz, ul. Jagiellońska 13–15

Planowane rozpoczęcie rejestracji od godz. 9<sup>00</sup>

Katedra i Zakład Mikrobiologii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy  
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu  
Stowarzyszenie „Rozwój Mikrobiologii”  
85-094 Bydgoszcz, ul. Marii Skłodowskiej-Curie 9  
Telefony: Informacje ogólne – tel. 52 585 35 01, 52 585 38 38

Płatności – tel. 52 585 36 73 e-mail: [rozw\\_mikrob@cm.umk.pl](mailto:rozw_mikrob@cm.umk.pl)

do 31.07.2017 r. – 90 zł/osoba

od 01.08.2017 r. – 100 zł/osoba

Organizatorzy nie zapewniają noclegu, ani nie pokrywają kosztów przejazdu

Konferencja pod patronatem PTM



**IX OGÓLNOPOLSKA KONFERENCJA HYDROMIKROBIOLOGICZNA  
HYDROMICRO 2017:  
DROBNOUSTROJE – OSIĄGNIĘCIA I WYZWANIA  
17–19 września 2017, Olsztyn**

Szanowni Państwo!

Bardzo serdecznie zapraszamy na IX Ogólnopolską Konferencję Hydromikrobiologiczną, organizowaną w dniach od 17 do 19 września 2017 roku przez Katedrę Mikrobiologii Środowiskowej Wydziału Nauk o Środowisku Uniwersytetu Warmińsko Mazurskiego w Olsztynie. Będzie to dziewiąte ogólnopolskie spotkanie środowisk naukowych związanych z mikroorganizmami ekosystemów wodnych. Poprzednie spotkania odbywały się w: Słupsku-Ustce (2000), Toruniu (2002), Zielonej Górze-Łagowie (2004), Mikołajkach (2006), Warszawie-Wierzbie (2008), Gdańsku (2010), Wrocławiu (2013) oraz Gliwicach (2015).

Tematyka konferencji obejmuje: mikroorganizmy wód śródlądowych, podziemnych i morskich, mikroorganizmy w inżynierii środowiska, sanitarno-bakteriologiczne aspekty oczyszczania ścieków, transmisję mikroorganizmów patogennych drogą wodną, zanieczyszczenia biologiczne w systemach wodnych biobezpieczeństwo i bioremediację wód, diagnostykę organizmów wodnych, mikrobiologię przemysłową i biotechnologię.

Językiem konferencji jest język polski lub angielski. Zgłoszenia (w postaci wypełnionej karty zgłoszenia uczestnictwa – do pobrania ze strony [www.hydmicro2017.pl](http://www.hydmicro2017.pl)) należy przesłać do 30 maja 2017 roku na adres: [hydromicro@uwm.edu.pl](mailto:hydromicro@uwm.edu.pl). Streszczenia w języku polskim lub angielskim przygotowane wg schematu zamieszczonego na stronie Konferencji prosimy przesyłać drogą mailową do 30 czerwca 2017 roku. Konferencja odbędzie się w Olsztynie, w atrakcyjnie usytuowanym hotelu Omega.

W imieniu Komitetu Organizacyjnego  
Dr hab. Zofia Filipkowska, prof. UWM

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 uwagą objęty będzie problem uwarunkowanych środowiskowo chorób infekcyjnych i inwazyjnych, których czynnikami etiologicznymi 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 płamistemu.

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), Począjow i Krzemieniec (1 dzień) lub Kamieniec Podolski (2 dni), wycieczki te są płatne dodatkowo.

## 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:

7th 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.

[weigl2017@gmail.com](mailto: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.

Complete information is presented on the website: <http://www.cellbiol.lviv.ua/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](mailto:dmytruk@cellbiol.lviv.ua)

[dmytruk77@gmail.com](mailto: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](mailto:barska@cellbiol.lviv.ua)

#### CZLONKOWIE WSPIERAJĄCY PTM

##### Złoty Członek Wspierający PTM

od 27.03.2017 r.



Hygiene & Cleaning  
Solutions

HCS Europe – Hygiene & Cleaning Solutions  
ul. Warszawska 9a, 32-086 Węgrzce k. Krakowa  
tel. (12) 414 00 60, 506 184 673, fax (12) 414 00 66  
[www.hcseurope.pl](http://www.hcseurope.pl)

Firma projektuje profesjonalne systemy utrzymania czystości i higieny dla klientów o szczególnych wymaganiach higienicznych, m.in. kompleksowe systemy mycia, dezynfekcji, osuszania rąk dla pracowników służby zdrowia, preparaty do dezynfekcji powierzchni dla służby zdrowia, systemy sterylizacji narzędzi.

##### Srebrny Członek Wspierający PTM

od 07.06.2017 r.



Aesculap Chifa Sp. z o.o.  
ul. Tysiąclecia 14  
64-300 Nowy Tomyśl  
tel. (61) 44 20 100, fax (61) 44 23 936  
[www.chifa.com.pl](http://www.chifa.com.pl)

Aesculap Chifa Sp. z o.o. jest członkiem grupy B. Braun, jednej z wiodących na świecie firm medycznych, produkującej i dystrybuującej między innymi preparaty do antyseptyki rąk, skóry, błon śluzowych, do mycia i dezynfekcji wyrobów medycznych oraz powierzchni.



## SPIS TREŚCI

M. Pawlikowska-Warych, J. Palma, W. Deptuła – Chorobotwórczość chlamydii środowiskowych dla ludzi i zwierząt .....	265
K. Jas, U. Małolepsza – Podziemna komunikacja – nowe elementy szlaków sygnałowych arbuskularnej symbiozy mykoryzowej .....	275
D. Grondalska, W. Kmieciak – <i>Candida auris</i> – nowy patogen grzybiczy .....	282
A. Wysocka, A. Olszyna, I. Komorowska, M. Popowska – Nitrozwiązki aromatyczne – charakterystyka i metody biodegradacji .....	289
A. Kisiel, E. Kępczyńska – Chitynazy bakteryjne i ich wykorzystanie w biotechnologii .....	306
P. Krzyżek – Sekrecja pęcherzyków błonowych jako mechanizm promujący infekcje <i>H. pylori</i> .....	316
E. K. Jagusztyn-Krynicka, A.M. Banaś, M.J. Grzeszczuk – Strategie badań tiolowych oksydoreduktaz .....	326
T. Chmielewski, S. Tylewska-Wierzbanowska – Wrażliwość krętków <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato na antybiotyki <i>in vitro</i> .....	335
PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY	
M. Łyszcz, A. Gałązka – Genetyczne metody różnicowania mikroorganizmów w systemie gleba – roślina .....	341
M. Brzozowski, P. Kwiatkowski, D. Kosik-Bogacka, J. Jursa-Kulesza – Metody genotypowe i fenotypowe wykorzystywane w typowaniu drobnoustrojów do celów epidemiologicznych .....	353
KOMUNIKATY I INFORMACJE .....	367

## CONTENTS

M. Pawlikowska-Warych, J. Palma, W. Deptuła – Pathogenicity of environmental chlamydiae for humans and animals .....	265
K. Jas, U. Małolepsza – Underground communication – the new elements of signalling pathways of arbuscular mycorrhizal symbiosis .....	275
D. Grondalska, W. Kmieciak – <i>Candida auris</i> – emerging fungal pathogen .....	282
A. Wysocka, A. Olszyna, I. Komorowska, M. Popowska – Nitroaromatic compounds – characteristics and methods of biodegradation .....	289
A. Kisiel, E. Kępczyńska – Bacterial chitinases and their application in biotechnology .....	306
P. Krzyżek – Secretion of outer membrane vesicles as a mechanism promoting <i>H. pylori</i> infections ...	316
E. K. Jagusztyn-Krynicka, A.M. Banaś, M.J. Grzeszczuk – Strategies for the analysis of thioloxidoreductases .....	326
T. Chmielewski, S. Tylewska-Wierzbanowska – Susceptibility of spirochetes <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato to antibiotics <i>in vitro</i> .....	335
METHODS AND STANDARDS	
M. Łyszcz, A. Gałązka – Genetic differentiation methods of microorganisms in the soil – plant system .....	341
M. Brzozowski, P. Kwiatkowski, D. Kosik-Bogacka, J. Jursa-Kulesza – The application of genotyping and phenotyping techniques for epidemiological analysis of microorganisms ....	353
INFORMATION AND ANNOUNCEMENTS .....	367

