

Kwartalnik

**Tom 47**

**Zeszyt 4 • 2008**

CODEN:

PMKMAV 47 (4)

2008

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

# Postępy Mikrobiologii

Advances in Microbiology

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

## RADA REDAKCYJNA

JACEK BIELECKI (Uniwersytet Warszawski), RYSZARD CHRÓST (Uniwersytet Warszawski),  
JERZY DŁUGOŃSKI (Uniwersytet Łódzki), DANUTA DZIERŻANOWSKA (Centrum Zdrowia Dziecka),  
EUGENIA GOSPODAREK (Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy), JERZY HREBENDA (Uniwersytet Warszawski),  
WALERIA HRYNIEWICZ (Narodowy Instytut Leków), MAREK JAKÓBISIAK (Akademia Medyczna w Warszawie),  
ANDRZEJ PASZEWSKI (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN), ANDRZEJ PIEKAROWICZ (Uniwersytet Warszawski),  
ANTONI RÓŻALSKI (Uniwersytet Łódzki), ALEKSANDRA SKŁODOWSKA (Uniwersytet Warszawski),  
BOHDAN STAROŚCIAK (Akademia Medyczna w Warszawie), BOGUSŁAW SZEWCZYK (Uniwersytet Gdański),  
ELŻBIETA TRAFNY (Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii),  
STANISŁAWA TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA (Państwowy Zakład Higieny),  
GRZEGORZ WĘGRZYN (Uniwersytet Gdański), PIOTR ZIELENKIEWICZ (Uniwersytet Warszawski)

## REDAKCJA

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

### Adresy redakcji

#### Redaktorzy:

Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski  
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, tel. (0 22) 554 13 05/304, fax (0 22) 554 14 04  
e-mail: j.hrebenda@biol.uw.edu.pl; jbielecki@biol.uw.edu.pl

#### Sekretarz

Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny  
ul. Oczki 3 (parter), 02-007 Warszawa, tel. (0 22) 628 08 22, (0 22) 621 13 51  
e-mail: bohdan.starosciak@wum.edu.pl

## PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

Redaktor odpowiedzialny: STEFANIA GIEDRYS-KALEMBA (Pomorska Akademia Medyczna w Szczecinie)

### Adres Redaktora działu Publikacje Metodyczne i Standardy

Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii Pomorskiej Akademii Medycznej, Al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin,  
tel./fax: (091) 46 616 51, 52, lub fax: (091) 46 616 59, e-mail: kalemba@mp.pl lub kalemba@sci.pam.szczecin.pl

### Stali recenzenci:

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

## CZASOPISMO WYDAWANE Z FINANSOWĄ POMOCĄ MINISTERSTWA NAUKI I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO

ISBN 978 - 83 - 923731 - 3 - 1

Index Copernicus ICV = 3,16 (2008)

### Na okładce:

Koegzystencja grzybnia *Paecilomyces* sp. (żółta w centrum) z kolonią *Bacillus* sp.  
(w kształcie spletanego sznura) na płytce z agarem odżywczym.

Coexistence of *Paecilomyces* sp. (yellowish one in the centre) and *Bacillus* sp.  
(rope-shaped) on an nutrient agar plate.

Fot. dr Jerzy Piątkowski, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Nauk Przyrodniczych,  
Uniwersytet Wrocławski

Projekt okładki: Jerzy Grzegorkiewicz

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

Nakład 1150 + 15 egz., Objętość 10 arkusze wyd., Papier offser 80 g

### Skład i druk:

Zakład Wydawniczy *Letter Quality*, 01-216 Warszawa, Bryłowska 35/38,  
tel. 0 22 631 45 18, 0 607 217 879, e-mail: letter.quality@neostrada.pl

Tomasz Gośliński<sup>1\*</sup>, Krystyna Konopka<sup>2</sup>, Jarosław Piskorz<sup>1</sup>  
Michał Kryjewski<sup>1</sup>, Marcin Wierchowski<sup>1</sup>, Stanisław Sobiak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Technologii Chemicznej Środków Leczniczych  
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Poznań, e-mail: tomasz.goslinski@amp.edu.pl  
<sup>2</sup>Department of Microbiology, University of the Pacific, Arthur A. Dugoni School of Dentistry  
San Francisco, USA, e-mail: kkonopka@pacific.edu

Wpłynęło w lutym 2008 r.

1. Wprowadzenie. 2. Mechanizmy reakcji fotodynamicznej i terapii fotodynamicznej. 3. Źródła światła. 4. Fotosensybilizatory. 5. Terapia fotodynamiczna skierowana przeciw mikroorganizmom (PACT). 5.1. Badania PACT *in vitro*. 5.2. Efekty PACT badane na biofilmach. 5.3. Badania PACT *in vivo*. 5.4. Fotodynamiczna inaktywacja patogenów. 6. Perspektywy i kierunki badań

### Prospects for Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy – PACT

**Abstract:** Photodynamic therapy (PDT), also known as photoradiation therapy, phototherapy, or photochemotherapy, is a medical treatment that utilizes light to activate a photosensitizing agent (photosensitizer) in the presence of oxygen. The exposure of the photosensitizer to light of a specific wavelength results in the formation of oxygen species, such as singlet oxygen and free radicals, causing localized photodamage and cell death. Applications of PDT in the treatment of cancer and in the photodynamic diagnosis (PDD) of tumors and skin diseases are growing rapidly. There is also increased attention in photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) that may represent an alternative treatment for drug resistant organisms. PACT has been effective in the treatment of bacterial, fungal, parasitic, and viral infections. The localized infections of the skin and the oral cavity are especially suitable for PACT since they are relatively accessible to illumination. The development of resistance to PACT appears to be unlikely, because in microbial cells singlet oxygen and free radicals interact with several cell structures and different metabolic pathways. PACT is equally effective against antibiotic-resistant and antibiotic-susceptible bacteria, and repeated photosensitization has not induced the selection of resistant strains. Bacteria that grow in biofilms, implicated in diseases like cystic fibrosis (*Pseudomonas aeruginosa*) or periodontitis (*Porphyromonas gingivalis*), are also susceptible to PDT. Studies are now leading towards selective photosensitizers, since killing the entire flora leaves patients open to opportunistic infections. Several publications have summarized the photobiology of PACT *in vitro*, and its potential for the treatment of localized infections, but only a few studies have evaluated the use of PACT in animal models or in clinical trials. Pre-clinical work has shown that photosensitizers are more toxic against microbial species than against mammalian cells, that the illumination-based toxicity occurs much earlier in prokaryotic (bacteria) than in eukaryotic (fungi) cells, and that Gram-positive bacteria are more sensitive to PACT than Gram-negative species. PACT will not replace antimicrobial chemotherapy, but the photodynamic approach may improve the treatment of localized infections, speeding up and lowering the cost of the treatment. Development of new photosensitizers and more efficient light delivery systems, and further animal studies are required to establish the optimum treatment parameters for PACT before proceeding to clinical trials and eventual clinical use.

1. Introduction. 2. Mechanisms of photodynamic reaction and photodynamic therapy. 3. Light sources. 4. Photosensitizers. 5. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). 5.1. *In vitro* studies of PACT. 5.2. Effects of PACT on biofilms. 5.3. *In vivo* studies of PACT. 5.4. Photodynamic inactivation of pathogens. 6. Perspectives and future directions

---

**Słowa kluczowe:** biofilmy, fotosensybilizatory, terapia fotodynamiczna, terapia fotodynamiczna skierowana przeciw mikroorganizmom

**Key words:** biofilms, photodynamic therapy, photodynamic antimicrobial chemotherapy, photosensitizers

---

## 1. Wprowadzenie

Terapia fotodynamiczna (ang. *photodynamic therapy*, PDT) może mieć zastosowanie w leczeniu chorób nowotworowych [3, 4], infekcji bakteryjnych, pasożytniczych, grzybiczych i wirusowych [13, 32], łuszczycy [50], rogowacenia słonecznego [22], reumatoidalnego zapalenia stawów [30], związanej z wiekiem

degeneracji plamki żółtej [31] oraz w fotodiagnostyce [37]. Terapią fotodynamiczną zajmuje się zespół złożony z biochemika, chemika, biologa, lekarza, farmaceuty, fizyka i pielęgniarki [4].

Znaczenie PDT w leczeniu chorób nowotworowych wzrasta od ponad 30 lat dzięki pionierskim badaniom przeprowadzonym przez zespół Thomasa I. Dougherty'ego [16]. Terapia fotodynamiczna

---

\* Autor korespondencyjny: Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, Katedra i Zakład Technologii Chemicznej Środków Leczniczych (Wydział Farmaceutyczny), ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań, tel.: (0 61) 854-66-37, Fax: (0 61) 854-66-39, e-mail: tomasz.goslinski@amp.edu.pl

charakteryzuje się szeregiem korzystnych cech w porównaniu z konwencjonalnym leczeniem nowotworów (chirurgia, radioterapia i chemioterapia). PDT jest terapią nieinwazyjną, nie wymaga skomplikowanej aparatury, jest wygodna dla pacjentów i może być stosowana w warunkach ambulatoryjnych. Terapia fotodynamiczna nie nadaje się do leczenia pacjentów z zaawansowanymi zmianami nowotworowymi, którym towarzyszą przerzuty. Sprawdza się ona natomiast w leczeniu wczesnych i miejscowych zmian nowotworowych. Brak ograniczeń związanych z dawką całkowitą pozwala na wielokrotne powtarzanie terapii. Działania niepożądane są głównie związane z uczuleniem na światło. PDT daje doskonałe efekty kosmetyczne i nie pozostawia blizn [9]. Bardzo zachęcające są wyniki badań klinicznych PDT na czterystu pacjentach z chorobami nowotworowymi uzyskane w Brazylii w latach 1997–2004 [4]. Fotouczulacze stosowane w leczeniu chorób nowotworowych i badaniach klinicznych to Photofrin<sup>®</sup>, Foscan<sup>®</sup> i ALA, a w leczeniu związanej z wiekiem degeneracji plamki żółtej to Visudyne<sup>™</sup>. Stosowanie PDT jest regulowane przez instytucje rządowe kontrolujące wprowadzanie nowych leków i metod terapeutycznych. W Europie są dostępne wszystkie wymienione powyżej fotouczulacze, natomiast w Stanach Zjednoczonych Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (*Food and Drug Administration*, FDA) zaakceptowała tylko Photofrin<sup>®</sup>, ALA i Visudyne<sup>™</sup>.

Terapia fotodynamiczna skierowana przeciwko drobnoustrojom (*photodynamic antimicrobial chemotherapy*, PACT) może stać się alternatywą dla konwencjonalnej terapii zakażeń bakteryjnych, grzybiczych, pasożytniczych i wirusowych [46].

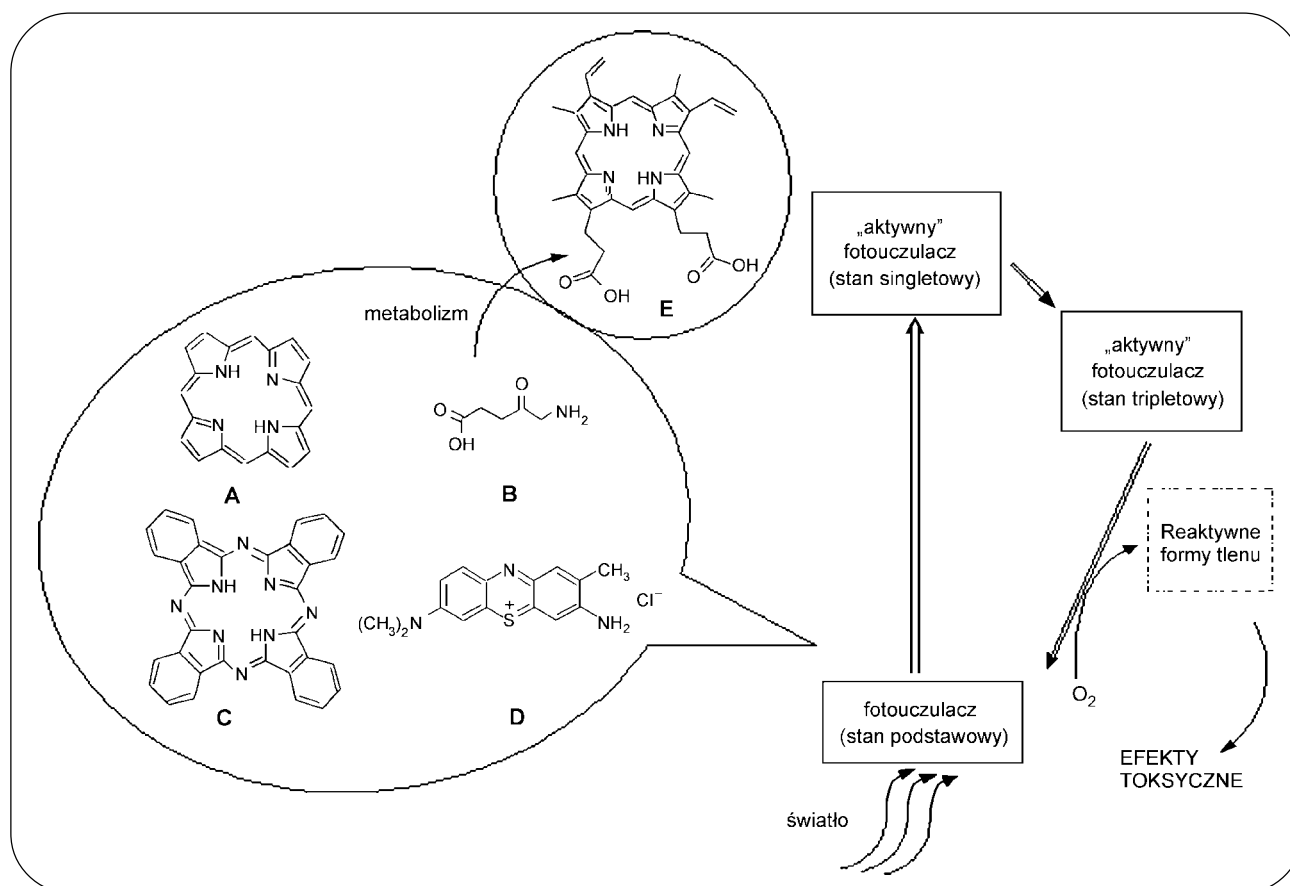
Zastosowana w PACT kombinacja fotouczulacza (fotosensybilizatora) i światła widzialnego prowadzi do selektywnej destrukcji komórek drobnoustrojów. Bakteriobójcze połączenie barwnika i światła znane jest od ponad stu lat, ale rozwój PACT został zahamowany w połowie ubiegłego wieku przez wprowadzenie antybiotyków. Pojawienie się metycylinoopornych szczepów *Staphylococcus aureus* (MRSA) oraz wankomycynoopornych szczepów *Enterococcus faecalis* i *E. faecium* (VREF) skierowało uwagę na PACT. Obecnie uważa się, że terapia ta mogłaby znaleźć zastosowanie w leczeniu zlokalizowanych infekcji skóry i jamy ustnej. Standardowe leczenie przeciwgrzybicze jest długotrwałe i mało efektywne, a w przypadku leczenia systemowego – wysoce toksyczne. W ostatnich latach problemem staje się rozwój oporności względem przeciwgrzybiczych związków z grupy triazoli. Konieczne jest więc wprowadzenie nowych terapii przeciwgrzybiczych, zwłaszcza u pacjentów z neutropenią, zapaleniem trzustki oraz u osób zakażonych wirusem HIV [13].

Kluczowym etapem reakcji fotodynamicznej jest wytworzenie reaktywnych form tlenu, w tym tlenu singletowego. Enzymy antyoksydacyjne (dysmutaza nadadtlenkowa i katalaza) zabezpieczają komórki przeciwko pewnym formom rodnikowym tlenu, ale nie przeciwko tlenowi singletowemu. Wydaje się mało prawdopodobne, aby bakterie i grzyby rozwinęły oporność w stosunku do cytotoksycznego działania tlenu singletowego, ponieważ w komórkach mikroorganizmów wywiera on wpływ na różne szlaki metaboliczne i organelle. PACT może być więc skuteczna zarówno wobec bakterii wrażliwych, jak i opornych na antybiotyki. Wielokrotne stosowanie terapii nie doprowadziło do wyselekcjonowania opornych szczepów bakteryjnych. Nie zaobserwowano także efektów genotoksycznych i mutagennych w komórkach grzybów i w komórkach ludzkich. PACT wykazuje potencjał przeciwwirusowy względem wirusa HIV, wirusów zapalenia wątroby oraz arbowirusów (wywołujących żółtą gorączkę, gorączkę tropikalną i gorączkę Zachodniego Nilu). Rozpatruje się zastosowanie PACT w zakażeniach wirusem Ebola i w zespole ostrej ciężkiej niewydolności oddechowej (SARS) [13, 46].

Pomimo licznych sukcesów odniesionych w badaniach na kulturach komórkowych, niewielka ilość prac opisuje zastosowanie PACT w warunkach *in vivo* zarówno u zwierząt, jaki i u ludzi.

## 2. Mechanizmy reakcji fotodynamicznej i terapii fotodynamicznej

Mechanizm terapii fotodynamicznej opiera się na wzajemnym dopasowaniu trzech elementów: światła, fotouczulacza i tlenu (Rys. 1). Fotouczulacz (lub jego prekursor, który musi ulec metabolicznej aktywacji) naświetlony światłem o określonej długości fali przechodzi z niskoenergetycznego stanu podstawowego do stanu wzbudzonego. Cząsteczka fotouczulacza może powrócić do stanu podstawowego, czemu towarzyszy fluorescencja lub przejść do niższego energetycznie stanu tripletowego. Znane są dwa mechanizmy reagowania fotouczulacza w tripletowym stanie wzbudzonym z cząsteczkami w komórce. Reakcje I typu dotyczą przeniesienia elektronu lub atomu wodoru bezpośrednio z fotouczulacza na cząsteczkę substratu z utworzeniem wolnych rodników, które natychmiast reagują z tlenem. W efekcie wytwarzane są wysoce reaktywne formy tlenu, jak anionorodniki nadadtlenkowe, rodniki hydroksylowe, nadtlenek wodoru. Reakcje II typu polegają na oddziaływaniu fotouczulacza z tlenem tripletowym. Prowadzą do wytworzenia elektronowo wzbudzonej i wysoce reaktywnej formy tlenu zwanej tlenem singletowym. Oba wymienione mechanizmy wskazują, że na przebieg reakcji fotodynamicznej ma



Rys. 1. Schemat reakcji fotodynamicznej i terapii fotodynamicznej wraz z wybranymi strukturami: porfiry (A), protoporfiryny IX (E) (metabolit kwasu 5-aminolewulinowego (B)), ftalocyjaniny (C) i błękitu toluidynowego (D).

wpływ zarówno stężenie tlenu, jak i fotouczulacza. Tlen singletowy będący głównym czynnikiem bakteriobójczym reakcji fotodynamicznej ma krótki okres życia i dyfunduje na odległość 100 nm. U bakterii zmiany letalne obserwuje się na poziomie kwasów nukleinowych i/lub błony cytoplazmatycznej [32]. W przypadku grzybów fotouczulacz przechodzi do przestrzeni periplazmatycznej przez zewnętrzną ścianę komórkową złożoną z glukanu, mannanu, chityny i lipoprotein. Następnie przenika on do cytoplazmy, gdzie wywołuje lawinę efektów biochemicznych i funkcjonalnych. Obserwuje się dezaktywację enzymów, białek i peroksydację lipidów, co prowadzi do lizy błon komórkowych, lizosomów i mitochondriów [13].

### 3. Źródła światła

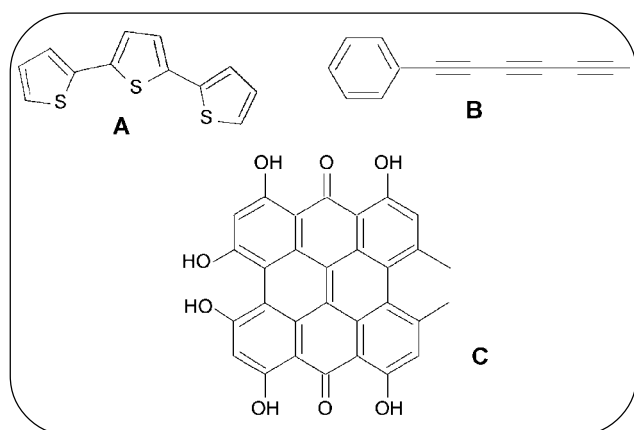
W terapii fotodynamicznej używa się niskoenergetycznego źródła światła widzialnego, które aktywuje fotosensybilizator. Zastosowanie znalazły lasery oraz tanie i łatwiejsze do użycia lampy. Miejsce złożonych i drogich źródeł światła, głównie laserów: argonowego, barwnikowych, laserów impulsowych na parach złota i miedzi, zajmują obecnie łatwiejsze w obsłudze,

przenośne i tanie lasery półprzewodnikowe, systemy diodowe (*light-emitting diode*, LED) oraz lasery femtosekundowe. W leczeniu większych powierzchni stosuje się niekoherentne źródła światła, jak np. lampy wolframowe, halogenowe i ksenonowe [7, 26, 28, 34].

Fenotiazyny ulegają aktywacji przy 600–660 nm, a ftalocyjaniny 630–690 nm. W lampach stosowanych *in vivo* minimalizuje się wpływ promieniowania ultrafioletowego z uwagi na ryzyko mutagenyzy oraz promieniowania podczerwonego, żeby zapobiec przegrzaniu tkanki. Typowe natężenie promieniowania stosowane dla przeciwgrzybiczego PACT mieści się w zakresie 10–100 mW cm<sup>-2</sup>, z dawką energii pomiędzy 10–200 J cm<sup>-2</sup>. Światło nie jest zdolne do głębokiej penetracji tkanki, stąd kliniczne zastosowanie PACT jest obecnie ograniczone do obszarów, które można naświetlać powierzchniowo [13, 46].

### 4. Fotosensybilizatory

Fotosensybilizatory są najczęściej związkami płaskimi o skoniugowanym systemie elektronów  $\pi$ . Występują licznie w świecie roślin. Przykładami mogą być produkty degradacji chlorofilu, hipercyna, fagopiryna,



Rys. 2. Fotouczulacze wyizolowane z roślin o potencjalnym zastosowaniu w PACT: tertienyl (A), fenyloheptatrien (B), hiperycyna (C).

psoralen, angelicyna, aflatoksyny, alkaloidy, pochodne tiofenu i poliacetyleny (Rys. 2). Duże ilości roślinnych fotouczulaczy znaleziono w liściach pokrzywy żegawki (*Urtica urens*) z rodziny pokrzywowatych (*Urticaceae*). Tertienyl występujący w różnych gatunkach aksamitek (*Tagetes* sp.) z rodziny astrowatych (*Asteraceae*) wykazuje aktywność fotodynamiczną w stosunku do nicieni oraz *Candida albicans*. Przedstawiciel poliacetylenów, fenyloheptatrien występujący w rodzinach astrowatych (*Asteraceae*) i selerowatych (*Apiaceae*) posiada właściwości fototoksyczne i antybiotyczne w stosunku do bakterii, grzybów, ludzkich fibroblastów, larw owadów. Przeciwwirusowe działanie hiperycyny z dziurawca zwyczajnego (*Hypericum perforatum*) z rodziny dziurawcowatych (*Guttiferae*) mogłoby znaleźć zastosowanie do sterylizacji krwi [18].

Potencjalny fotouczulacz nie może być toksyczny, ani aktywowany metabolicznie do związków toksycznych. Fotosensybilizator musi być rozpuszczalny w wodzie. Gwarancją wysokiej toksyczności fotosensybilizatora wobec komórek nowotworowych i mikroorganizmów jest wytwarzanie tlenu singletowego i innych reaktywnych form tlenu w reakcji ze światłem [1].

Do fotouczulaczy stosowanych w PACT należą barwniki fenotiazynowe: błękit metylenowy i błękit toluidyny, ftalocyjaniny: sulfonowana ftalocyjanina glinowa i kationowa ftalocyjanina cynkowa, chloryny i ich koniugaty: chloryna e6, polilizynowy koniugat chloryny e6, porfiryny i ich prekursorzy: Photofrin® i kwas 5-aminolewulinowy (ALA), ksanteny: erytrozyna i monotereny: azulen [45] (Rys. 1).

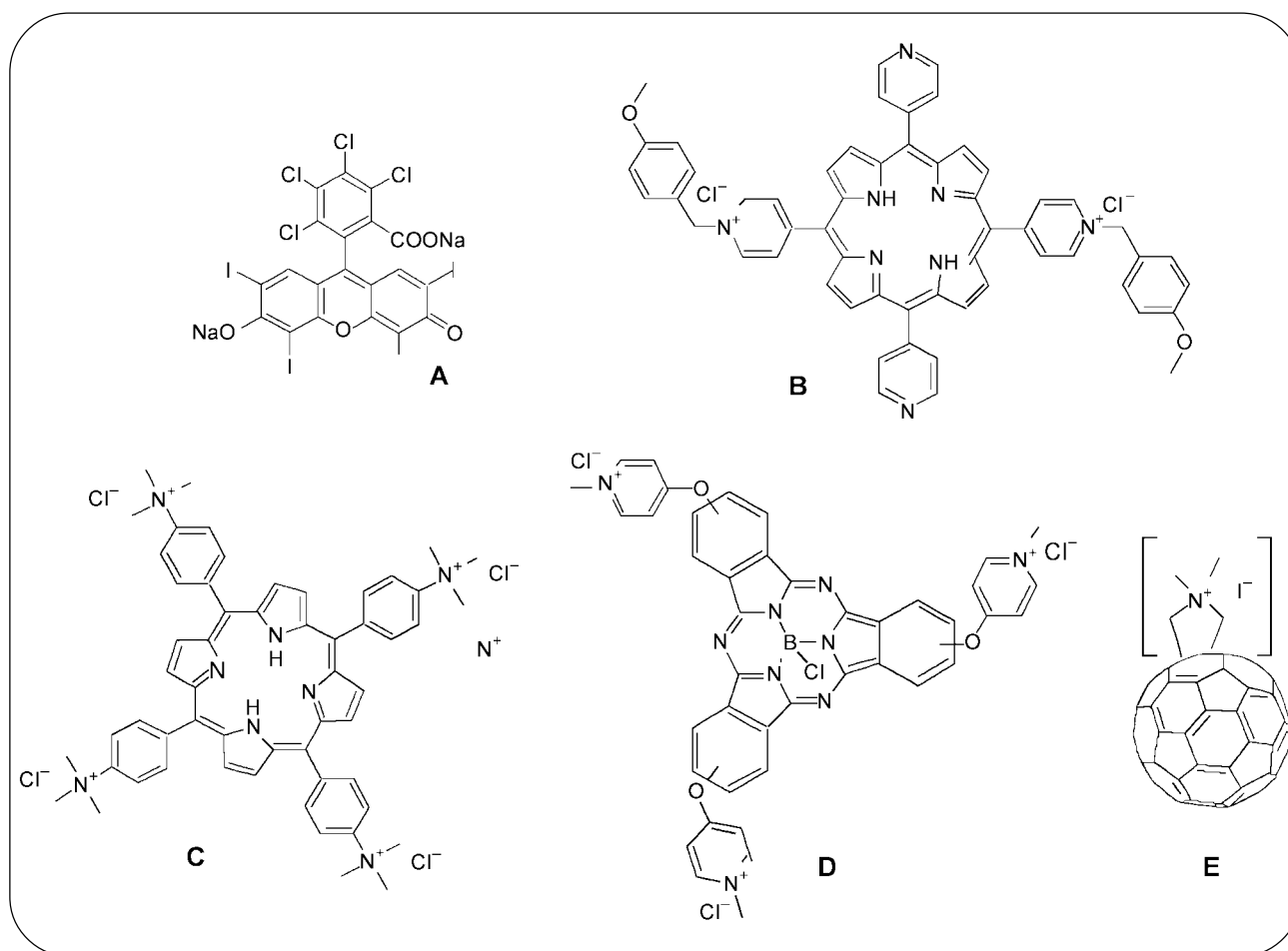
Od ładunku fotouczulacza zależy jego aktywność przeciwbakteryjna i przeciwgrzybicza. Związki o ładunku dodatnim są bardziej aktywne niż związki o ładunku ujemnym lub obojętne. W porównaniu do swoich anionowych odpowiedników, kationowe fotosensybilizatory charakteryzują się szerokim spektrum działania względem bakterii Gram-dodatnich i Gram-

ujemnych. Fotosensybilizatory kationowe np. fenotiazyny są aktywne w odniesieniu do bakterii Gram-dodatnich, takich jak *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Propionibacterium acnes* i *Corynebacterium minutissimum* [10]. Doświadczenia z ftalocyjaninami cynkowymi wykazały, że związki kationowe są również efektywnymi fotosensybilizatorami względem bakterii Gram-ujemnych. W badaniach przetestowano ftalocyjaniny z ugrupowaniem kationowym (grupy pirydyniowe), neutralnym (grupy sulfonamidowe) i anionowym (grupy sulfonowe). Pomimo, że wszystkie związki wytwarzały reaktywne formy tlenu z podobną wydajnością, to tylko sole pirydyniowe były aktywne w odniesieniu do *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* [46]. Względnie porowata ściana komórkowa złożona z peptydoglikanu i kwasów lipotejchowych znajdująca się na zewnątrz błony cytoplazmatycznej bakterii Gram-dodatnich jest wystarczająco przepuszczalna dla fotosensybilizatorów i pozwala im na dyfundowanie do miejsc wrażliwych. Natomiast dodatkowa zewnętrzna błona komórkowa bakterii Gram-ujemnych, znajdująca się ponad ścianą peptydoglikanową i wewnętrzną błoną komórkową, działa jak fizyczna i funkcjonalna bariera pomiędzy komórką i środowiskiem. Fotosensybilizatory posiadające ładunek obojętny lub anionowy jedynie w pewnym stopniu łączą się z zewnętrzną błoną bakterii Gram-ujemnych, nie wywołując jednak ich dezaktywacji po naświetleniu. Powinowactwo anionowych fotouczulaczy do bakterii Gram-ujemnych może być zwiększone przez połączenie fotouczulacza z cząsteczką kationową (np. poli-L-lizynowa-chloryna e6), użycie związków powierzchniowo czynnych (np. Tris-EDTA) oraz koniugowanie fotouczulacza z przeciwciałem monoklonalnym, które wiąże się ze specyficznymi antygenami na powierzchni komórek [13, 21, 25, 35, 45].

Badania przeciwgrzybiczej PACT przeprowadzono dla pochodnych fenotiazynowych, porfiryńowych, ALA oraz dla ftalocyjanin [10, 11, 13, 44, 46].

Zaobserwowano, że pochodne fenotiazynowe, lokalizują się w błonie komórkowej drożdży i prowadzą do jej uszkodzeń po naświetleniu. Zwiększona przepuszczalność błony jest przyczyną śmierci komórki. Komórki grzybów są trudniej eliminowane przez PACT niż bakterie. Jest to spowodowane obecnością błony jądrowej, wielkością komórek i zredukowaną ilością potencjalnych celów dla tlenu singletowego przypadających na jednostkę objętości komórki. Należy podkreślić, że fenotiazyny są chemioterapeutykami, które działają bakteriobójczo także bez dostępu światła.

Porfiryny nie są wchłaniane przez komórki grzybów i ich działanie fototoksyczne zależy od aktywacji w stanie wolnym, niezwiązanym z błoną. Po naświetleniu porfiryń wytwarzane są reaktywne formy tlenu, które powodują nieodwracalne zmiany w błonie cytoplazma-



Rys. 3. Struktury przykładowych fotosensybilizatorów stosowanych w PACT *in vitro*: róż bengalski (A), porfiryryna dikationowa (B), porfiryryna tetrakationowa (C), subftalocyjanina trikationowa (D), fuleren zawierający grupy pirolidynowe (E)

tycznej pozwalające na penetrację fotouczulacza do wnętrza komórki. Po powtórny naświetleniu dochodzi do zmian toksycznych w obrębie cytoplazmy i organelli. Hydrofilowość porfiryryn, np. deuteroporfiryryny, jest szczególnie ważna dla przeciwwgrzybiczego PACT.

ALA jest prekursorem w biosyntezie hemu. Jego podanie prowadzi do kumulacji potencjalnego fotosensybilizatora protoporfiryryny IX (PpIX). Niemniej jednak pomiędzy komórkami grzybów i ssaków występują różnice, związane głównie z obecnością cytoplazmatycznej oksydazy koproporfiryrynogeny. Aktywność syntazy ALA i dehydratazy ALA jest kontrolowana przez wewnątrzkomórkowy poziom hemu. Z tego też względu zawartość PpIX może ulec podwyższeniu przy równoczesnym podaniu związków kompleksujących żelazo, np. EDTA. PpIX indukuje reakcje cytotoksyczne niszczące zarówno błony komórkowe, jak i mitochondrialne. Przedłużone naświetlanie prowadzi do zmian w innych strukturach komórkowych oraz inhibicji syntezy DNA i RNA. PpIX nie powoduje jednak efektów genotoksycznych i mutagennych.

Ftalocyjaniny nawet jako pochodne sulfonowe są stosunkowo hydrofobowe. Monosulfonowa ftalocyja-

nina cynkowa oraz tetrakationowa ftalocyjanina cynkowa posiadająca podstawniki 4-aminoalkilowe okazały się bardzo dobrymi fotosensybilizatorami wobec *Candida albicans* [13, 46].

## 5. Terapia fotodynamiczna skierowana przeciw mikroorganizmom (PACT)

Efekt PACT *in vitro* badano głównie na mikroorganizmach rosnących w hodowlach zawiesinowych oraz w biofilmach. Można znaleźć zaledwie kilka prac, które opisują zastosowanie PACT u zwierząt i badania kliniczne u ludzi (zmiany wirusowe, trądzikowe, infekcje żołądkowe *Helicobacter pylori* i ropnie mózgu) [21, 32].

### 5.1. Badania PACT *in vitro*

W badaniach przeciwbakteryjnego i przeciwwgrzybiczego PACT *in vitro* stosowano następujące fotosensybilizatory: róż bengalski, błękit metylenowy, porfiryryny kationowe oraz fulereny (Rys. 3).

Róż bengalski dodany do medium zawierającego *Streptococcus mutans*, już w stężeniu od 0,5  $\mu\text{M}$  wykazywał efekt bakteriobójczy po naświetleniu światłem z podręcznego dentystrycznego fotopolimeryzatora (ang. *handheld photopolymerizer*, *dental photopolymerizer*) emitującego dawkę światła 350–500  $\text{mJ cm}^{-2}$  w zakresie 400–500 nm. Badania kontrolne przeprowadzone równolegle na fibroblastach nie wykazały zmian cytotoksycznych [33]. Błękit metylenowy okazał się grzybobójczy względem szczepów *Candida* (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*) po naświetleniu laserem diodowym z dawką energii 28  $\text{J cm}^{-2}$  przy 685 nm [11].

Bristow i wsp. użyli porfiryny tetrakationowej, która charakteryzowała się bardzo dobrymi parametrami fotoinaktywacji postaci promastigota pasożyta *Leishmania major*. W warunkach *in vitro* dla zakresu stężeń od 2 do 7  $\mu\text{M}$  osiągnięto 60% inaktywację *L. major* i 90–100% inaktywację makrofagów. Użyte dane wskazały na możliwość wyeliminowania pasożyta w czasie kilku sesji [8]. Badania porfirynekationowych wykazały, że dodatni ładunek jest kluczowy dla osiągnięcia aktywności względem bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Porfirynekationowa posiadała najlepszą aktywność w stosunku do *E. coli*, *P. aeruginosa* i *S. aureus*. Modyfikację lipofilności osiągnięto wprowadzając dodatkowe grupy aromatyczne do ugrupowań pirydyniowych lub zmieniając liczbę ładunków dodatnich [5]. Dla trikationowej subftalocyjaniny boronowej uzyskano wysokie stężenie wewnątrzkomórkowe ( $\sim 2 \text{ nmol}/10^6 \text{ komórek}$ ) w zawieszynie *E. coli*. Skuteczność PACT po 30 min naświetlania kultur wynosiła 99,7% [41].

Chloryna e6 połączona z polilizynowym pentamerem charakteryzowała się bardzo dobrą aktywnością względem bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych: *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum*, *Actinomyces viscosus* i *Streptococcus* spp. (*S. sobrinus*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. mutans*). Należy podkreślić, że „nieskoniugowana” chloryna e6 była nie tylko mniej aktywna, ale również bardziej cytotoksyczna wobec komórek ssaków [35].

Fulereiny  $\text{C}_{60}$  zawierające grupy piroolidynowe są dobrymi i selektywnymi fotosensybilizatorami dla *E. coli*, *C. albicans*, *S. aureus* [43].

## 5.2. Efekty PACT badane na biofilmach

Przylegające do siebie drobnoustroje należące do jednego lub kilku gatunków, zespolone produkowaną przez nie macierz pozakomórkową, tworzą heterogenną i zorganizowaną strukturę zwaną biofilmem.

Biofilmy tworzone są zarówno przez bakterie, jak i grzyby. Żyjące w nich mikroorganizmy wykazują podwyższoną oporność na antybiotyki oraz działanie układu immunologicznego. Wielu autorów zajmuje się problematyką niszczenia bakteryjnych i grzybiczych biofilmów oraz zagadnieniami ich oporności na tradycyjną farmakoterapię [14, 39]. Wood i wsp. posługując się mikroskopem elektronowym stwierdzili uszkodzenia biofilmu (wytworzonego *in vivo* w postaci płytki na emalii zębowej) po zastosowaniu *in vitro* ftalocyjaniny cynkowej i światła [52]. Lee i wsp. wykazali, że biofilm *P. aeruginosa* jest bardziej odporny na PACT niż hodowla zawieszinowa. W obu przypadkach po podaniu ALA zastosowano tę samą dawkę światła, wynoszącą 240  $\text{J cm}^{-2}$ . Dla biofilmu konieczne było dwukrotne powtórzenie procedury przy wyższym stężeniu substancji aktywnej (20  $\text{mM cm}^{-2}$ ), podczas gdy w hodowli zawieszinowej wystarczyła dawka jednorazowa (10  $\text{mM cm}^{-2}$ ) [27].

Biofilm *E. faecalis* rosnący w uzyskanych po ekstrakcji korzeniach zębowych poddano PACT stosując błękit metylenowy w kombinacji z naświetlaniem przy 665 nm. Dawka światła 222  $\text{J cm}^{-2}$  wyeliminowała 97% patogenu. Należy podkreślić, że już dawka światła 30  $\text{J cm}^{-2}$  eliminowała całkowicie *Peptostreptococcus micros*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum subsp. nucleatum* oraz 53% *E. faecalis*. Celowym wydaje się więc zastosowanie PACT do niszczenia bakterii w kanałach korzeni zębowych podczas standardowego leczenia endodontycznego [40]. Równie obiecujące wyniki uzyskano dla biofilmu *Streptococcus intermedius* przy użyciu błękitu toluidyny [36, 51].

Zakażenia grzybicze zdarzają się coraz częściej, stanowiąc istotny problem współczesnej medycyny. Dotyczy to zarówno zakażeń powierzchniowych (błony śluzowe i skóra), jak również grzybic głębokich (grzybice narządowe i fungemie) [14]. Grupą chorych szczególnie narażonych na zakażenia grzybicze są pacjenci ze schorzeniami nowotworowymi oraz z zespołem nabytego upośledzenia odporności (AIDS). Rozwojowi objawowej grzybicy sprzyjają również schorzenia endokrynologiczne, szczególnie cukrzyca, przewlekła steroidoterapia i antybiotykoterapia oraz stosowanie leków immunosupresyjnych. Tworzenie biofilmu przez rodzaj *Candida* odgrywa istotną rolę w patogenezie zakażeń wywołanych przez te drobnoustroje. Poważnym problemem są zakażenia grzybicze u pacjentów, u których w celach diagnostycznych lub terapeutycznych stosuje się urządzenia wykonane z biomateriałów (cewniki, dreny, zespolenia naczyniowe, protezy stawowe i zębowe, soczewki oczne i inne). Udowodniono, że biofilm *Candida* może powstawać na powierzchni tworzyw sztucznych, takich jak polimetakrylan metylu, elastomer silikonowy, polichlorek winylu – materiałów używanych do produkcji cewników, drenów oraz protez [17].



Fotosensybilizatory osadzają się na emalii zębowej wywołując jej przebarwienia i w związku z tym nie mogą być stosowane jako płyny do płukania w grzybicach jamy ustnej. Idealnym rozwiązaniem wydaje się „przytrzymanie” fotosensybilizatora w miejscu powierzchniowej PACT. Zapobiega to szybkiemu usunięciu (wymyciu) fotouczulacza z obszaru poddawane go naświetlaniu, a także ogranicza niepożądane działania. W tym celu opracowano plastry z błękitem toluidyny (*mucoadhesive patch*). Plastry te są przygotowywane na bazie hydrożeli po zmieszaniu PMVE/MA [poli(metylowinyloeter)/bezwodnik maleinowy] z DOWANOL™.em (eter propylenoglikolometylowy). Stężenia błękitu toluidyny uwalnianego z plastra osiągnęły wartości 2,0–5,0 mg ml<sup>-1</sup>, co pozwoliło po naświetleniu lampą Patersona przy 635 nm na wyeliminowanie ponad 90% populacji komórek grzybów [12].

Wood i wsp. badali eliminację biofilmu *S. mutans* stosując błękitem metylenowy, erytrozynę i Photofrin® oraz światło z zakresu 500–650 nm o intensywności 22,5–22,7 mW cm<sup>-2</sup>. Erytrozyna wykazała najwyższą aktywność fotodynamiczną [53].

### 5.3. Badania PACT *in vivo*

Zaledwie kilka prac opisuje efektywność PACT *in vivo*. Na uwagę zasługują badania przeprowadzone na szczurach z użyciem błękitu toluidyny [24] oraz na psach z użyciem chloryny e6 oraz jej rozpuszczalnej pochodnej [38]. Badania dotyczyły zapaleń przyzębia (*periodontitis*) wywołanych przez *P. gingivalis* i *F. nucleatum*. U myszy z immunosupresją miejscowe zastosowanie błękitu metylenowego w dawce 450 i 500 µg ml<sup>-1</sup> połączone z naświetleniem laserem diodowym (664 nm) całkowicie usunęło *C. albicans* ze zmian na języku. Wyniki badań na zwierzętach sugerują, że proponowany schemat mógłby znaleźć zastosowanie w leczeniu pacjentów z AIDS [44].

Zapalenie okołowszczepowe (*periimplantitis*) jest spowodowane zainfekowaniem powierzchni implantu i tworzeniem biofilmu. Płytką bakteryjną (*bacterial plaque*) tworząca się na implancie powoduje zmiany zapalne w sąsiednich tkankach miękkich. U 15 pacjentów z *periimplantitis*, błękitem toluidyny zastosowany na powierzchni implantów i naświetlanie laserem diodo-

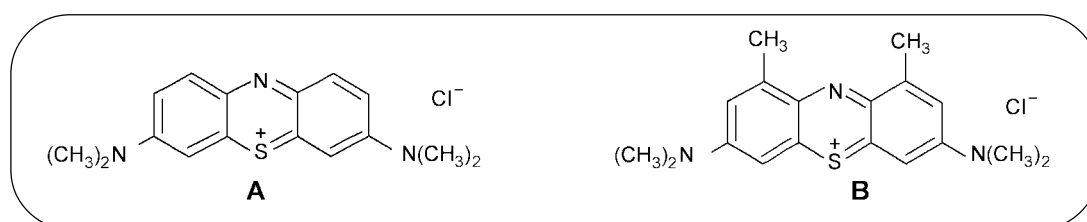
wym (690 nm) zmniejszyło znacznie ilość *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* i *Prevotella intermedia* [15]. Haas i wsp. z powodzeniem użyli błękitu toluidyny i światło laserowe (906 nm) u 17 pacjentów z *periimplantitis* [20].

Efektywność kliniczną ALA-PACT badano u 9 pacjentów z międzypalcową grzybicą stóp (ang. *interdigital foot mycosis*). W terapii zastosowano 20% krem z ALA, a po 4 godz. naświetlanie światłem czerwonym w dawce 75 J cm<sup>-2</sup>. Jeżeli kontrola przeprowadzona po 7 dniach wykazała wynik negatywny, to terapię powtórzono jeszcze trzykrotnie w odstępach tygodniowych. Wyniki podsumowano po 4 tygodniach. Kliniczną i biologiczną poprawę stwierdzono u 6, w tym u 4 pacjentów po jednorazowej terapii. Jednakże u 2 pacjentów (jeden z *C. albicans*, drugi z *Trichophyton mentagrophytes*) zaobserwowano uporczywą remisję. Tolerancja terapii była dobra [10].

### 5.4. Fotodynamiczna inaktywacja patogenów

Pandemia AIDS w latach osiemdziesiątych i zakażenia wirusem HIV spowodowane transfuzją krwi i podawaniem preparatów krwiopochodnych, zwróciły uwagę na problem fotosterylizacji krwi i preparatów krwiopochodnych. Metody inaktywacji patogenów obejmują pasteryzację, naświetlanie UV i nanofiltrację. Z grupy fotosensybilizatorów stosowanych w PACT używa się barwników fenotiazynowych ze względu na ich powinowactwo do kwasów nukleinowych, w tym do DNA wirusowego. Fotodynamiczna inaktywacja przy użyciu błękitu metylenowego i błękitu dwumetylenowego okazała się skuteczna wobec *Yersinia enterocolitica* i *Pseudomonas fluorescens*. Błękit metylenowy był aktywny również względem wirusa HIV, HBV, parwowirusa B19 i Wirusa Zachodniego Nilu (Rys. 4).

Błękit metylenowy jest stosowany do fotodezynfekcji świeżego mrożonego osocza (*fresh frozen plasma*) według procedury opracowanej przez M o h r a w 1991 roku i ulepszonej przez MacoPharma. Osocze (200–315 ml) wprowadzone do pojemnika zawierającego filtr Blueflex i 85 µg błękitu metylenowego jest naświetlane lampą sodową przy 590 nm przez 20 min dawką 180 J cm<sup>-2</sup>. Błękit dwumetylenowy – tionina może znaleźć też zastosowanie do fotodynamicznej



Rys. 4. Fotosensybilizatory fenotiazynowe: (A) błękitem metylenowy; (B) błękitem dwumetylenowy

sterylizacji koncentratów płytkowych. Prowadzone są próby użycia fotosensybilizatorów do dezynfekcji koncentratów krwinek czerwonych [19, 47–49].

## 6. Perspektywy i kierunki badań

PDT jest zaakceptowana przez organizacje rządowe Stanów Zjednoczonych, Unii Europejskiej, Kanady, Rosji i Japonii do leczenia niektórych stanów chorobowych [2, 3, 6, 26]. Badania zajmujące się fotobiologią i zastosowaniem PACT w leczeniu miejscowych infekcji wskazują na jej potencjalną użyteczność w eliminowaniu zakażeń bakteryjnych, grzybiczych, pierwotniakowych i wirusowych [12, 13, 21, 23, 25, 32, 39, 45, 46, 53]. Wiele wyników uzyskanych *in vitro* wymaga jednak dalszych badań zanim PACT będzie można stosować rutynowo w praktyce klinicznej. Potencjalnie, PACT może być zastosowany w leczeniu ran oparzeniowych, infekcji skóry, paznokci, włosów, jamy ustnej, przełyku i dolnego odcinka dróg rodnych [13, 32]. Terapia fotodynamiczna wydaje się być obiecującą alternatywą w infekcjach wywołanych mikroorganizmami opornymi, zwłaszcza u pacjentów z chorobami nowotworowymi i upośledzoną funkcją systemu immunologicznego oraz w eliminowaniu biofilmów bakteryjnych z powierzchni tworzyw sztucznych (cewniki, dreny, protezy).

Niski koszt PACT daje szansę leczenia zakażeń powierzchniowych w krajach rozwijających się [25, 32, 47]. Rozwój oporności na dostępne antybiotyki postępuje bardzo szybko. Zwiększa się liczba patogenów w chorobach przyzębia opornych na amoksylicynę, penicylinę G, metronidazol, doksycyklinę i roksytromycynę. Szczepy odporne powstają m.in. wskutek niewłaściwej antybiotykoterapii. Metycylinooporne szczepy *S. aureus* mogą tworzyć się w ramach oporności krzyżowej do antybakteryjnego składnika, triklosanu, dodawanego do past do zębów [29].

PACT wykazuje szereg korzystnych cech w porównaniu ze standardową antybiotykoterapią. Daje możliwość wielokrotnego działania na komórki mikroorganizmów bez ryzyka wystąpienia oporności. Terapia jest selektywna w stosunku do patogenów w porównaniu z komórkami ssaków oraz mało toksyczna. Nie opisano oporności mikroorganizmów na reaktywne formy tlenu. Zastosowanie PACT do leczenia miejscowych infekcji skraca czas trwania terapii, ogranicza efekty uboczne spowodowane systemowym podawaniem antybiotyków i obniża koszty leczenia [13, 25, 32].

Fotouczulacze fenotiazyniowe, porfiryne i ftalocyjaninowe wykazują działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze. Pomimo tego, że dla niektórych grup fotosensybilizatorów udało się skorelować zależ-

ność działania i struktury, wiele fotouczulaczy aktywnych *in vitro* nie zawsze sprawdza się w warunkach *in vivo*. Opracowanie nowych fotouczulaczy działających specyficznie wobec wybranych mikroorganizmów np. poprzez sprzężanie z przeciwciałami i pozwoli na uniknięcie efektów fototoksycznych wobec komórek pacjenta lub zwierząt doświadczalnych i flory komensalnej. Najbardziej podatną na PACT grupą mikroorganizmów są bakterie. Grzyby wymagają większych dawek światła i fotouczulacza. Przeciwgrzybicza PACT może więc doprowadzić do zniszczenia wszystkich mikroorganizmów w miejscu poddanym leczeniu. Taki efekt wydaje się niepożądany przy eliminacji określonego patogenu. Skuteczne mogą być wtedy koniugaty fotosensybilizatorów z przeciwciałami np. Sn (IV) chloryna e6 połączona z przeciwciałami *anti-P. aeruginosa*, które okazały się efektywne w badaniach *in vitro* względem *P. aeruginosa*, w tym szczepów metycylinoopornych. Prowadzone są też badania zwiększające efektywność wcześniej stosowanych fotouczulaczy. Otrzymano polikationowy koniugat chloryny e6 (poli-L-lizynowa-chloryna e6), który jak wykazano na myszach posiada przeciwbakteryjne działanie w stosunku do Gram-ujemnych pałeczek *P. aeruginosa* [25, 32].

Skuteczność PACT jest w dużym stopniu zależna od doboru dawki promieniowania, która eliminuje mikroorganizm nie uszkadzając komórek pacjenta. W związku z tym konieczna jest dokładna standaryzacja procesu naświetlania i dozymetrii oraz udoskonalenie systemów dostarczających światło. Problem ten mogą rozwiązać badania nad światłowodami ze specjalnymi końcówkami optycznymi. Mogłoby się to przyczynić do znalezienia nowych zastosowań dla PACT, w tym leczenia infekcji umiejscowionych podskórnymi np. ropni. Bardzo istotne jest monitorowanie wyników terapii podczas jej trwania, po jej zakończeniu oraz w czasie ewentualnych remisji. Immunologiczne aspekty PACT wymagają dalszych badań [32].

Zastosowanie PACT w leczeniu infekcji miejscowych może stać się istotnym uzupełnieniem tradycyjnych terapii przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych skracając czas ich trwania, minimalizując uboczne skutki systemowego podawania chemioterapeutyków i obniżając koszty leczenia. PACT może być też zastosowana w przypadkach, które wymagają szybkiego obniżenia ilości bakterii, wykazujących odporność na standardowe leczenie np. szczepy ze świeżo nabytą opornością [32].

Dla Taylora i Sommera PACT w przyszłości może być brana pod uwagę podczas dłuższego pobytu w kosmosie z uwagi na ograniczoną wielkość „apteczki pokładowej” [42]. Z pewnością będziemy świadkami dalszego dynamicznego rozwoju tej metody terapeutycznej.

## Piśmiennictwo

- Allison R.R., Downie G.H., Cuenca R., Hu X.H., Childs C., Sibata C.H.: Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **1**, 27–42 (2004)
- Allison R.R., Mota H.C., Sibata C.H.: Clinical PD/PDT in North America: An historical review. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **1**, 263–277 (2004)
- Allison R.R., Bagnato V.S., Cuenca R., Downie G.H., Sibata C.H.: The future of photodynamic therapy in oncology. *Future Oncol.* **2**, 53–71 (2006)
- Bagnato V.S., Kurachi C., Ferreira J., Marcassa L.G., Sibata C.H., Allison R.R.: PDT experience in Brazil: A regional profile. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2**, 107–118 (2005)
- Banfi S., Caruso E., Buccafurni L., Battini V., Zazzaron S., Barbieri P., Orlandi V.: Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: An *in vitro* study on Gram-negative and Gram positive bacteria. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **85**, 28–38 (2006)
- Biel M.: Advances in photodynamic therapy for the treatment of head and neck cancers. *Lasers Surg. Med.* **38**, 349–355 (2006)
- Brancaleon L., Moseley H.: Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med. Sci.* **17**, 173–186 (2002)
- Bristow C.A., Hudson R., Paget T.A., Boyle R.W.: Potential of cationic porphyrins for photodynamic treatment of cutaneous Leishmaniasis. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **3**, 162–167 (2006)
- Brown S.B., Brown E.A., Walker I.: The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol.* **5**, 497–508 (2004)
- Calzavara-Pinton P.G., Venturini M., Sala R.: A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **78**, 1–6 (2005)
- De Souza S.C., Junqueira J.C., Balducci I., Koga-Ito C.Y., Munin E., Jorge A.O.C.: Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **83**, 34–38 (2006)
- Donnelly R.F., McCarron P.A., Tunney M.M., Woolfson A.D.: Potential of photodynamic therapy in treatment of fungal infections of the mouth. Design and characterisation of a mucoadhesive patch containing toluidine blue O. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **86**, 59–69 (2007)
- Donnelly R.F., McCarron P.A., Tunney M.M.: Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol. Res.* **163**, 1–12 (2008)
- Dorocka-Bobkowska B., Konopka K.: Powstawanie biofilmu *Candida* i jego znaczenie w patogenezie zakażeń przewlekłych – przegląd piśmiennictwa. *Dent. Med. Probl.* **2**, 405–410 (2003)
- Dörtdudak O., Haas R., Bernhart T., Mailath-Pokorny G.: Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of peri-implantitis. *Clin. Oral Implants Res.* **12**, 104–108 (2001)
- Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korbek M., Moan J., Peng Q.: Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 889–905 (1998)
- Douglas L.J. *Candida* biofilms and their role in infections. *Trends Microbiol.* **11**, 30–36 (2003)
- Ebermann R., Alth G., Kreitner M., Kubin A.: Natural products derived from plants as potential drugs for the photodynamic destruction of tumor cells. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **36**, 95–97 (1996)
- Garwood M., Cardigan R.A., Drummond O., Hornsey V.S., Turner C.P., Young D., Williamson L.M., Prowse C.V.: The effect of methylene blue photoinactivation and methylene blue removal on the quality of fresh-frozen plasma. *Transfusion*, **43**, 1238–1247 (2003)
- Haas R., Baron M., Dörtdudak O., Watzek G.: Lethal photosensitization, autogenous bone, and e-PTFE membrane for the treatment of peri-implantitis: preliminary results. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, **15**, 374–382 (2000)
- Hamblin M.R., Hasan T.: Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem. Photobiol. Sci.* **3**, 436–450 (2004)
- Itoh Y., Ninomiya Y., Henta T., Tajima S., Ishibashi A.: Topical delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for Japanese actinic keratoses. *J. Dermatol.* **27**, 513–518 (2000)
- Konopka K., Goslinski T.: Photodynamic therapy in dentistry. *J. Dent. Res.* **86**, 694–707 (2007)
- Kömerik N., Nakanishi H., MacRobert A.J., Henderson B., Speight P., Wilson M.: *In vivo* killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 932–940 (2003)
- Kömerik N., MacRobert A.J.: Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **25**, 487–504 (2006)
- Kübler A.C.: Photodynamic therapy. *Med. Laser Appl.* **20**, 37–45 (2005)
- Lee C.F., Lee C.J., Chen C.T., Huang C.T.:  $\delta$ -Aminolaevulinic acid mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy on *Pseudomonas aeruginosa* planktonic and biofilm cultures. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **75**, 21–25 (2004)
- Mang T.S.: Lasers and light sources for PDT: past, present and future. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **1**, 43–48 (2004)
- Meisel P., Kocher T.: Photodynamic therapy for periodontal diseases: State of the art. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **79**, 159–170 (2005)
- Miyazawa S., Nishida K., Komiyama T., Nakae Y., Takeda K., Yorimitsu M., Kitamura A., Kunisada T., Ohtsuka A., Inoue H.: Novel transdermal photodynamic therapy using ATX-S10-Na(II) induces apoptosis of synovial fibroblasts and ameliorates collagen antibody-induced arthritis in mice. *Rheumatol. Int.* **26**, 717–725 (2006)
- Ogino T., Takeda M., Imaizumi H., Okushiba U.: Photodynamic therapy for age-related macular degeneration in Japanese patients: results after one year. *Jpn. J. Ophthalmol.* **51**, 210–215 (2007)
- O’Riordan K., Akilov O.E., Hasan T.: The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2**, 247–262 (2005)
- Paulino T.P., Ribeiro K.F., Thedei G. Jr., Tedesco A.C., Ciancaglini P.: Use of hand held photopolymerizer to photoinactivate *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.* **50**, 353–359 (2005)
- Pieslinger A., Plaetzer K., Oberdanner C.B., Berlanda J., Mair H., Krammer B., Kiesslich T. Characterization of a simple and homogenous irradiation device based on light-emitting diodes: a possible low-cost supplement to conventional light sources for photodynamic treatment. *Med. Laser Appl.* **21**, 277–283 (2006)
- Rovaldi C.R., Pievsky A., Sole N.A., Friden P.M., Rothstein D.M., Spacciapoli P.: Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 3364–3367 (2000)

36. Seal G.J., Ng Y.L., Spratt D., Bhatti M., Gulabivala K.: An *in vitro* comparison of the bactericidal efficacy of lethal photosensitization or sodium hypochlorite irrigation on *Streptococcus intermedius* biofilms in root canals. *Int. Endod. J.* **35**, 268–274 (2002)
37. Sharwani A., Jerjes W., Salih V., MacRobert A.J., El-Maaytah M., Khalil H.S.M., Hopper C.: Fluorescence spectroscopy combined with 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence in detecting oral premalignancy. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **83**, 27–33 (2006)
38. Sigusch B.W., Pfitzner A., Albrecht V., Glockmann E.: Efficacy of photodynamic therapy on inflammatory signs and two selected periodontopathogenic species in a beagle dog model. *J. Periodontol.* **76**, 1100–1105 (2005)
39. Smith A.W.: Biofilms and antibiotic therapy: Is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 1539–1550 (2005)
40. Soukos N.S., Stashenko P.P. i wsp.: Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J. Endod.* **32**, 979–984 (2006)
41. Spesia M.B., Durantini E.N.: Synthesis and antibacterial photosensitizing properties of a novel tricationic subphthalocyanine derivative. *Dyes Pigm.* **77**, 229–237 (2008)
42. Taylor P.W., Sommer A.P. Towards rational treatment of bacterial infections during extended space travel. *Int. J. Antimicrob. Agents* **26**, 183–187 (2005)
43. Tegos G.P., Demidova T.N., Arcila-Lopez D., Lee H., Wharton T., Gali H., Hamblin M.R. Cationic fullerenes are effective and selective antimicrobial photosensitizers. *Chem. Biol.* **12**, 1127–1135 (2005)
44. Teichert M.C., Jones J.W., Usacheva M.N., Biel M.A.: Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **93**, 155–160 (2002)
45. Wainwright M.: Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J. Antimicrob. Chemother.* **42**, 13–28 (1998)
46. Wainwright M., Crossley K.B.: Photosensitizing agents-circumventing resistance and breaking down biofilms: a review. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **53**, 119–126 (2004)
47. Wainwright M.: The development of phenothiazinium photosensitizers. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2**, 263–272 (2005)
48. Wainwright M., Mohr H., Walker W.H.: Phenothiazinium derivatives for pathogen inactivation in blood products. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **86**, 45–58 (2007)
49. Wainwright M.: Dyes in the development of drugs and pharmaceuticals. *Dyes Pigm.* **76**, 582–589 (2008)
50. Weinstein G.D., McCullough J.L., Nelson J.S., Berns M.W., McCormick A.: Low dose photofrin II photodynamic therapy of psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* **96**, 573–578 (1991)
51. Williams J.A., Pearson G.J., Colles M.J.: Antibacterial action of photoactivated disinfection {PAD} used on endodontic bacteria in planktonic suspension and in artificial and human root canals. *J. Dent.* **34**, 363–371 (2006)
52. Wood S., Nattress B., Kirkham J., Shore R., Brookes S., Griffiths J., Robinson C.: An *in vitro* study of the use of photodynamic therapy for the treatment of natural oral plaque biofilms formed *in vivo*. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **50**, 1–7 (1999)
53. Wood S., Metcalf D., Devine D., Robinson C.: Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 680–684 (2006)

Przedstawione zagadnienia stanowią treść grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego Tomasza Goślińskiego (N405 03132/2052).

Renata Wolinowska

Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny  
02-007 Warszawa, ul. Oczki 3, tel. 22 6280822, e-mail: rwolinowska@wum.edu.pl

Wpłynęło w czerwcu 2008 r.

1. Wprowadzenie. 2. Plazmidy kryptyczne. 3. Plazmidy koniugacyjne. 4. Integracja do chromosomu. 5. Megaplazmidy i plazmidy metaboliczne. 6. Podsumowanie

#### Archaeal Plasmids

**Abstract:** Numerous plasmids can be found in the cells of *Archaea*, most of them have cryptic phenotypes. Among cryptic plasmids isolated from *Crenarchaeota*, a pRN1 family has been identified. These plasmids encode a unique replication protein, harbouring both primase and DNA polymerase activity. Plasmid pSSVx of that family may be packaged into capsids of fusellovirus, due to the presence of two viral genes in its structure. The investigated conjugative plasmids were found in *Sulfolobus* species. Conjugation differs from that known for bacterial cells. Both in cryptic and conjugative plasmids, integrase gene, enabling specific plasmid integration into chromosomal DNA, may be found. In some of these integrases, attachment site is placed inside the open reading frame encoding the integrase. Integrases found in cryptic plasmids of the pRN1 family are homologous to integrases of *Archaea* viruses. In cells of halophilic and methanogenic *Archaea*, big plasmids and megaplasmids have been found that carry genes necessary for cell activity.

1. Introduction. 2. Cryptic plasmids. 3. Conjugative plasmids. 4. Chromosomal integration. 5. Megaplasmids and metabolic plasmids. 6. Summary

**Słowa kluczowe:** *Archaea*, integracja, plazmidy koniugacyjne, plazmidy kryptyczne

**Key words:** *Archaea*, chromosomal integration, conjugative plasmids, cryptic plasmids

## 1. Wprowadzenie

Archeony, zwane wcześniej archebakteriami, zasiedlają najbardziej niedostępne i nieprzyjazne dla życia regiony Ziemi, w których żyją tylko nieliczne gatunki bakterii, a organizmy eukariotyczne nie występują wcale. Wśród *Archaea* spotykamy wszystkie odmiany organizmów ekstremofilnych.

Halofilne *Archaea* rozwijają się w zbiornikach z bardzo słoną wodą, takich jak Morze Martwe. Acidofile rosną w pH niższym niż 3 i są często termofilne, alkalofile żyją w pH wyższym niż 10 i są często halofilne. Ekstremalne termofile, takie jak *Pyrolobus fumarii*, występują w hypertermalnych kominach na dnie mórz, gdzie temperatura przekracza 100°C. Natomiast psychrofile żyją w zimnej wodzie morskiej i na Antarktydzie.

Archeony metanogenne, takie jak *Methanobacterium thermoautotrophicum*, są termofilne i bezwzględnie beztlenowe. Posiadają unikatową właściwość, jaką jest metanogeneza – zdolność do pozyskiwania energii z redukcji dwutlenku węgla do metanu [9].

*Archaea* przez dziesięciolecia były uważane za bakterie, co wynikało głównie z morfologii ich komórek. Analiza rybosomalnego RNA, zaproponowana przez Carla Woesego [34], pozwoliła na wyłonienie trzeciej gałęzi ewolucyjnej – domeny: oprócz *Bacteria* i *Eukarya* pojawiły się *Archaea*. Nazwa *Archaea*,

nadana przez Woese'go nawiązuje do najstarszego okresu w dziejach Ziemi – archaiku (ang. Archaean) i początków życia.

Ilość informacji na temat *Archaea* gwałtownie rośnie w ostatnich latach. Identyfikowane są nowe gatunki archeonów, ale wiele danych pochodzi z analizy próbek pochodzących wprost ze środowiska. Poszukuje się w nich rRNA i genomowego DNA, który następnie jest sekwencjonowany i analizowany komputerowo, bez konieczności izolacji i hodowli organizmu, z którego pochodzi [8, 31]. Ponad 75% dostępnych obecnie sekwencji rRNA dla archeonów pochodzi od organizmów, które nigdy nie zostały wyhodowane [28]. Badania środowiskowe pozwoliły ustalić, że przedstawiciele *Archaea* żyją we wszystkich środowiskach; w morzach, wodach słodkich, osadach dennych, glebie, na korzeniach roślin, w przewodach pokarmowych przeżuwaczy i bezkręgowców [18, 28], a także w jamie ustnej i jelitach ludzi [19]. Te dane sprawiają, że konieczne jest nowe spojrzenie na mikroorganizmy z domeny *Archaea*, gdyż nie da się dłużej traktować ich tylko jako ekstremofili – żywych skamienielin z czasu początków życia na Ziemi. Szacuje się, że komórki *Archaea* mogą stanowić od 10 do 20% całej biomasy Ziemi [8, 28]

Obecnie domenę *Archaea* dzieli się na cztery jednostki, określane jako typy lub królestwa – *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota*, *Nanoarchaeota* i *Korarchaeota* [13, 26].

*Euryarchaeota* są królestwem najbardziej zróżnicowanym, zawiera ono archeony metanogenne, halo-filne oraz gatunki termofilne i psychrofilne. Do tego królestwa należą, omawiane w poniższym tekście: rząd *Thermococcales* z rodzajem *Pyrococcus*, archeony metanogenne z rodzajami *Methanococcus* i *Methanobacterium*, ekstremalne termofile, jak *Pyrococcus furiosus*, oraz archeony halofilne – *Haloferax volcanii*, *Halo-bacterium* sp. i *Natronobacterium*.

*Crenarchaeota* grupuje ekstremalne termofile i nie-liczne psychrofile. Należą do nich omawiane poniżej rodzaje *Sulfolobus* i *Acidianus*. Do *Sulfolobus* należą organizmy tlenowe, acydofile, o optymalnej temperaturze wzrostu ok. 80°C. Gatunki z tego rodzaju izolowano z gorących, siarkowych źródeł na Islandii, we Włoszech, Japonii, Nowej Zelandii, Rosji i Stanach Zjednoczonych. W środowisku naturalnym drobno-ustroje te są chemolitoautotrofami, pozyskują energię przeprowadzając, w warunkach tlenowych, związki siarki w kwas siarkowy. Potrafią funkcjonować także jako heterotrofy wykorzystujące różne związki organiczne jako źródło węgla i azotu. W warunkach laboratoryjnych organizmy te dają się względnie łatwo hodować na podłożach płynnych i stałych. Są modelowymi przedstawicielami *Archaea*. *S. solfataricus* i *S. acidocaldarius*, wyizolowane z gorących źródeł Parku Yellowstone, są najlepiej scharakteryzowanymi przedstawicielami tej grupy [5].

*Nanoarchaeota* zawiera pojedynczy gatunek *Nanoarchaeum equitans*. Jest to bezwzględny symbiont, zależny od gatunku *Ignicoccus hospitalis*, archeona należącego do *Crenarchaeota* [14, 15]. Genom *N. equitans* o wielkość 491 tys. par zasad (kpz) jest rekordowo mały i bardzo silnie upakowany, 95% jego objętości to sekwencje kodujące [33]. Według jednych autorów jest to prawdopodobnie pierwszy z wielu gatunków, które niebawem zostaną odkryte [25], według innych autorów wydzielenie nowego królestwa jest w tym przypadku przedwczesne i nieuzasadnione [13, 18].

Typ *Korarchaeota* grupuje sekwencje kwasów nukleinowych uzyskane z analizy próbek środowiskowych. Dane te należy traktować jako cenne, ale wstępne informacje [3, 18].

## 2. Plazmidy kryptyczne

Ilość informacji na temat plazmidów obecnych w komórkach *Archaea* jest niewielka, zwłaszcza jeśli porównać ją z ilością danych na temat plazmidów bakteryjnych. Można jednak sądzić, że plazmidy występują u tych organizmów powszechnie; w rzędzie *Thermococcales*, należącym do intensywnie badanej grupy metanogenów, stwierdzono plazmidy u 20% badanych szczepów [11]. Większość wyizolowanych i zbadanych

plazmidów są to plazmidy kryptyczne, kilka z nich zostało w całości zsekwencjonowanych.

Bardzo intensywnie badaną grupą archeonów jest rodzaj *Sulfolobus*, w tym gatunki *S. islandicus*, *S. solfataricus* i *S. tokodaii* [20]. Plazmidy wyizolowane z rodzaju *Sulfolobus* tworzą rodzinę pRN. W jej skład wchodzi pRN1, pRN2, pSSVx i pHEN7, pochodzące z *Sulfolobus islandicus* (REN1H1) [11], oraz pDL10, wyizolowany z *Acidianus ambivalens* [16]. Plazmidy występują w komórkach gospodarzy w formie autonomicznych cząsteczek lub są zintegrowane z chromosomem. Te ostatnie wykryto w genomach *S. solfataricus* (pXQ1) i *S. tokodaii* (pST1, pST3) [30]. Mają wielkość od 5,0 do 7,8 kpz. Plazmidy pDL10 i pSSVx występują w stosunkowo wysokiej liczbie kopii – od 15 do 35 na komórkę, mogą występować w formie zrelaksowanej lub superskręconej. W każdym z tych plazmidów można wyróżnić konserwowany obszar o wielkości 4–4,5 kpz, który może funkcjonować jako minireplikon. Obszar ten koduje trzy charakterystyczne białka: białko RepA – warunkujące replikację plazmidu, białko CopG (ang. copy control protein) – regulujące liczbę kopii plazmidu i białko PlrA (plasmid regulator A), silnie wiążące się z DNA [11]. Dla plazmidu pRN1 wykazano istnienie czterech ważnych transkryptów. Pierwszy powstaje po transkrypcji genów *copG* i *repA*, drugi genu *plrA*, dwa kolejne są antytranskryptami komplementarnymi do 5'końcowej części pierwszego i drugiego transkryptu. Obecność antysensownego RNA powoduje, poprzez komplektację matrycowego RNA, ograniczenie ekspresji genów *copA*, *repA* i *plrA* [4]. Podobny mechanizm jest wykorzystywany w przypadku regulacji replikacji kryptycznych plazmidów bakteryjnych. Białko CopG w postaci tetrameru wiąże się z sekwencją o długości 12 par zasad (pz), w obrębie której znajduje się punkt startu transkrypcji genów *copG* i *repA*. Jest to drugi mechanizm ograniczający ekspresję genów *copG* i *repA* [11]. Podobne właściwości wykazuje białko PlrA, wiąże się ono z sekwencją powyżej kodującego go genu. W plazmidzie stwierdzono dwie takie sekwencje, oddalone od siebie o 65 pz; podobna struktura znajduje się także w plazmidach koniugacyjnych *Archaea*. Białko PlrA wiążąc się z DNA tworzy multimeryczny kompleks [20].

Produkt genu *repA* jest białkiem o unikatowej strukturze i funkcji. Jest to duże białko, zbudowane z 900–1000 aminokwasów, kodujący go gen stanowi jedną trzecią lub nawet połowę wielkości plazmidów z rodziny pRN. Szczegółowym badaniom poddano gen *repA* zlokalizowany w plazmidzie pRN1. 255 aminokwasów stanowiących N-końcową część białka ma aktywność primazy i polimerazy DNA. Jest zdolne do syntezy *de novo* starterów złożonych z 8 deoksynukleotydów, następnie, dzięki aktywności polimerazy

DNA syntetyzowany jest łańcuch DNA o długości tyśięcy zasad. Badając aktywność produktu sklonowanego genu *repA* wykazano, że aminokwasy w pozycji 111 (asparagina), 113 (glutamina), 171 (asparagina) są krytyczne dla aktywności enzymu i że centrum aktywne jest wspólne dla obu aktywności – primazy i polimerazy DNA [21]. Fragment obejmujący aminokwasy 550–800 białka RepA posiada aktywność helikazy o polarności 3'-5'. Sekwencja wykazuje homologię do helikaz z superrodziny III, utworzonej z białek kodowanych przez plazmidy bakteryjne i wirusy. N-końcowa część białka, posiadająca podwójną aktywność primaza/polimeraza, nie wykazuje żadnej homologii do znanych białek [20]. Stwierdzono podobieństwo do primazy innego archeona, *Pyrococcus furiosus*, ale ogranicza się ona do czterech zasad w centrum aktywnym enzymu [2]. Tak nieznaczna homologia może wynikać zarówno z daleko posuniętej ewolucyjnej dywergencji białek pochodzących od wspólnego przodka, jak i z ewolucyjnej konwergencji.

Białko RepA stanowi nowy typ białka replikacyjnego. Właściwości domeny mającej aktywność primazy/polimerazy wskazują, że powstała ona niezależnie od primaz i polimeraz DNA opisanych dla świata bakterii i eukariontów. Wstępny schemat replikacji plazmidów z rodziny pRN składał by się z następujących etapów: białko RepA lub kompleks RepA-PlrA rozpoznaje punkt startu replikacji, następnie domena helikazowa białka RepA rozwija DNA w obszarze startu replikacji dzięki energii pozyskiwanej z ATP. Aktywność primazy białka RepA pozwalałaby na syntezę starterów z deoksynukleotydów. Elongację nici może prowadzić białko RepA dzięki swojej aktywności polimerazy DNA. Białko RepA wykazuje niską efektywność katalityczną, dodatkowo nie stwierdzono u niego ani aktywności nukleolitycznej 3'-5', ani 5'-3'. Możliwe jest zatem, że opisane wyżej enzymy inicjują replikację plazmidów z rodziny pRN i jest ona kontynuowana przez maszynię replikacyjną komórki gospodarza. Aktywność białka CopG ogranicza ilość białka replikacyjnego RepA w komórce, spada więc częstość inicjacji replikacji, co prowadzi do zmniejszenia liczby kopii plazmidu w komórce. Zjawiska te składają się na opisywaną wcześniej aktywność białka CopG jako regulatora liczby kopii plazmidu [20].

Zgromadzone dane nie pozwalają na przypisanie plazmidom z rodziny pRN żadnego ze znanych modeli replikacji. W przypadku plazmidów pGT5 i pRT1, wyizolowanych z różnych gatunków z rodzaju *Pyrococcus* wykazano, że replikują się one według modelu toczącego się koła (ang. rolling circle replication) [10, 32]. Plazmid pNB101, pochodzący z haloarcheona *Natronobacterium* sp., także replikuje się według modelu toczącego się koła, ale posiada unikatowy system regulacji replikacji [36].

Plazmidy pHEN7 i pDL10 zawierają dodatkowe ramki odczytu o nieznannej funkcji. Są one otoczone sekwencjami TTAGAATGGGGATTC. Sekwencję tę i sekwencje do niej zbliżone określa się jako  $R_m$ . Występują one także w małych plazmidach, pRN1 i pRN2, dwie takie sekwencje są rozdzielone kilkoma parami zasad. Uważa się, że rekombinacja z udziałem tych obszarów jest odpowiedzialna za rearanżacje w cząsteczce plazmidu. Polegają one na odwracalnym włączaniu fragmentów DNA do cząsteczki plazmidu, co jest źródłem zmienności w populacji plazmidów [25]. Bardzo wysoką stabilnością strukturalną i segregacyjną charakteryzuje się plazmid pIT3, wyizolowany z *S. solfataricus* IT3. Plazmid pIT3 jest niekiedy zaliczany do rodziny pRN, ale ze względu na szereg unikatowych właściwości bywa też z niej wydzielany [27]. Analiza genomowego DNA *Archaea* wskazuje na wysoką częstość „tasowania” informacji genetycznej, znaczny udział mają w tym elementy mobilne, a zwłaszcza sekwencje insercyjne [7, 6].

Plazmidy pTAU4, pTIK4 i pORA1, pochodzące z *S. neozelandicus*, posiadają homologiczny obszar, obserwowany tylko w tych cząsteczkach, co może być związane z ich specyficznością względem gospodarza. Plazmidy te różnią się pomiędzy sobą w zakresie białek replikacyjnych, pTIK4 i pORA1 zawierają homologi genu *repA*, kodującego opisaną wcześniej domenę primaza/polimeraza, a w strukturze plazmidu pTAU4 nie stwierdzono takiego genu. Plazmid ten niesie gen kodujący białko MCM (ang. minichromosome maintenance) homologiczne do helikazy eukariontów. Odkrycie genu kodującego białko MCM w plazmidzie pTAU4 i obecność w C-końcowej części białka RepA obszaru wykazującego homologię do eukariotycznych helikaz z superrodziny III sugeruje, że krytyczne plazmidy *Archaea* wymagają aktywności helikazy do replikacji [20].

Unikatowy sposób rozprzestrzeniania opisano dla plazmidu pSSVx, wyizolowanego z *S. islandicus* REY15/4; wykorzystuje on aktywność jednego z wirusów *Archaea*. Wirusy występujące w komórkach *Sulfolobus* dzieli się na cztery rodziny: *Fuselloviridae*, *Rudiviridae*, *Lipothrixviridae* i *Guttaviridae*. Najlepiej poznana grupa to *Fuselloviridae*, wirusy, których genom ma wielkość ok. 15 kpb., a kapsyd – kształt wrzeciona. Ich replikacja i uwalniania do środowiska nie powoduje lizy komórek gospodarza. Spośród 18 ramek odczytu, które kodują białka konserwowane w tej grupie wirusów, tylko w przypadku czterech ustalono funkcję. Trzy białka stanowią element strukturalny kapsydu, a czwarte jest integracją odpowiedzialna za włączanie genomu wirusa do chromosomu gospodarza [20]. Plazmid pSSVx może być pakowany do kapsydów fusellowirusa SSV2, który występuje w szczepie REY15/4. Jest to związane z obecnością w strukturze

Tabela I

## Plazmidy archeonów metanogennych

Archeon	Plazmid	Wielkość (kpz)	Sekwencja* lub publikacja
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> Marburg	pME2001	4,5	X1720
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> ZH3	pME2200	6,2	[22]
<i>Methanobacterium thermoformicicum</i> THF	pFV1	13,5	[23]
<i>Methanobacterium thermoformicicum</i> Z-245	pFZ1	11	[23, 24]
<i>Methanobacterium thermoformicicum</i> FTF	pFZ2	11	[24]
<i>Methanococcus maripaludis</i>	pURB500	8,3	U47023
<i>Methanococcus</i> st. AG86	pURB900	20	[35]
<i>Methanococcus jamnasachii</i>	pURB800	64	L77118
<i>Methanococcus jamnasachii</i>	pURB801	18	L77119
<i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A	pC2A	5,5	U78295

\* Numer zgłoszenie do bazy danych GenBank NCBI (National Centre for Biotechnology Information, Stany Zjednoczone)

pSSVx dwóch ramek odczytu, homologicznych do ORF-ów występujących w genomie fusellowirusów. Plazmid pSSVx jest więc naturalnym, wywodzącym się z *Archaea*, odpowiednikiem fagemidów, wektorów stworzonych na potrzeby inżynierii genetycznej przez połączenie genów fagów i plazmidów bakteryjnych. Wszystkie opisane dotychczas plazmidy z rodziny pRN zostały wyizolowane z komórek *Crenarchaeota*. Plazmidy te nie wykazują istotnej homologii do znanych plazmidów *Archaea* i *Eubacteria* [11].

W przypadku archeonów metanogennych plazmidy obserwowano zarówno w szczepach gatunków termofilnych jak i mezofilnych (tab. I). Dostępne są tylko nieliczne informacje na temat tych cząsteczek: występują w niskiej liczbie kopii w komórce, posiadają dużą liczbę odwróconych i prostych sekwencji powtórzonych, związanych z replikacją lub rekombinacyjną zmiennością plazmidów [17]. Ustalono pełną sekwencję nukleotydową plazmidu pURB500 z *Methanococcus maripaludis* i stwierdzono, że zawiera on 18 ramek odczytu. Tylko jednej z nich udało się przypisać potencjalną aktywność produktu: jest to integraza [22].

### 3. Plazmidy koniugacyjne

Plazmidy koniugacyjne wyizolowane z komórek *S. islandicus* mają wielkość od 24,6 do 41,2 kpz. Dotychczas przeanalizowano 15 plazmidów, które podzielono na klasy; plazmidy należące do jednej klasy wykazują znaczną homologię sekwencji nukleotydowej.

Ustalono pełną sekwencję nukleotydową sześciu plazmidów koniugacyjnych [12 i NC005969.1]. Wykazują one znaczne podobieństwa w strukturze. Najbardziej konserwowane geny są zebrane w dwa klaster. W pierwszym z nich zlokalizowane jest sześć genów, stanowiących podstawę aparatu koniugacyj-

nego *Archaea*. Drugi klaster zawiera siedem genów, w tym geny *copG* i *plrA*, które związane są z replikacją, oraz gen *int* kodujący integrazę. Gen *copG* występuje zarówno w plazmidach kryptycznych jak i koniugacyjnych, stwierdzono także jego obecność w genomach wirusów *Archaea*. Gen *plrA* obecny jest również we wszystkich analizowanych dotychczas plazmidach koniugacyjnych *Archaea*. Konserwowana jest także odwrócona powtórzona sekwencja, do której wiąże się białko PlrA, oraz dystans, 65 pz, oddzielający dwie takie sekwencje. Stopień konserwowania tych struktur wskazuje na znaczenie ich funkcji dla komórki [11].

W sekwencji plazmidów z rodziny pING (*S. islandicus*) stwierdzono obecność sekwencji powtórzonych. W przypadku plazmidu pING1 jest to sekwencja TAAACTGGGGAGTTTA. W innych plazmidach koniugacyjnych stwierdzono podobne sekwencje powtórzone, zawierające charakterystyczny motyw czterech reszt guaninowych. W obrębie tych sekwencji może dochodzić do rekombinacji, prowadzących do powstawania delecyjnych form plazmidów. Analogiczne zjawisko opisano dla plazmidów kryptycznych [11].

Zjawisko partycji nie jest dostatecznie zbadane w przypadku plazmidów koniugacyjnych. W strukturze kilku plazmidów znaleziono geny kodujące homologi, lub fragmenty homologów, białek ParA i ParB oraz klaster krótkich powtórzonych sekwencji, które mogą być obszarem wiązania ParB. Można sądzić, że w tych przypadkach mechanizm partycji jest analogiczny do tego obserwowanego w komórkach bakteryjnych.

Opisano rozprzestrzenianie się plazmidów na drodze koniugacji. W tym przypadku nie dochodzi do formowania pili, koniugacja zachodzi poprzez rozległy kontakt komórek. Przebiega dość wydajnie, prowadząc do rozprzestrzenienia się plazmidu na całą hodowlę archeona, plazmidy replikują się do wysokiego poziomu 20–40 kopii na komórkę. W strukturze plaz-



midów dochodzi często do rearanżacji. W wyniku tych procesów niektóre plazmidy tracą geny *parA* i *parB*, co skutkuje spadkiem stabilności plazmidów, a niekiedy ich gubieniem. Delecyjne pochodne plazmidów koniugacyjnych mogą podlegać kokoniugacji.

W pierwszym z dwóch klastrów obserwowanych w strukturze plazmidów koniugacyjnych zlokalizowane jest sześć genów związanych z koniugacją. Dwa z nich wykazują niewielką homologię do genów kodujących bakteryjne białka TraG i TrbE, które uczestniczą w przemieszczaniu jednoniciowego DNA przez błony komórkowe. Motywy Walkera (A i B) wskazują, że białka te mogą hydrolizować ATP, uzyskując w ten sposób energię. Trzecie białko zawiera liczne domeny transmembranowe, które mogą tworzyć pory w błonach komórek gospodarza [11]. Wydaje się, że stosunkowo niewielka liczba białek uczestniczy w procesie koniugacji archeonów, a koniugacja przebiega według innego mechanizmu niż ten opisany dla proteobakterii [20].

#### 4. Integracja do chromosomu

Plazmidy kryptyczne i koniugacyjne *Archaea* mogą kodować integrazy, których aktywność umożliwia odwracalne włączanie plazmidu do DNA chromosomalnego. Miejscem integracji jest najczęściej gen tRNA, podobnie jak w przypadku bakterii, ale integrazy nie wykazują istotnej homologii sekwencji do integras bakterijnych.

Integrazy wykryto u fusellowirusa SSV1 występującego w komórkach *Sulfolobus*, potem homologiczne geny znaleziono w genomach wielu wirusów z tej rodziny [20]. Wydaje się, że plazmidy, w tym plazmidy z rodziny pRN, wykorzystują ten typ integrazy. Miejsce *att* (ang. attachment site), w którym cząsteczka plazmidu zostanie rozcięta, by zostać włączona do chromosomu, znajduje się w obrębie ramki odczytu kodującej integrasę (*int*), w jej początkowej części. Proces integracji prowadzi do uszkodzenia genu, a sekwencja włączona jest oflankowana fragmentami genu integrazy (*intN* i *intC*). Taki obraz stwierdzono dla plazmidów pXQ1 (*S. solfataricus*) i pST1 (*S. tokodaii*). Powstałe w wyniku integracji fragmenty genu *int* znajdowano w genomach różnych archeonów w wielu kopiach, flankują one obszary DNA o wielkości od 4 do 67 kbp. Znajdują się tam zintegrowane plazmidy, ale także geny kodujące enzymy metaboliczne. Ten rodzaj integracji prowadzi do uszkodzenia genu integrazy, jest więc nieodwracalny. Zapewne włączony fragment może zostać wycięty, gdy integrasa zostanie wytworzona dzięki obecności plazmidu, niosącego nieuszkodzony gen, lub obecności wirusa. Komórki *S. acidocaldarius* mają zdolność wymiany materiału genetycznego. Aktywność ta jest łączona z obecnością w ich genomie

plazmidu pSAC3, który otaczają fragmenty *intN* i *intC* integrazy. Opisano także plazmid pST3, należący do rodziny pRN, w przypadku którego miejsce integracji jest zlokalizowane poza sekwencją kodującą genu *int* [11].

Aktywność integrazy kodowanej przez plazmidy koniugacyjne także prowadzi do integracji do chromosomu. Najlepiej zbadanym przykładem jest plazmid pNOB8 pochodzący z *S. solfataricus* [30]. W przypadku plazmidów koniugacyjnych nie dochodzi do rozbicia na części genu integrazy w momencie włączania do chromosomu. Niektórzy autorzy dzielą integrazy na dwie klasy: typ NOB8 – nie podlegające podziałowi przy integracji i typ SSV, w przypadku którego następuje rozerwanie genu *int* [20].

#### 5. Megaplazmidy i plazmidy metaboliczne

Plazmidy o wysokiej masie cząsteczkowej obserwowano w komórkach wielu szczepów halofilnych archeonów. *Haloferax volcanii* niesie trzy plazmidy o wielkości 690, 442 i 86 kbp. W komórkach *Halobacterium* NRC-1 stwierdzono obecność dwóch plazmidów, które określa się jako minichromosomy, gdyż mają wielkość 365 i 191 kbp i zawierają geny niezbędne do funkcjonowania komórki. Duża część ich sekwencji (145 kbp) jest identyczna. Postuluje się, że powstały z połączenia trzech różnych plazmidów, a następnie zostały powiększone przez włączenie genów chromosomalnych przy udziale sekwencji insercyjnych. *Halobacterium salinarium* posiada plazmid pHH1, który zawiera region *vac* grupujący geny warunkują formowanie się kanalików gazowych. Gaz gromadzący się w kanalikach umożliwia komórkom regulowanie poziomu zanurzenia w wodzie, co zapewnia im dostateczny dostęp do światła. Mikroorganizm ten rozwinął niezwykle system pozwalający mu na syntezę ATP z ADP dzięki reakcji fotochemicznej, zachodzącej na błonie cytoplazmatycznej komórki. W plazmidach *Methanobacterium thermoformicum* zlokalizowano dwa różne systemy restrykcja-modyfikacja [11, 23, 24].

#### 6. Podsumowanie

*Archaea* stanowią trzecią, najpóźniej odkrytą domenę życia. Ewolucja tych organizmów przebiegała w znacznym stopniu niezależnie od ewolucji pozostałych domen. *Archaea* posiadają szereg właściwości niespotykanych u innych istot żywych. Jest to specyficzna budowa błon komórkowych, własny system enzymów związanych z replikacją DNA, odwrotna gyraza DNA, zapewniająca właściwy stopień zwinięcia DNA u archeonów termofilnych oraz zdolność do metanogenezy archeonów metanogennych.

Stwierdzenie licznej obecności archeonów poza środowiskami ekstremalnymi na pewno zwiększy zainteresowanie tą grupą drobnoustrojów. Trwają badania mające na celu ustalenie wpływu *Archaea* na zdrowie ludzi. Zważywszy na ich niezależną ewolucję można mieć nadzieje, że są to organizmy niepatogenne, ale z drugiej strony brak takich danych może wynikać z braku technik pozwalających na hodowanie tych drobnoustrojów. Opublikowano wyniki badań, które pozwalają wiązać obecność *Archaea* z rozwojem parazytozy [19].

Analiza plazmidowego DNA jest bardzo interesującym obszarem badawczym. Plazmidy *Archaea* posiadają właściwości, które różnią je od plazmidów bakteryjnych. Badania nad plazmidowym DNA to pierwszy krok konstrukcji narzędzi do badań molekularnych nad archeonami. Istnieją już dobre wektory plazmidowe *Archaea*, które umożliwiają przeprowadzanie podstawowych manipulacji genetycznych [1, 11, 17, 20]. Enzymy pochodzące z organizmów ekstremofilnych, ze względu na ich unikatowe cechy, znalazły już wiele zastosowań przemysłowych. Białko Myc, uzyskane z archeonów, znalazło zastosowanie w testach onkologicznych do poszukiwania przeciwciał w surowicy pacjentów, gdyż wykazuje cenną, szczególnie silną reaktywność. Należy jednak pamiętać, że w genomach tych *Archaea*, które w całości zostały zsekwencjonowane, 25–40% genów pozostaje nierozpoznanych, nie przypisano im żadnej funkcji [28]. Liczby te wskazują, jak wiele w przypadku *Archaea* jest jeszcze do odkrycia. Zapewne dotychczas zbadane zostały głównie zjawiska najbardziej podobne do znanych ze świata bakterii i eukariontów.

## Piśmiennictwo

- Allers T., Mevarech M.: Archaeal genetics – the third way. *Nature Rev. Genet.* **6**, 58–73 (2005)
- Augustin M.A., Huber R., Kaiser J.T.: Crystal structure of a DNA-dependent RNA polymerase (DNA primase). *Nature Struct. Biol.* **8**, 57–61 (2001)
- Barns S.M., Delwiche C.F., Palmer J.D., Pace N.R.: Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 9188–9193 (1996)
- Berkner S., Lipps G.: Characterization of the transcriptional activity of the cryptic plasmid pRN1 from *Sulfolobus islandicus* REN1H1 and regulation of its replication operon. *J. Bacteriol.* **189**, 1711–1721 (2007)
- Bernander R.: The cell cycle of *Sulfolobus*. *Mol. Microbiol.* **66**, 557–562 (2007)
- Brügger K., Redder P., She Q., Confalonieri F., Zivanovic Y., Garrett R.A.: Mobile elements in archaeal genomes. *FEMS Microbiol. Lett.* **206**, 131–141 (2002)
- Brügger K., Torarinnsson E., Redder P., Chen L., Garrett R.A.: Shuffling of *Sulfolobus* genomes by autonomous and non-autonomous mobile elements. *Thermophiles*, **32**, 179–183 (2003)
- DeLong E.F., Pace N.R.: Environmental diversity of bacteria and archaea. *Syst. Biol.* **50**, 470–478 (2001)
- Deppenmeier U.: The unique biochemistry of methanogenesis. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **71**, 223–283 (2002)
- Erauso G., Marsin S., Benbouzid-Rollet N., Baucher M.F., Barbeyron T., Zivanovic Y., Prieur D., Forterre P.: Sequence of plasmid pGT5 from the archaeon *Pyrococcus abyssi*: evidence for rolling-circle replication in a hyperthermophile. *J. Bacteriol.* **178**, 3232–3237 (1996)
- Garrett R.A., Redder P., Greve B., Brügger K., Chen L., She Q.: Archaeal plasmids (w) Plasmid biology, red. B.E. Funnel, G.J. Phillips, ASM Press, Washington, DC., 2004, s. 377–392
- Greve B., Jensen S., Brügger K., Zillig W., Garrett R.A.: Genomic comparison of archaeal conjugative plasmids from *Sulfolobus*. *Archaea*, **1**, 231–239 (2004)
- Gribaldo S., Brochier-Armanet C.: The origin and evolution of Archaea: a state of the art. *Phil. Trans. R. Soc. B*, **361**, 1007–1022 (2006)
- Huber H., Hohn M.J., Rachel R., Fuchs T., Wimmer V.C., Stetter K.O.: A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature*, **417**, 63–67 (2002)
- Jahn U., Gallenberger M., Paper W., Junglas B., Eisenreich W., Stetter K.O., Rachel R., Huber H.: *Nanoarchaeum equitans* and *Ignicoccus hospitalis*: new insights into a unique, intimate association of two archaea. *J. Bacteriol.* **190**, 1743–1750 (2008)
- Kletzin A., Lieke A., Urich T., Charlebois R.L., Sensen C.W.: Molecular analysis of pDL10 from *Acidianus ambivalens* reveals a family of related plasmids from extremely thermophilic and acidophilic archaea. *Genetics*, **152**, 1307–1314 (1999)
- Lange M., Ahring B.K.: A comprehensive study into the molecular methodology and molecular biology of methanogenic Archaea. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 553–571 (2001)
- Lebedinsky A.V., Chernyh N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A.: Phylogenetic systematics of microorganisms inhabiting thermal environments. *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 1299–1312 (2007)
- Lepp, P.W., Brinig M.M., Ouverney C.C., Palm K., Armitage G.C., Relman D.A.: Methanogenic *Archaea* and human periodontal disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 6176–6181 (2004)
- Lipps G.: Plasmids and viruses of the thermoacidophilic crenarchaeote *Sulfolobus*. *Extremophiles*, **10**, 17–28 (2006)
- Lipps G., Röther S., Hart C., Krauss G.: A novel type of replicative enzyme harboring ATPase, primase and DNA polymerase activity. *EMBO J.* **22**, 2516–2525 (2003)
- Luo Y., Leisinger T., Wasserfallen A.: Comparative sequence analysis of plasmids pME2001 and pME2200 of *Methanobacter marburgensis* strains Marburg and ZH3. *Plasmid*, **45**, 18–30 (2001)
- Nölling J., de Vos W.M.: Characterization of the archaeal, plasmid-encoded type II restriction-modification system *MthII* from *Methanobacterium thermoformicum* THF: homology to the bacterial NgoPII system from *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **174**, 5719–5726 (1992)
- Nölling J., de Vos W.M.: Identification of the CTAG-recognizing restriction modification systems *MthZI* and *MthFI* from *Methanobacterium thermoformicum* and characterization of the plasmid-encoded *mthZIM* gene. *Nucleic Acids Res.* **20**, 5047–5052 (1992)

25. Peng X., Holz I., Zilling W., Garrett R.A., She Q.: Evolution of the family of pRN plasmids and their integrase-mediated insertion into the chromosome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Mol. Biol.* **303**, 449–454 (2000)
26. Pikuta E.V., Hoover R.B., Tang J.: Microbial extremophiles and the limits of life. *Critical Reviews in Microbiology*, **33**, 183–209 (2007)
27. Prato S., Cannio R., Klenk H.-P., Contursi P., Rossi M., Bartolucci S.: pIT3, a cryptic plasmid isolated from the hyperthermophilic crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* IT3. *Plasmid*, **56**, 35–45 (2006)
28. Robertson Ch.E., Harris J.K., Spear J.R., Pace N.R.: Phylogenetic diversity and ecology of environmental Archaea. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 638–642, (2005)
29. She Q., Brügger K., Chen L.: Archaeal integrative genetic elements and their impact on genome evolution. *Res. Microbiol.* **153**, 325–332 (2002)
30. She Q., Phan H., Garrett R.A., Albers S.V., Stedman K.M., Zilling W.: Genetic profile of pNOB8 from *Sulfolobus*: the first conjugative plasmid from an archaeon. *Extremophiles*, **2**, 417–425 (1998).
31. Tringe S.G., Von Mering C., Kobayashi A., Salamov A.A., Chen K., Chang H.W., Podar M., Short J.M., Mathur E.J., Detter J.C., Bork P., Hugenholtz P., Rubin E.M.: Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, **308**, 554–557 (2005)
32. Ward D.E., Revet I.M., Nandakumar R., Tuttle J.H., de Vos W.M., van der Oost J., DiRuggiero J.: Characterization of plasmid pRT1 from *Pyrococcus* sp. strain JT1. *J. Bacteriol.* **184**, 2561–2566 (2002)
33. Waters E., M. Noordewier i wsp.: The genome of *Nanoarchaeum equitans*: insights into early archaeal evolution and derived parasitism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 12984–12988 (2003), (cytowana praca jest dziełem 20 autorów)
34. Woese C.R., Fox G.E.: Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5088–5090 (1977)
35. Zhao H., Wood A.G., Widdel F., Bryant, M.P., An extremely thermophilic *Methanococcus* from a deep sea hydrothermal vent and its plasmid. *Arch. Microbiol.* **150**, 178–183. (1988).
36. Zhou M., Xiang H., Sun Ch., Li Y., Liu J., Tan H.: Complete sequence and molecular characterization of pNB101, a rolling-circle replication plasmid from the haloalkaliphilic archaeon *Natronobacterium* sp. strain AS7091. *Extremophiles*, **8**, 91–98 (2004)



**Anna Sikora**

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa  
tel. (022) 592-33-37, [annaw@ibb.waw.pl](mailto:annaw@ibb.waw.pl)

*Wpłynęło w maju 2008 r.*

1. Wprowadzenie. 2. Produkcja wodoru w procesach biologicznych. 2.1. Bezpośrednia biofotoliza. 2.2. Pośrednia biofotoliza. 2.3. Fermentacje bakteryjne. 2.3.1. Powstawanie pirogronianu. 2.3.2. Fermentacja masłowo-butanolowa. 2.3.3. Fermentacja kwasów mieszanych. 2.3.4. Regulacja produkcji wodoru w czasie fermentacji kwasów mieszanych. 2.3.5. Substraty fermentacji. 2.3.6. Wydajność produkcji wodoru w procesie fermentacji. 2.3.7. Sposoby zwiększania wydajności produkcji wodoru w procesach fermentacji. 2.4. Fotofermentacja. 2.5. Procesy fermentacyjne zachodzące w żwaczu. 2.6. Hydrogenosomy. 2.7. Hydrogenazy. 2.8. Bakterie redukujące siarczyn. 3. Podsumowanie

### Hydrogen production by microorganisms

*Abstract:* Hydrogen is considered as an attractive energy carrier that can replace conventional fossil fuels in the future. Current methods of hydrogen production are based on conventional fossil fuels like natural gas, petroleum and coal. These methods are energy-expensive and cause environmental pollution. This is the reason behind the great interest in hydrogen production from biomass by microorganisms under anaerobic conditions. This direction seems to be very attractive because biomass is a versatile and renewable energy source and can be a method of utilization of various organic wastes. The article presents known biological processes leading to hydrogen production: dark fermentation, photofermentation, direct and indirect biophotolysis, anaerobic respiration of sulphate-reducing bacteria under conditions of sulphate depletion. Dark fermentation and dark fermentation followed by photofermentation seem to be the most promising concepts for the future applications. Many investigations now are focused on improving the yield of hydrogen during fermentation. Molecular techniques like the analysis of 16S rRNA gene or fluorescent *in situ* hybridization (FISH) are employed to identify and isolate new species of hydrogen-producing bacteria. Hydrogenases are key enzymes responsible for hydrogen evolution in all of the known biological processes. They are metalloenzymes carrying out a simple chemical reaction:  $2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2$ . In anaerobic hydrogen-producing eukaryotic microorganisms hydrogenases are usually located in special organelle – hydrogenosomes. Hydrogenosomes are an adaptation to anaerobic conditions and become energetic centers of the cell. Microorganisms responsible for hydrogen production in rumen, a specific fermentative chamber, are also described.

1. Introduction. 2. Hydrogen production in biological processes. 2.1. Direct biophotolysis. 2.2. Indirect biophotolysis. 2.3. Dark fermentation. 2.3.1. Pirogronian formation. 2.3.2. Butyrate-butanol fermentation. 2.3.3. Mixed-acid fermentation. 2.3.4. Regulation of hydrogen production during mixed-acid fermentation. 2.3.5. Substrates for hydrogen fermentation. 2.3.6. Hydrogen yield during fermentation. 2.3.7. Improvement of hydrogen yield during fermentation. 2.4. Photofermentation. 2.5. Rumen fermentation. 2.6. Hydrogenosomes. 2.7. Hydrogenases. 2.8. Sulphate reducing bacteria. 3. Summary

---

**Słowa kluczowe:** wodór, fermentacja, biomasa, hydrogenazy, fotoprodukcja

**Key words:** hydrogen, fermentation, biomass, hydrogenases, fotoproduktion

---

## 1. Wprowadzenie

Wodór, najlżejszy ze znanych gazów, pierwiastek chemiczny rozpoczynający układ okresowy, uważany jest za jeden z istotniejszych nośników energii przyszłości, określane jest nawet mianem paliwa XXI wieku. Zainteresowanie wodorem jako paliwem energetycznym wynika z perspektywy wyczerpania się złóż tradycyjnych źródeł energii, jakimi są węgiel czy ropa naftowa. Wodór stanowi czyste źródło energii, bowiem jedynym produktem jego spalania jest woda, nie powstaje przy tym dwutlenek węgla. Reakcja spalania cząsteczki wodoru przebiega według wzoru opisanego przez równanie 1:



Dzięki temu spalanie wodoru nie przyczynia się do powstawania dziury ozonowej, efektu cieplarnianego i kwaśnych deszczy [48, 59].

Wodór jest również bardzo wydajnym źródłem energii. Jego energia właściwa wynosi 33 Wh/g i jest najwyższa spośród wszystkich paliw. Dla porównania energia właściwa metanu wynosi 14,2 Wh/g a węgla 9,1 Wh/g. Jednak gęstość energii paliwa, która jest iloczynem energii właściwej paliwa i gęstości paliwa w g/cm<sup>3</sup>, dla skroplonego wodoru jest dość niska i wynosi 2,7 Wh/cm<sup>3</sup>, dla porównania skroplonego metanu 6,0 Wh/cm<sup>3</sup> a węgla 19,2 Wh/cm<sup>3</sup>. Wynika to z niskiej gęstości skroplonego gazu [64]. Wodór może być przekształcany w energię w silnikach spalinowych oraz w chemicznych ogniach paliwowych. Jednak tej pory wodór nie jest wykorzystywany jako paliwo energetyczne na większą skalę. Wchodzi natomiast w skład paliw raketowych. Pewne nadzieje wiąże się z wykorzystaniem wodoru jako paliwa samochodowego. Jednak istnieją dziś poważne ograniczenia w zastosowaniach wodoru jako nośnika energii. Są to

wybuchowość substancji, konieczność zmniejszenia objętości wodoru przez kompresję czy skroplenie, problemy z jego przechowywaniem i dystrybucją oraz obecne metody jego otrzymywania. Wodór wykorzystywany jest w przemyśle chemicznym, m.in. do produkcji amoniaku, chlorowodoru, metanolu, w reakcjach redukcji jak redukcja tlenków do wolnych metali, w usuwaniu związków siarki i azotu, w reakcjach uwodornienia, wysycania wiązań jak utwardzanie tłuszczów ciekłych, do usuwania śladowych ilości tlenu w zapobieganiu procesom utleniania i powstawaniu korozji. Wodór stosowany jest też w palnikach tlenowo-wodorowych [17].

Mimo że wodór jest najbardziej rozpowszechnionym pierwiastkiem w przyrodzie to w czystej postaci nie występuje, istnieje jedynie w związkach chemicznych. Obecnie wodór otrzymuje się głównie z konwencjonalnych źródeł energii. Do tradycyjnych sposobów produkcji wodoru należą:

- konwersja z parą wodną (reforming parowy) gazu i ropy naftowej; jest to reakcja węglowodorów z parą wodną w bardzo wysokich temperaturach 700–1100°C w obecności katalizatora metalicznego, czego wynikiem jest powstanie mieszaniny gazów (ang. *syngas*), tlenku węgla, dwutlenku węgla i wodoru; w wyniku w dalszej reakcji tlenku węgla z parą wodną powstaje dwutlenek węgla i wodór.
- gazyfikacja węgla lub koksu (również oparta na reakcji z parą wodną, proces analogiczny do reformingu parowego);
- elektroliza wody, czyli rozkład wody pod wpływem stałego prądu elektrycznego;

Znana jest też technologia plazmowa, czyli rozdzielanie węglowodorów na wodór i czysty węgiel w temperaturze 1600–2000°C. Wszystkie te procesy są energochłonne, opierają się na nieodwracalnych źródłach energii i powodują zatrucie środowiska. Otrzymanie czystego paliwa energetycznego takim kosztem jest bezzasadne. Stąd duże zainteresowanie produkcją wodoru z biomasy, w tym procesami prowadzonymi przez drobnoustroje [48, 59].

Biomasa jest to ogólna masa materii organicznej pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego, w której w wyniku procesu fotosyntezy akumulowana jest energia słoneczna. Ilość lasów na kuli ziemskiej szacuje się na 700 bilionów ton. Jest to odpowiednik energetyczny 5 bilionów ton ropy naftowej. Do celów energetycznych można wykorzystać odpady produkcji rolnej jak słoma, niejadalne części roślin uprawnych; odchody zwierząt; odpady przemysłu cukrowniczego, mięsnego, tłuszczowego, drzewnego, skórzanego, papierniczego; osady ściekowe; rośliny szybko rosnące uprawiane specjalnie na potrzeby produkcji biomasy (np. wierzba wiciowa, trawy). Listę tą można jeszcze

znacznie wydłużyć. Cechą biomasy jako źródła energii jest odnawialność i uniwersalność. Dwutlenek węgla, który jest produktem ubocznym rozkładu biomasy, nie przyczynia się do powstania efektu cieplarnianego, gdyż pochodzi z bieżącej produkcji roślinnej i może być zaabsorbowany w procesach fotosyntezy. To wszystko sprawia, że biomasę uważa się za ważne odnawialne źródło wodoru w niedalekiej przyszłości. Wodór z biomasy można otrzymać w wyniku następujących typów procesów [12, 59]:

- gazyfikacja biomasy, jest to reakcja z parą wodną w wysokiej temperaturze ok. 800–1000°C podobnej do reformingu parowego i gazyfikacji węgla;
- piroliza, czyli przekształcenie biomasy w mieszaninę gazów, frakcję płynną biooil (bio-olej) oraz węgiel drzewny pod wpływem wysokiej temperatury 500–700°C bez udziału tlenu, frakcja płynna poddawana jest następnie reformingowi parowemu;
- nadkrytyczne przekształcenie biomasy do dwutlenku węgla i wodoru, które polega na tym, że mieszanina biomasy i wody o jednolitej konsystencji poddawana jest działaniu bardzo wysokiego ciśnienia 22MPa (krytyczne ciśnienie wody), temperatura procesu jest niższa niż w przypadku gazyfikacji i pirolizy.

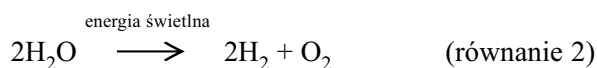
Jak widać wszystkie te procesy wymagają dostarczenia energii. Rozważa się wykorzystanie energii słonecznej w procesach gazyfikacji biomasy.

- procesy prowadzone przez mikroorganizmy.

## 2. Produkcja wodoru w procesach biologicznych

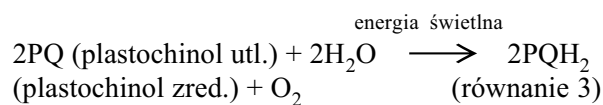
### 2.1. Bezpośrednia biofotoliza

Bezpośrednia biofotoliza, czyli fotosyntetyczna produkcja wodoru z wody jest procesem biologicznym, w którym energia świetlna jest wykorzystywana do rozbicia cząsteczki wody na wodór i tlen według równania 2:



Zjawisko to wykryto i opisano dla mikroskopijnych glonów, np. zielenic w warunkach beztlenowych. Przykładowymi gatunkami są *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella fusca*, *Scenedesmus obliquus*. Foto-produkcja wodoru przez mikroskopijne glony znajduje się w centrum zainteresowania badaczy, gdyż stanowi potencjalne źródło odnawialnego wodoru z wody i energii słonecznej. Mechanizm tego zjawiska wygląda w następująco. Energia świetlna absorbowana jest przez transbłonowy kompleks polipeptydów zwany fotosystemem II, który katalizuje transport elektronów

z wody do plastochinolu według reakcji opisanej przez równanie 3. Proces ten stymulowany jest światłem.

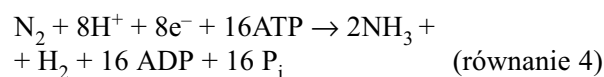


Następnie elektrony są przenoszone z plastochinolu na plastocyjaninę przez cytochrom *bf*. A dalej inny transbłonowy kompleks peptydowy zwany fotosystemem I przenosi je na ferredoksynę. Hydrogenaza, enzym odpowiedzialny za produkcję wodoru (patrz rozdz. 2.7), odbiera elektrony ze zredukowanej ferredoksyny i redukując protony uwalnia wodór. W warunkach tlenowych wodór wykorzystywany jest do redukcji dwutlenku węgla. Aby nastąpiła produkcja wodoru przez zielenice wymagana jest inkubacja glonów w warunkach beztlenowych od kilku minut do kilku godzin. Czas ten jest niezbędny do indukcji białek odpowiedzialnych za produkcję wodoru, w tym najważniejszego, czyli hydrogenazy. Hydrogenazy są bardzo wrażliwe na tlen. Tak więc aby nastąpiła produkcja wodoru musi istnieć oddzielenie czasowe i przestrzenne etapu prowadzącego do powstawania tlenu od etapu prowadzącego do tworzenia wodoru. Taki stan może być osiągnięty, gdy hodowla zielenic zostanie umieszczona w środowisku ubogim w siarkę. W warunkach niedoboru siarki następuje zahamowanie syntezy białka D1, podjednostki części rdzeniowej fotosystemu II, która ulega częstej wymianie. Białko D1 jest bogate w aminokwasy zawierające siarkę jak cysteina i metionina. W opisanych warunkach w krótkim czasie produkcja tlenu i absorpcja dwutlenku węgla ustają i tworzy się wodór. Uwalnianie wodoru stymuluje syntezę ATP w komórce. Konstruowane są mutanty, które posiadałyby hydrogenazy odporne na tlen i produkowałyby wodór w warunkach tlenowych [25, 30, 44]. W komórkach zielenic wykryto liazę pirogronian:mrówczan (PFL) jak również oksydoreduktazę pirogronian : ferredoksyna i inne enzymy umożliwiające oddychanie w warunkach beztlenowych [6].

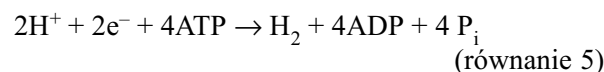
## 2.2. Pośrednia biofotoliza

Wodór produkowany jest również przez sinice, prokariotyczne fotosyntetyzujące organizmy. Fotosynteza przebiega podobnie jak u roślin. Proces, który prowadzi do powstawania wodoru to tzw. pośrednia fotoliza. Wiele gatunków sinic potrafi wiązać azot atmosferyczny redukując go do amoniaku. Sinice mają bardzo ubogie wymagania pokarmowe. Potrzebują dwutlenku węgla i azotu z powietrza, wody, soli mineralnych i światła jako jedyne źródła energii. Fotoliza pośrednia jest procesem dwuetapowym. Pierwszym etapem jest normalna fotosynteza w wyniku której następuje redukcja dwutlenku węgla do węglowodanów. Dwu-

tlenek węgla jest więc nośnikiem elektronów i protonów powstałych w wyniku rozkładu cząsteczki wody. W drugim etapie węglowodany ulegają rozkładowi częściowo na drodze fermentacji a częściowo przy udziale fotosystemu I pod wpływem światła. Następuje przeniesienie elektronów z cząsteczki cukru na ferredoksynę za pośrednictwem białek fotosystemu I pod wpływem energii świetlnej. W powstawaniu wodoru w procesie pośredniej fotolizy istotną rolę odgrywają trzy enzymy, nitrogenaza i dwie hydrogenazy NiFe, jedna pobierająca, która rozkłada cząsteczkę wodoru do dwóch protonów i dwóch elektronów (ang. *uptake hydrogenase*), druga prowadząca dwukierunkową reakcję:  $\text{H}_2 \leftrightarrow 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$ . Nitrogenaza katalizuje reakcje redukcji azotu atmosferycznego do amoniaku z jednoczesną redukcją protonu i uwolnieniem wodoru według reakcji opisanej przez równanie 4. Jest to reakcja bardzo energochłonna.



Nitrogenaza może również redukować protony do wodoru cząsteczkowego zgodnie z reakcją opisaną przez równanie 5:



Nitrogenaza jest kompleksem białkowym składającym się z dwóch białek, reduktazy dinitrogenazy (zwanej białkiem Fe) zbudowanej z dwóch podjednostek, produktów genu *nifH* oraz dinitrogenazy (zwanej białkiem MoFe), która jest heterotetramerem  $\alpha_2\beta_2$  utworzonym z białek kodowanych przez geny *nifD* (podjednostka  $\alpha$ ) i *nifK* (podjednostka  $\beta$ ). Dinitrogenaza reduktaza odbiera elektrony od zewnętrznego donora typu ferredoksyna i przekazuje je dinitrogenazie, która przeprowadza właściwą reakcję redukcji substratu. Proces wiązania azotu jest kontrolowany i regulowany przez wiele innych jeszcze białek. Nitrogenaza jest bardzo wrażliwa na tlen. Wielokomórkowe sinice np. z rodzaju *Nostoc*, *Anabaena*, *Oscillatoria* czy *Calothrix*, które tworzą filamenty, posiadają wyspecjalizowane komórki, tzw. heterocysty, w których zachodzi proces absorpcji azotu cząsteczkowego. Heterocysty zapewniają warunki beztlenowe niezbędne dla funkcjonowania nitrogenazy. Są otoczone grubą ścianą komórkową ograniczającą dyfuzję tlenu, nie posiadają kompleksu białkowego fotosystemu II, odznaczają się podwyższoną konsumpcją tlenu w oddychaniu komórkowym. Substratem dla hydrogenazy katalizującej reakcję jednokierunkową, czyli rozkład cząsteczki wodoru do protonów i elektronów, jest wodór produkowany w trakcie redukcji azotu. Powstałe protony mogą być wykorzystane do redukcji kolejnej cząsteczki azotu. Hydrogenaza ta składa się z dwóch

białek HupL oraz HupS i jest mało wrażliwa na tlen. Zawsze towarzyszy ona nitrogenazie. Konstruuje się mutanty z nieaktywną hydrogenazą pobierającą w celu zwiększenia produkcji wodoru przez sinice. Druga hydrogenaza, prowadząca reakcję dwukierunkową, występuje zarówno u gatunków mających jak i nie mających zdolności do wiązania azotu atmosferycznego. Zbudowana jest ona z dwóch podjednostek, diaforazy, która odbiera elektrony z cząsteczki NADH, w skład której wchodzi białka HoxU i HoxF oraz hydrogenazy utworzonej przez białka HoxH i HoxY. Jej rola nie jest dokładnie poznana. Prawdopodobnie usuwa nadmiar siły redukującej w postaci NADH w warunkach beztlenowych. Najintensywniejsza produkcja wodoru ma miejsce w warunkach niedoboru azotu. Są też gatunki wiążące azot a nie tworzące heterocyst. Należą do nich jednokomórkowe sinice z rodzaju *Synechococcus*, *Microcystis*, *Gloebacter*, *Aphanocapsa*. Aby była możliwa produkcja wodoru musi nastąpić oddzielenie w czasie tego procesu od procesu fotosyntezy [9, 68, 77]. Wydajność produkcji wodoru w procesach biofotolizy bezpośredniej i pośredniej jest niska [34].

### 2.3. Fermentacje bakteryjne

Fermentacja jest typem oddychania beztlenowego o niskiej wydajności energetycznej, w którym ostatecznym akceptorem elektronów są produkty rozkładu substratu oddechowego (donora elektronów). Brak jest zewnętrznego akceptora elektronów. W czasie fermentacji tworzą się różnorodne, zależne od typu fermentacji, związki organiczne oraz gazy (dwutlenek węgla i wodór). Obecność i ilość powstałego wodoru zależy od rodzaju fermentacji. Na podstawie dominującego charakterystycznego produktu końcowego wyróżniamy następujące typy fermentacji bakteryjnej: mlekowa (homo- i heterofermentacja), propionowa, alkoholowa, kwasów mieszanych (mrówkowa), masłowo-butanolowa. Fermentacje mlekowa, propionowa, alkoholowa nie mają znaczenia w produkcji wodoru. Fermentacjami wodorowymi są fermentacja masłowo-butanolowa oraz fermentacja kwasów mieszanych. Podczas fermentacji masłowo-butanolowej tworzą się kwas masłowy, butanol, wodór, dwutlenek węgla, kwas octowy oraz inne związki jak aceton, 2-propanol, etanol, kwas mlekowy, kwas kapronowy, acetoina. Z dotychczasowej wiedzy wynika, że fermentacja ta jest charakterystyczna przede wszystkim dla przetrwalnikujących bakterii z rodzaju *Clostridium* oraz innych nie tworzących zarodników, np. bakterii żwaczowych. Znanymi bakteriami prowadzącymi fermentację kwasów mieszanych są bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*, także gatunki rodzaju *Bacillus*, a do końcowych produktów procesu należą kwas mrówkowy, kwas octowy, etanol, wodór, dwutlenek węgla, kwas mlekowy, a także kwas bursztynowy,

glicerol, acetoina i 2,3-butanodiol. *Enterobacteriaceae* są dużą rodziną bakterii, do której należy wiele gatunków symbiotycznych zamieszkujących przewód pokarmowy ludzi i zwierząt oraz patogennych. Należą tu następujące przykładowe gatunki: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, rodzaj *Citrobacter* i wiele innych. Są to Gram-ujemne, nie tworzące przetrwalników fakultatywne beztlenowce [72].

#### 2.3.1. Powstawanie pirogronianu

Większość fermentacji to fermentacje glikolityczne, czyli ich pierwszym etapem jest glikoliza inaczej szlak fruktozo-1,6-bifosforanowy (szlak Embdena-Meyerhoffa-Parnasa). W wyniku glikolizy następuje przekształcenie glukozy w pirogronian. Pierwszym etapem glikolizy jest przekształcenie glukozy we fruktozo-1,6-bifosforan w wyniku reakcji fosforylacji i izomerizacji. Następnie fruktozo-1,6-bifosforan jest rozszczepiany na dwa izomeryczne związki trójwęglowe: aldehyd 3-fosfoglicerynowy i fosfodihydroksyaceton. W efekcie działania izomerazy triozofosforanowej z fosfodihydroksyacetonu tworzy się aldehyd 3-fosfoglicerynowy. Dwie cząsteczki aldehydu 3-fosfoglicerynowego ulegają przekształceniu do dwóch cząsteczek 1,3-bifosfoglicerynianu. Kolejną reakcją katalizuje kinaza fosfoglicerynianowa, w wyniku czego z 1,3-bifosfoglicerynianu powstaje ATP i 3-fosfoglicerynian. Ostatnim etapem jest przekształcenie 3-fosfoglicerynianu w pirogronian przy jednoczesnym powstaniu cząsteczki ATP. Podsumowując, produktami rozkładu 1 cząsteczki glukozy w procesie glikolizy są 2 cząsteczki pirogronianu, 2 cząsteczki ATP (zysk netto) i 2 cząsteczki NADH [76].

Pirogronian może powstać też w szlaku 2-keto-3-deoksy-6-fosfoglukanowym (szlak Entnera-Doudoroffa) a aldehyd 3-fosfoglicerynowy w szlaku pentozofosforanowym (szlak Warburga-Dickensa-Horeckera). W szlaku Entnera-Doudoroffa glukozo-6-fosforan ulega odwodorowaniu do 6-fosfoglukanianu przez dehydrogenazę glukozo-6-fosforanową. Powstaje wtedy 1 cząsteczka NADPH. Następnie w wyniku działania dehydratazy fosfoglukanionowej powstaje 2-keto-3-deoksy-6-fosfoglukanian, który rozszczepiany jest do pirogronianu i aldehydu 3-fosfoglicerynowego przez aldolazę 2-keto-3-deoksyfosfoglukanionową. Dalej aldehyd 3-fosfoglicerynowy przekształcany jest do pirogronianu. W szlaku Entnera-Doudoroffa z 1 cząsteczki glukozy powstają 2 cząsteczki pirogronianu, 1 cząsteczka NADPH, 1 cząsteczka NADH i 1 cząsteczka ATP. U bakterii fermentacyjnych mogą występować różne odmiany tego szlaku. Pirogronian jest substratem wyjś-

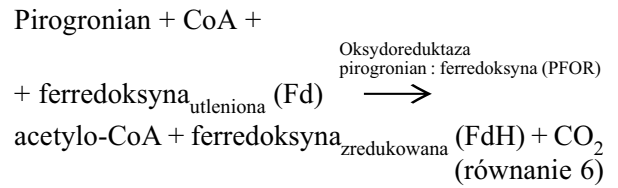


ciowym do dalszych przemian w procesach fermentacji. W fermentacji mlekowej ulega przekształceniu w mleczan, w fermentacji alkoholowej w etanol, w fermentacji propionowej w szczawiooctan. W fermentacjach masłowo-butanolowej i kwasów mieszanych pirogronian jest utleniany do acetylo-koenzymu A (acetylo-CoA) [72, 76]. Pirogronian może powstać też z innych substratów co zostało opisane w rozdziale 2.3.5.

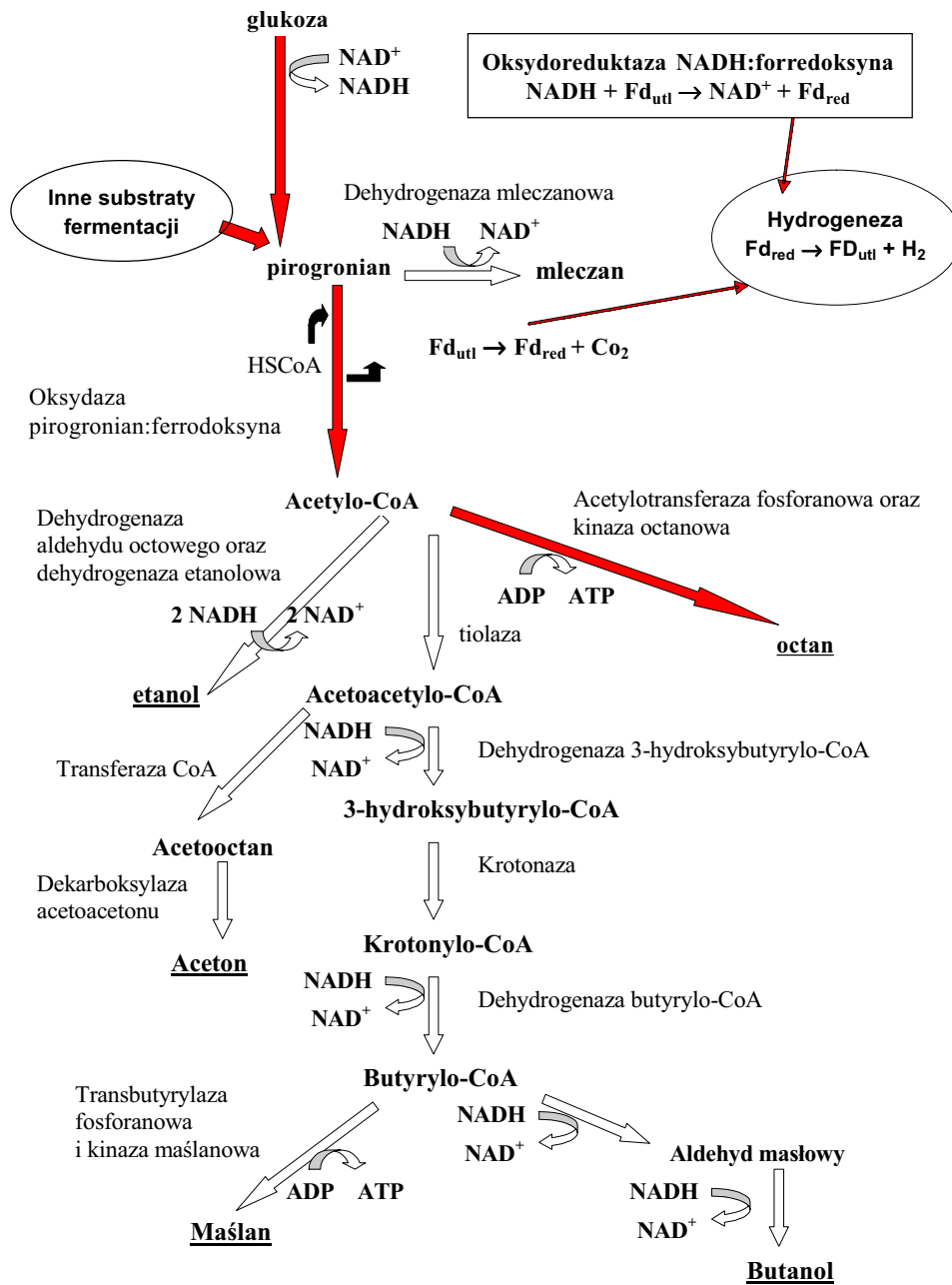
**2.3.2. Fermentacja masłowo-butanolowa**

Wzorcowy schemat przebiegu fermentacji masłowo-butanolowej na przykładzie *Clostridium acetobutylicum* przedstawia rysunek 1. Reakcja utleniania pirogro-

nianu do acetylo-CoA katalizowana jest przez oksydoreduktazę pirogronian:ferredoksyna (PFOR, *pyruvate:ferredoxin oxidoreductase*) przy udziale ferredoksyny, która ulega redukcji według równania 6:

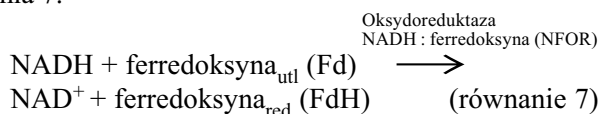


Ferredoksyna jest niewielkim rozpuszczalnym w wodzie białkiem zawierającym centrum żelazowo-siarkowe [4Fe-4S] połączone z resztami cysteiny. Z acetylo-CoA tworzy się szereg produktów fermentacji jak



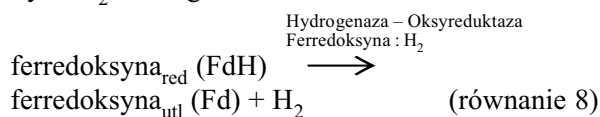
Rys. 1. Schemat przebiegu fermentacji masłowo-butanolowej prowadzonej przez *Clostridium acetobutylicum*. Zaznaczono szlaki prowadzące do powstania wodoru

kwasy organiczne, etanol czy butanol. Zredukowana ferredoksyna może też powstać w reakcji z NADH przy udziale oksydoreduktazy NADH:ferredoksyna (NFOR, ang. *NADH:ferredoxin oxidoreductase*) według równania 7:



NADH pochodzi z procesu glikolizy lub szlaku Entnera-Doudoroffa.

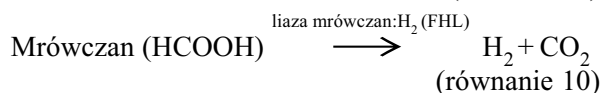
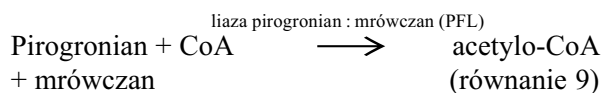
Następnie wodór jest uwalniany w reakcji prowadzonej przez hydrogenazę – oksydoreduktazę ferredoksyna:H<sub>2</sub> według równania 8:



Hydrogenazy przenoszą elektrony z wewnątrzkomórkowych nośników elektronów na protony. Protony są akceptorami elektronów i ulegają redukcji. Protony są słabymi akceptorami elektronów i wymagają silnego czynnika redukującego. Aktywność enzymów PFOR i NFOR jest regulowana przez stężenie wyprodukowanego wodoru. Ciśnienie cząsteczkowe wodoru wyższe niż 60 Pa hamuje aktywność białka NFOR. W tych warunkach w komórce występuje równowaga stężeń utlenionych oraz zredukowanych form ferredoksyny i NADH. Produkcja wodoru staje się niekorzystna termodynamicznie, więc powstają inne produkty fermentacji jak maślan, mleczan, czy etanol. Białko PFOR jest natomiast aktywne, gdy ciśnienie cząsteczkowe wodoru wynosi do  $3 \times 10^4$  Pa. Zatem im niższe ciśnienie cząsteczkowe wodoru tym wydajniejsza produkcja wodoru [4, 29]. Mleczan tworzy się w wyniku redukcji pirogronianu. Etanol powstaje w wyniku redukcji acetylo-CoA przez dehydrogenazę aldehydu octowego oraz dehydrogenazę etanolową. Acetylotransferaza fosforanowa oraz kinaza octanowa przekształcają acetylo-CoA do octanu. Tiolaza katalizuje reakcję kondensacji dwóch cząsteczek acetylo-CoA w wyniku czego tworzy się acetoacetylo-CoA, który ulega redukcji przez dehydrogenazę 3-hydroksybutyrylo-CoA do 3-hydroksybutyrylo-CoA. Ten związek ulega dalej dehydratacji przez krotonazę do krotonylo-CoA, który z kolei jest redukowany do butyrylo-CoA przez dehydrogenazę do butyrylo-CoA. Przy udziale transbutyrylasy fosforanowej i kinazy maślanowej powstaje maślan. Dehydrogenaza aldehydu masłowego i dehydrogenaza butanolowa przekształcają butyrylo-CoA w butanol. Z acetoacetylo-CoA może powstać też acetoctan, z którego po dekarboksylacji tworzy się aceton. Aceton może ulec redukcji do 2-propanolu. Końcowymi produktami fermentacji masłowo-butanolowej są więc maślan, octan, mleczan, etanol, butanol, aceton, dwutlenek węgla i wodór [26, 29].

### 2.3.3. Fermentacja kwasów mieszanych

W fermentacji kwasów mieszanych w wyniku przekształcenia pirogronianu katalizowanej przez liazę pirogronian : mrówczan (PFL, *pyruvate formate-lyase*) według równania 9 oprócz acetylo-CoA powstaje też mrówczan, który ulega rozkładowi do dwutlenku węgla i wodoru pod wpływem liazy mrówczan:H<sub>2</sub> (FHL, *formate hydrogenlyase*) według równania 10.

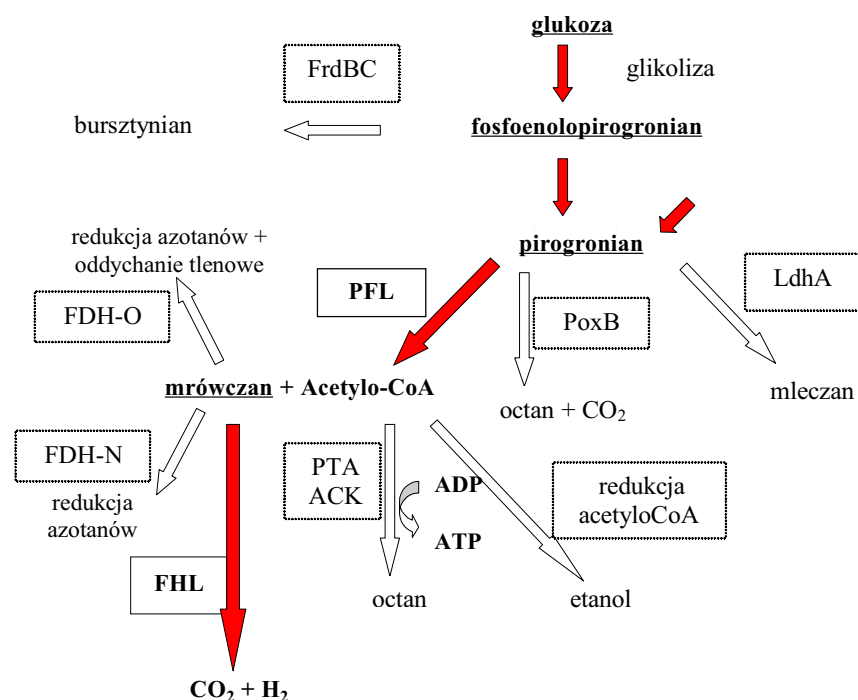


Wyróżniamy 2 typy fermentacji mieszanej, typ *E. coli* i typ *Enterobacter*. Produktami fermentacji typu *E. coli* są etanol, octan, mleczan i bursztynian. Bursztynian powstaje w wyniku przekształcenia fosfoenolpirogronianu przez reduktazę fumaranową FrdBC, mleczan w wyniku przekształcenia pirogronianu przez dehydrogenazę mleczanową LdhA, octan w wyniku przekształcenia pirogronianu przez oksydazę pirogronianu PoxB oraz acetylo-CoA przez acetylotransferazę fosforanową PTA i kinazę octanową ACK a etanol w wyniku redukcji acetylo-CoA (rys. 2) [49, 71]. Natomiast w fermentacji typu *Enterobacter* kwasów tworzy się niewiele a przeważają acetoina, 2,3-butanodiol oraz diacetyl. Acetoina powstaje z dwóch cząsteczek pirogronianu, 2,3-butanodiol to produkt redukcji acetonu, diacetyl tworzy się w efekcie utleniania się acetoiny na powietrzu [72]. Ponadto uważa się, że w fermentacji typu *Enterobacter* wodór powstaje również z NADH przy udziale oksydoreduktazy NADH:ferredoksyna jak opisano dla fermentacji masłowo-butanolowej. Tworzy się wtedy zredukowana ferredoksyna (wg równania 7) a wodór jest uwalniany w reakcji prowadzonej przez hydrogenazę – oksydoreduktazę ferredoksyna:H<sub>2</sub> (wg równania 8). Ma to miejsce przy wysokim poziomie NADH w komórce [58].

Do *Enterobacteriaceae* należy rodzaj *Citrobacter*. Są to fakultatywne beztlenowce o wysokiej wydajności produkcji wodoru (2.49 mola H<sub>2</sub> na 1 mol glukozy). Bakterie te zdolne są również do produkcji wodoru z tlenku węgla i wody [62]. Zjawisko to jest dobrze poznane dla bakterii fotosyntetyzujących i opisane w rozdziale 2.4.

### 2.3.4. Regulacja produkcji wodoru w czasie fermentacji kwasów mieszanych

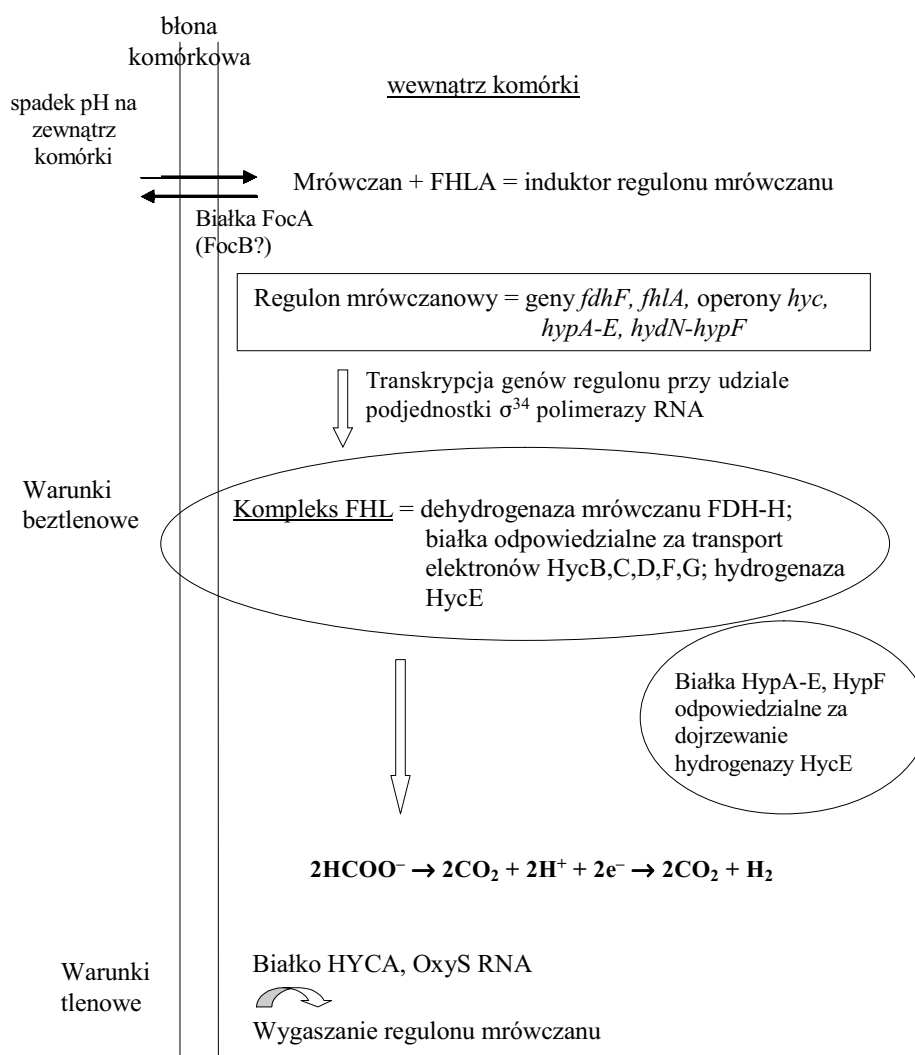
Regulacja wytworzenia wodoru w czasie fermentacji kwasów mieszanych zostanie omówiona na przykładzie modelowego przedstawiciela rodziny *Enterobacteriaceae*, bakterii *Escherichia coli*. Podobnie jak

Rys. 2. Schemat fermentacji kwasów mieszanych u *Escherichia coli*.

FrdBC – reduktaza fumaranowa, LdhA – dehydrogenaza mleczanowa, PoxB – oksydaza pirogronianu, FDH-O i FDH-N – dehydrogenazy mrówczanu, PTA – acetylotransferaza fosforanowa, ACK – kinaza octanowa, PFL – liaza pirogronian:mrówczan, FHL – liaza mrówczan:wodór. Zaznaczono szlak prowadzący do powstania wodoru

inne bakterie z tej rodziny jest ona fakultatywnym beztlenowcem. Globalnymi regulatorami kontrolującymi ekspresję genów kodujących enzymy oddychania tlenowego i beztlenowego są kompleks ArcAB i białko FNR wrażliwe na stężenie tlenu i potencjał oksydo-redukcyjny w komórce [2, 40]. W warunkach tlenowych pirogronian ulega oksydatywnej dekarboksylacji przez dehydrogenazę pirogronianu (PDHc, *pyruvate dehydrogenase complex*) do acetylo-CoA i włączany jest w cykl Krebsa. W warunkach anaerobowych lub mikroanaerobowych następuje aktywacja liazy pirogronian:mrówczan (PFL), która przekształca część pirogronianu w mrówczan. Z pirogronianu może powstać też mleczan i octan a z fosfoenolopirogronianu bursztynian. Stwierdzono, że ok. 33% glukozy ulega przekształceniu w kwas mrówkowy, który gromadzi się w cytoplazmie i powoduje zakwaszenie środowiska komórki. Mrówczan może być metabolizowany w komórce na 3 różne sposoby. Metabolizm mrówczanu jest więc istotnym elementem fermentacji kwasów mieszanych i produkcji wodoru. W komórce *E. coli* wykryto 3 dehydrogenazy mrówczanowe. Pierwsza to białko FDH-N, produkt operonu *fdnGHI*, syntetyzowane, gdy komórki rosną w warunkach beztlenowych w obecności azotanów. Enzym ten przeprowadza utlenianie mrówczanu przy jednoczesnej redukcji azotanów z udziałem reduktazy azotanowej. Drugą dehydrogenazę mrówczanową, białko FDH-O, koduje operon *fdoGHI*, gdy pojawiają się warunki tlenowe oraz gdy

w podłożu znajdują się akceptory elektronów w postaci azotanów. Obie dehydrogenazy są białkami błonowymi a ich centra aktywne znajdują się od strony perioplazmy. Trzecia dehydrogenaza mrówczanowa to produkt genu *fdhF*, białko FDH-H, którego ekspresja zachodzi w warunkach fermentacyjnych, gdy brak zewnętrznych akceptorów elektronów. Centrum aktywne FDH-H zawiera selen oraz molibden i skierowane jest do wnętrza cytoplazmy. Enzym ten jest kluczowym elementem kompleksu liazy mrówczan:wodór (FHL) odpowiedzialnej za rozkład kwasu mrówkowego do dwutlenku węgla i wodoru. FHL jest kompleksem białkowym zakotwiczonym w błonie komórkowej składającym się z siedmiu białek: FDH-H oraz 6 białek Hyc, produktów operonu *hyc*. Są to białka HycB, HycC, HycD, HycF i HycG odpowiedzialne za transport elektronów oraz białko HycE (Hyd-3), dehydrogenaza, jedna z czterech dehydrogenaz NiFe *E. coli*. Dehydrogenazy NiFe są omówione w rozdziale 2.7. Induktorem genu *fdhF* i genów operonu *hyc*, których produkty tworzą liazę mrówczan:wodór, jest sam kwas mrówkowy. W komórce istnieje regulon mrówczanowy w skład którego wchodzi ponadto operony *hypA-E*, *fhlA* oraz *hydN-hypF* (rys. 3). Geny te ulegają transkrypcji w warunkach obniżonego pH, przy akumulacji mrówczanu. Do ich transkrypcji wymagana jest podjednostka  $\sigma^{54}$  w polimerazie RNA. Białka HypA-E i HypF są odpowiedzialne za dojrzewanie dehydrogenazy Hyd-3 i formowanie kofaktora NiFe. Gen *fhlA*

Rys. 3. Schemat działania regulonu mrówczanu u *Escherichia coli*.

Objaśnienia w tekście

koduje białko FHLA, oddziaływujące z mrówczanem, które pełni funkcję induktora regulonu mrówczanu. FHLA łączy się z DNA w postaci tetrameru aktywując w ten sposób transkrypcję genów regulonu. Gen *fhla* ulega autoregulacji na zasadzie sprzężenia zwrotnego dodatniego. Wygaszanie regulonu następuje przez białko represorowe HYCA, produkt genu *hycA* oraz antysensowne RNA OxyS. Represor HYCA oddziałuje z białkiem induktorowym FHLA oraz z kompleksem FHLA z mrówczanem. OxyS jest 109 nukleotydowym fragmentem RNA, który nie ulega translacji i jest indukowany w warunkach stresu oksydacyjnego. Uważa się, że jest to globalny regulator ekspresji ok. 40 genów. Pokazano, że OxyS RNA wiąże się z sekwencją Shine-Dalgarno mRNA dla białka FHLA blokując miejsce wiązania rybosomy. W regulacji regulonu mrówczanowego ważną rolę odgrywa również transmembranowe białko FocA odpowiedzialne za transport mrówczanu do i na zewnątrz komórki. Należy ono do klasy białek transportujących kwasy organiczne. Mutanty

*focA* gromadzą mrówczan wewnątrz komórki w porównaniu ze szczepem dzikim. Wykazano, że kwas mrówkowy zostaje początkowo usunięty z komórki, a gdy pH podłoża ulega zakwaszeniu (spadek pH poniżej 6,8), jest pobierany z powrotem i ulega rozkładowi przez liazę FHL. Dokładny mechanizm transportu mrówczanu nie jest poznany. Prawdopodobnie bierze w nim udział również inne białko FocB (produkt genu *focB*). Powrót mrówczanu do komórki ma miejsce, gdy brak jest zewnętrznego akceptora elektronów jak azotany czy tlen. Ciekawe jest, że gen *focA* i *pfl* kodujący liazę pirogronian:mrówczan PFL tworzą wspólny operon *focApfl* [3, 21, 71].

### 2.3.5. Substraty fermentacji

Substratami fermentacji są przede wszystkim węglowodany. Powstawanie pirogronianu z glukozy jest podstawowym schematem rozważanym przy omawianiu procesów fermentacji. Jednak pirogronian może

powstawać z różnorodnych związków. Są to inne niż glukoza cukry proste, jak fruktoza, galaktoza, ksyluloza, arabinoza, ryboza. Cukry te mogą być włączane w cykl glikolityczny lub inne cykle (szlak 2-keto-3-deoksy-6-fosfoglukaniowy czy szlak pentozofosforanowy). Na przykład galaktoza może być przekształcona w glukozo-6-fosforan, a fruktoza w aldehyd glicerynowy i fosfodihydroksyaceton po uprzedniej fosforylacji do fruktozo-1-fosforanu. Substratami fermentacji są polisacharydy, jak np. celuloza, hemiceluloza, skrobia; dwucukry, jak np. sacharoza, maltoza po uprzedniej hydrolizie na cukry proste [34, 45].

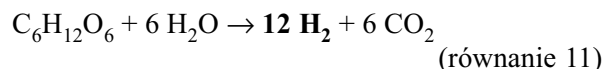
Kolejnymi związkami, z których w wyniku procesu fermentacji powstaje wodór są aminokwasy. Wiadomo, że w wyniku fermentacji glutaminy prowadzonej przez *Clostridium tetanomorphum*, *C. pascui*, *C. tetani*, *C. cochlearium*, *C. malenominatum*, *C. limosum* powstają amoniak, wodór, dwutlenek węgla, octan, maślan oraz etanol. Glutamina przekształcana jest do octanu i pirogronianu w wieloetapowym procesie. Produktami pośrednimi są 2-metylo-asparaginian, 2-metylo-fumarany, 2-metylo-jabłczan [11, 72, 80]. Stwierdzono, że wodór jest także produkowany przez bakterie fermentujące glicynę, np. *Peptococcus anaerobius* oraz treoninę, np. *Clostridium propionicum* [11].

Znaczącą produkcję wodoru obserwowano dla hodowli *Enterobacter aerogenes* [32] oraz *Klebsiella pneumoniae* [46] rosnących na podłożach bogatych w glicerol. Głównymi produktami fermentacji były etanol i wodór. Inna bakteria *Clostridium kluyveri* prowadzi fermentację etanolu i octanu lub bursztynianu w wyniku której powstaje maślan, kaprońian oraz wodór [36]. Wyizolowano bakterię *Clostridium dolis*, która prowadzi fermentację mieszaniny kwasów mlekowego i octowego, której produktem są wodór i kwas masłowy [53].

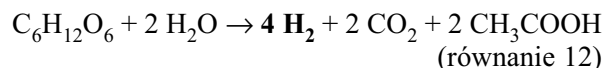
W związku z dużymi nadziejami jakie wiąże się z wodorem jako paliwem w przyszłości uzyskiwanym z biomasy, znaczna część badań naukowych i publikowanych prac dotyczy produkcji wodoru z różnorodnych odpadów organicznych, takich jak odpady przemysłu rolno-spożywczego, zwłaszcza bogate w skrobię i celulozę [4, 34, 53, 63], melasa [69], odpady przemysłu tłuszczowego [23], odpady bogate w keratynę [7], obornik i odchody innych zwierząt [15, 84, 90], odpady z produkcji biopaliw [32, 46], odpady przemysłu papierniczego [78].

### 2.3.6. Wydajność produkcji wodoru w procesie fermentacji

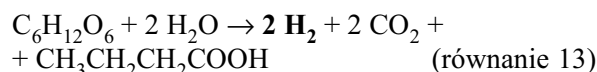
Gdyby biomasę potraktować jako cukry proste typu glukoza to w wyniku całkowitego rozkładu 1 mola glukozy powstałoby 12 moli wodoru zgodnie z równaniem 11:



Rozważając równania 6–8 z rozdziału 2.3.2., w optymalnych warunkach w czasie fermentacji z jednego mola glukozy można otrzymać 4 mole wodoru (2 mole w wyniku działania białka PFOR i 2 mole w wyniku działania białka NFOR), 4 mole dwutlenku węgla i 2 mole octanu zgodnie z reakcją opisaną przez równanie 12. Jest to maksymalna ilość wodoru jaką można uzyskać w procesie fermentacji z 1 mola glukozy.



Jest to więc 33% wartości przedstawionej przez równania 6 i 11. W rzeczywistości jest to mniej, bo 8–20%, czyli 1–2,5 mola wodoru z 1 mola glukozy. Tworzenie kwasu masłowego obniża ilość powstałego wodoru do 2 moli (równanie 13):



Powstawanie kolejnych produktów fermentacji (inne kwasy organiczne, alkohole) powodują dalsze obniżenie ilości wyprodukowanego wodoru [4, 40, 48]. Natomiast maksymalna teoretyczna wydajność fermentacji mieszanej wynosi 2 mole wodoru na 1 mol glukozy [87].

Szacuje się, że wydajność produkcji wodoru powinna wynosić 60–80%, aby produkcja wodoru z biomasy była opłacalna z ekonomicznego punktu widzenia [8, 48]. Stąd duże zainteresowanie sposobami zwiększania wydajności produkcji wodoru. W pracach spotkać można różny sposób przedstawienia wydajności produkowanego wodoru w procesach fermentacji. Jedni autorzy pokazują to jako liczbę moli wodoru na 1 mol substratu rozłożonego, inni na 1 mol substratu dodanego do pożywki. Jeszcze inni pokazują produktywność wodoru w %, gdzie za 100% przyjmuje się ilość moli wodoru powstałego z całkowitego rozkładu 1 mola substratu (12 moli wodoru w przypadku rozkładu cząsteczki glukozy) [41]. Często podaje się tempo produkcji wodoru w jednostkach objętości produkowanego gazu w jednostce czasu (np. ml/h) zaznaczając objętość hodowli, jej gęstość lub liczebność bakterii czy też suchą masę. Można też wyliczyć ilość mmoli wodoru na gram suchej masy [57], ilość mmoli wodoru na godzinę na litr hodowli ([86], ilość  $\mu\text{moli}$  wodoru na mg białka [49] itp.

### 2.3.7. Sposoby zwiększania wydajności produkcji wodoru w procesach fermentacji

W bioreaktorach, gdzie zachodzi fermentacja i produkowany jest wodór, rozwijają się zazwyczaj trzy grupy mikroorganizmów. Oprócz producentów wodoru

pojawiają się tam bakterie, które wykorzystują wodór w swoich procesach życiowych. Są to metanogeny i acetogeny, a produktami ich metabolizmu są odpowiednio metan i kwas octowy. Zatem istotnym czynnikiem w optymalizacji produkcji wodoru jest ograniczenie procesów metanogenezy i acetogenezy. Archeony metanogenne są bezwzględnie beztlenowcami, wytwarzają metan w przemianie octanu i redukcji wodoru CO<sub>2</sub> w warunkach beztlenowych. Bakterie acetogenne produkują kwas octowy z wodoru i dwutlenku węgla wg reakcji opisanej przez równanie 14:



Jednym ze sposobów hamowania procesów metanogenezy i acetogenezy jest traktowanie hodowli wysoką temperaturą 80–104°C przez 15–120 min. Selekcjonowane są wtedy bakterie fermentujące o dużej produkcji wodoru, zdolne do wytwarzania zarodników z rodzaju *Clostridium*, *Bacillus* czy *Thermoanaerobacterium*. W takich warunkach giną jednak bakterie produkujące jak np. z rodzaju *Enterobacter* czy *Citrobacter* wodór a nie zarodnikujące. W *inoculum* mogą pozostać też tworzące spory bakterie octowe (z rodzaju *Acetobacterium*, *Sporomusa* czy *Clostridium*), bakterie propionowe, bakterie kwasu mlekowego czy bakterie wykorzystujące wodór do redukcji siarczanów [41]. Pokazano, że efektywną metodą poprawiającą produkcję wodoru jest traktowanie hodowli związkami chemicznymi, które specyficznym hamują rozwój metanogenów i procesy metanogenezy jak kwas 2-bromoetanosulfonowy (BESA) czy jodopropan. Podobne efekty przynosi prowadzenie hodowli bakterii w warunkach obniżonego pH do ok. 5,5 czy traktowanie *inoculum* kwasem. Należy tu zaznaczyć, że gdy fermentacja przebiega w optymalnych warunkach, następuje spadek pH hodowli do wartości ok. 5,0 na skutek produkcji kwasów organicznych, co w naturalny sposób hamuje rozwój metanogenów. Kolejną metodą ograniczającą tworzenie metanu i zwiększającą produkcję wodoru jest pulsowe napowietrzenie hodowli bakteryjnej [89].

Innym podejściem do zwiększenia wydajności produkcji wodoru jest dążenie do osiągnięcia warunków fermentacji, w których następuje ograniczenie powstawania różnorodnych produktów końcowych. W przypadku fermentacji masłowo-butanolowej celem jest osiągnięcie warunków opisanych przez równanie 12. Przypomnijmy, że ciśnienie cząsteczkowe wodoru wyższe niż 60 Pa hamuje aktywność białka NFOR. W przypadku fermentacji kwasów mieszanych celem jest uzyskanie jak największej produkcji kwasu mrówkowego. Wiąże się to z utrzymywaniem niskiego ciśnienia cząsteczkowego wodoru w hodowli, co sprzyja jego produkcji. Stosuje się różne techniki usuwania gazów fermentacyjnych (wodór i dwutlenek węgla) rozpusz-

czonych w hodowli bakterii. Jednoczesne usuwanie wodoru i dwutlenku węgla zapobiega procesowi powstawania kwasu octowego. Najczęstszą techniką obniżania stężenia rozpuszczonych gazów fermentacyjnych w bioreaktorach, gdzie produkowany jest wodór, stanowi ich wypieranie przez przedmuchiwanie innym gazem obojętnym (ang. *gas sparging*). Stosuje się tu zwykle argon i azot, a także metan czy dwutlenek węgla. Wzrost produkcji wodoru w takich warunkach obserwuje się zarówno w hodowlach czystych kultur np. *Enterobacter aerogenes*, *Clostridium butyricum*, *Rhodospseudomonas palustris*, jak i mieszanych [41, 59].

Innymi metodami są wytrząsanie czy mieszanie hodowli fermentacyjnych, co sprzyja przechodzeniu gazów metabolicznych z fazy ciekłej do przestrzeni nad hodowlą w reaktorze. Pokazano też, że sposobem na zwiększenie produkcji wodoru może być obniżenie ciśnienia cząsteczkowego wodoru w atmosferze nad hodowlą bakteryjną. Obniżenie ogólnego ciśnienia gazów w kolbie z hodowlą *Enterobacter cloacae* z 760 mmHg do 380 mmHg przez zastosowanie pompy perystaltycznej zwiększyło wydajność produkcji wodoru z 1,9 mola H<sub>2</sub> na 1 mol glukozy do 3,9 mola H<sub>2</sub> na 1 mol glukozy. Użyty szczep był mutantem charakteryzującym się podwyższoną produkcją wodoru w stosunku do szczepu dzikiego w wyniku zaburzeń w funkcjonowaniu szlaków syntezy alkoholi i kwasów organicznych. W eksperymencie tym ponadto pochłaniany był dwutlenek węgla przez roztwór KOH [50]. Zastosowanie roztworu KOH jest znaną metodą usuwającą dwutlenek węgla, co również zwiększa ilość produkowanego wodoru w procesie fermentacji. Zbyt wysokie ciśnienie cząsteczkowe dwutlenku węgla, powyżej 0,5 atm działa hamująco na wzrost bakterii oraz zmniejsza różnorodność gatunkową w kulturach mieszanych [41, 44].

Stwierdzono, że dodanie kwasu mrówkowego w warunkach beztlenowych do hodowli bakterii prowadzących fermentację kwasów mieszanych, np. *Enterobacter aerogenes* zwiększa produkcję wodoru. Jest to wynik podwyższenia indukcji białka FHL przez zwiększone stężenie mrówczanu w komórce. Egzogennie podany kwas mrówkowy jest transportowany do wnętrza komórki. Uważa się, że w tych warunkach następuje również podwyższenie poziomu NADH w komórce, który wykorzystywany jest do produkcji wodoru [43].

Innym podejściem do problemu zwiększania wydajności produkcji wodoru w procesie fermentacji są próby modyfikacji genetycznych bakterii. Obecne metody genetyczne umożliwiają stworzenie mutantów, które mają zablokowane pewne szlaki metaboliczne lub nadprodukują wybrane białka. Skonstruowano pochodne *E. coli* z delecją genu *hycA* oraz z nadekspresją genu *fhIA* z plazmidowego DNA. Mutanty te nie posiadały białka represorowego HycA dla regulonu mrówczanu lub nadprodukowały białko induktorowe

tego regulonu, lub niosły obie te cechy. W mutancie *hycA* nadprodukującym białko FHLA obserwowano 2,8-krotny wzrost tempa produkcji wodoru w porównaniu do dzikiego szczepu. Podwyższenie produkcji wodoru stwierdzono też w pojedynczym mutancie  $\Delta hycA$  oraz w szczepie bez mutacji a nadprodukującym białko FHLA [86]. Ci sami autorzy skonstruowali kolejne mutanty *E. coli* z zablokowanymi szlakami produkcji kwasu mlekowego i kwasu bursztynowego w czasie fermentacji. Były to mutanty delecyjne *ldhA* i *frdBC*. Gen *ldhA* koduje dehydrogenazę mleczanową przekształcającą pirogronian w mleczan a gen *frdBC* reduktazę fumaranową, enzym szlaku syntezy bursztynianu z fosfoenolpirogronianu. Wydajność produkcji wodoru w podwójnym mutancie  $\Delta ldhA \Delta frdBC$  wynosiła 1,87 mola  $H_2$  na 1 mol glukozy w porównaniu ze szczepem dzikim (1,08 mola  $H_2$  na 1 mol glukozy) i osiągnęła 90% maksymalnej teoretycznej wydajności dla fermentacji kwasów mieszanych (2 mole  $H_2$  na 1 mol glukozy) [87]. Prowadzone w tej dziedzinie badania polegają na wprowadzaniu kolejnych mutacji w genomowym DNA i sprawdzaniu ich fenotypowych efektów. Skonstruowano szereg mutantów *E. coli* niosących mutacje w genach *hycA*, *hyaB* (kodującym hydrogenazę 1, patrz rozdz. 2.7), *hybC* (kodującym hydrogenazę 2, patrz rozdz. 2.7) oraz posiadających uszkodzenia w czterech innych genach spośród następujących: *fdnG* (kodującym podjednostkę  $\alpha$  dehydrogenazy FDH-N), *fdoG* (kodującym podjednostkę  $\alpha$  dehydrogenazy FDH-O), *focA*, *focB*, *frdC*, *ldhA*, *narG* (kodującym podjednostkę  $\alpha$  reduktazy azotanów A), *poxB* (kodującym oksydazę pirogronianu) i *aceE* (kodującym dehydrogenazę pirogronianu). Mutanty te nadprodukowały też białko FHLA. Największą produkcję wodoru, 4,6 razy większą w porównaniu do szczepu dzikiego, uzyskano dla szczepu niosącego siedem mutacji: *hyaB*, *hybC*, *hycA*, *fdoG*, *frdC*, *ldhA* i *aceE* [49]. W innych badaniach na drodze mutagenetyzacji chemicznej stosując metanosulfoniam etylu otrzymano mutanta *Enterobacter cloacae* z zablokowanymi szlakami syntezy etanolu, butanodiolu i kwasów organicznych. Mutant ten wykazywał 1,5-krotny wzrost produkcji wodoru w porównaniu ze szczepem dzikim [42]. Warto tu zaznaczyć, że z jednej strony zmodyfikowane szczepy bakteryjne często wykazują spowolniony wzrost i wymagają warunków laboratoryjnych do hodowli, z drugiej zaś strony istnieją obawy przed przedostaniem się genetycznie modyfikowanych organizmów do środowiska naturalnego.

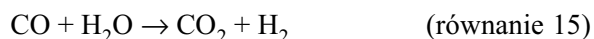
Znacznie bardziej obiecującym kierunkiem badań jest zastosowanie nowoczesnych metod biologii molekularnej do poszukiwania, selekcji, izolacji i identyfikacji nowych gatunków bakterii produkujących wodór z dużą wydajnością z naturalnych środowisk. Do metod tych należą głównie analiza genów kodują-

cych 16S rRNA oraz fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH). Szacuje się, że do tej pory zostało wyhodowane i zbadane niewielki procent wszystkich mikroorganizmów występujących w przyrodzie [74]. Analiza sekwencji genu 16S rRNA oraz metoda FISH są w ostatnich latach stosowane do analizy molekularnej składu mikrobiologicznego hodowli w bioreaktorach, gdzie produkowany jest wodór w procesach fermentacji. Badane są również różne naturalne środowiska [1, 31, 33, 38, 53, 69, 73]. Oprócz genów kodujących 16S rRNA analizowane są również geny kodujące hydrogenazy [33]. W ten sposób wykrywa się nowe gatunki bakterii. Z gorących źródeł w chińskiej prowincji Fujian wyizolowano gatunek bakterii, który charakteryzuje się zdolnością do fermentacji różnych cukrów, wysoką wydajnością produkcji wodoru i tolerancją na tlen. Metodą analizy sekwencji 16S rRNA zidentyfikowano, że jest to *Klebsiella oxytoca* HP1. Bakteria ta rosnąc na pożywce zawierającej sacharozę produkowała wodór z wydajnością 3,6 mola/mol sacharozy [57]. Nowe gatunki izoluje się z różnorodnych ścieków. Przykładami mogą być *Clostridium diolis* [53], *Bacillus coagulans* [39]. Wydajność produkcji wodoru dla *B. coagulans* była najwyższa w fazie stacjonarnego wzrostu i wynosiła 2,28 mola  $H_2$  na 1 mol glukozy.

## 2.4. Fotofermentacja

Kolejnym procesem biologicznym, w którym produkowany jest wodór jest fotosynteza prowadzona przez bakterie beztlenowe. Do bakterii fotosyntetyzujących należą bakterie purpurowe i bakterie zielone. Wyróżnia się cztery grupy tych bakterii: zielone i purpurowe bakterie siarkowe, zielone i purpurowe bakterie bezsiarkowe. Fotosynteza bakteryjna w warunkach beztlenowych przebiega inaczej niż u roślin. Donorem wodoru i elektronów do wiązania dwutlenku węgla nie jest woda, ale związki siarki (siarkowodór, tiosiarczyn, siarka) i wodór cząsteczkowy dla bakterii siarkowych oraz związki organiczne i wodór cząsteczkowy dla bakterii bezsiarkowych. W fotosyntezie bakteryjnej nie jest produkowany tlen, stąd jej nazwa – fotosynteza anoksygenowa. W błonach bakteryjnych znajdują się barwniki absorbujące energię świetlną oraz białka odpowiedzialne za transport elektronów. W wyniku transportu elektronów powstaje siła protomotoryczna i wytwarzana jest energia w postaci ATP. Elektrony przenoszone są na ferredoksynę i dalej na  $NAD^+$ , w ten sposób produkowana jest siła redukująca w postaci NADH [72]. Do najlepiej poznanych bakterii fotosyntetyzujących, które produkują wodór należą bakterie purpurowe bezsiarkowe *Rhodospirillaceae* a wśród nich rodzaje *Rhodospseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Rhodobacter*, *Rhodobium* wykorzystujące związki organiczne. Często badanym gatunkiem jest *Rhodospirillum*

*rubrum*. Do powstania wodoru u *Rhodospirillum rubrum* podobnie jak u innych bakterii bezsiarkowych dochodzi podczas redukcji azotu cząsteczkowego w wyniku aktywności nitrogenazy, która podobnie jak w przypadku sinic redukuje też protony do wodoru cząsteczkowego [17, 30]. Uważa się, że budowa i funkcjonowanie nitrogenazy bakterii purpurowych bezsiarkowych jest podobna do budowy nitrogenazy sinic i nie odbiega od ogólnego schematu dla nitrogenaz [13, 88]. Podobnie jak w przypadku sinic nitrogenazie towarzyszy hydrogenaza pobierająca Hup rozkładająca cząsteczkę wodoru do dwóch protonów i dwóch elektronów, która dostarcza protony do redukcji azotu. Mutanty wykazujące brak aktywności tej hydrogenazy wykazują podwyższoną produkcję wodoru zależną od nitrogenazy [37]. U *Rhodospirillum rubrum* wykryto jeszcze aktywności trzech innych hydrogenaz. Jedna pozwala też wykorzystywać wodór cząsteczkowy ze środowiska do redukcji dwutlenku węgla [37, 51]. Druga to hydrogenaza związana jest ze wzrostem w ciemności w warunkach fermentacji, rozkładająca mrówczan do dwutlenku węgla i wodoru, analogiczna do białka FHL *E. coli*. Oznacza to, że bakterie te przy braku światła prowadzą fermentację kwasów mieszanym [27, 51]. Trzecia hydrogenaza indukowana jest przez tlenek węgla i stanowi składnik kompleksu związanego z błoną komórkową utleniającego tlenek węgla według reakcji opisanej przez równanie 15:



Dehydrogenaza tlenu węgla, białko CODH, produkt genu *cooS* utlenia tlenek węgla do dwutlenku węgla przekazując elektrony i protony na podjednostkę przypominającą ferredoksynę, produkt genu *cooF*, skąd transportowane są do hydrogenazy, produkt genu *cooH*, w wyniku redukcji protonów powstaje wodór [22, 51]. Pokazano, że podając do hodowli *Rhodospirillum rubrum* gaz bogaty w tlenek węgla (ang. *syngas*), bakterie wytwarzają wodór [85]. Gaz (*syngas*) jest mieszaniną głównie tlenu węgla, dwutlenku węgla oraz wodoru i może być produktem gazyfikacji biomasy [19]. Niektóre purpurowe bakterie bezsiarkowe, np. *Rubrivivax gelatinosus*, są zdolne do wzrostu w warunkach gdzie jedynym źródłem węgla jest tlenek węgla a źródłem energii jest światło [52]. Zjawisko powstania wodoru reakcji z tlenkiem węgla i wody zostało też opisane dla przedstawiciela *Enterobacteriaceae*, rodzaju *Citrobacter* [62].

Jak wiadomo produktami ubocznymi fermentacji są kwasy organiczne (niskocząsteczkowe kwasy tłuszczowe) oraz alkohole. Kwasy organiczne nie są w żaden sposób wykorzystane przez bakterie fermentujące. Ponadto zbyt silne zakwaszenie podłoża (pH poniżej 5) powoduje zahamowanie produkcji wodoru. Kwasy organiczne i alkohole mogą natomiast stanowić źródło

elektronów i wodoru do redukcji dwutlenku węgla a także źródło węgla dla bakterii fotosyntetyzujących bezsiarkowych. Zjawisko to nazywamy fotofermentacją. Połączenie procesów fermentacji i fotofermentacji zwiększa wydajność produkcji wodoru [14, 17, 30]. Tworzy się układy dwuetapowe, w których najpierw ma miejsce fermentacja a potem produkty odpadowe z tego procesu stanowią substrat dla bakterii fotosyntetyzujących. Prowadzono hodowlę *Enterobacter cloacae* na podłożu zawierającym glukozę w warunkach beztlenowych, wydajność produkcji wodoru wynosiła 1,86 mola H<sub>2</sub> na 1 mol glukozy. Następnie podłoże z tej hodowli stanowiło pożywkę dla hodowli *Rhodobacter sphaeroides* w wyniku czego otrzymano 1,5–1,72 mola H<sub>2</sub> na 1 mol octanu [60]. W innym układzie badawczym zastosowano mieszaną hodowlę *Lactobacillus amylovorus* i *Rhodobium marinum* a substrat stanowiła bogata w skrobię biomasa zielenic. W pierwszym etapie skrobia z glonów była przekształcana w kwas mlekowy, który stanowił substrat dla bakterii fotosyntetyzujących [35]. Uważa się, że w optymalnych warunkach w wyniku połączenia procesów fermentacji i fotofermentacji możliwe jest nawet osiągnięcie 12 moli wodoru z jednego mola glukozy, czyli najwyższej możliwej teoretycznej wydajności produkcji wodoru z całkowitego rozkładu cząsteczki glukozy jak to opisuje równanie 11 [44].

## 2.5. Procesy fermentacyjne zachodzące w żwaczu

Żołądek przeżuwaczy jest rozbudowaną strukturą, przystosowaną do odżywiania się zwierząt pokarmem, którego podstawowym składnikiem jest biomasa roślinna. W pokarmie tym przeważają węglowodany: celuloza, hemiceluloza, pektyny, skrobia, fruktany, oligosacharydy i cukry proste. Żołądek przeżuwaczy składa się z czterech komór. Są to żwacz, czepiec, księgi i trawieniec. Żwacz przeżuwaczy stanowi swoisty beztlenowy ekosystem, jest komorą fermentacyjną, gdzie żyją liczne mikroorganizmy, bakterie, pierwotniaki (głównie orzęski) i grzyby. Część drobnoustrojów zasiedlających żwacz produkuje enzymy celulolityczne, hemicelulolityczne i pektynolityczne umożliwiające trawienie roślinnych węglowodanów strukturalnych. Produkty tego trawienia, cukry proste stanowią źródło energii dla żyjących tam mikroorganizmów. W wyniku procesów fermentacji w żwaczu produkowane są gazy, wodór i dwutlenek węgla, które stanowią substraty dla innych mikroorganizmów, głównie do produkcji metanu przez metanogeny. Istnieje ścisły związek typu syntrofia między producentami wodoru a metanogenami [81].

Producentami wodoru w żwaczu są bakterie, pierwotniaki i grzyby [70]. Znanymi gatunkami bakterii produkującymi wodór w żwaczu są celulolityczne



*Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Butyrovibrio fibrisolvens*, *Clostridium cellobioparum* jak również pektynolityczne *Lachnospira multiparus*, *Megasphaera elsdenii*, *Selenomonas ruminantium* [5, 16, 55, 56, 70]. *Ruminococcus albus* prowadzi fermentację, w której produktami końcowymi są octan, etanol, dwutlenek węgla i wodór. W warunkach niskiego stężenia wodoru bakteria ta może osiągnąć wydajność produkcji wodoru bliską maksymalnej, czyli 4 mole na 1 mol glukozy i produkować tylko octan, dwutlenek węgla i wodór. Ma to miejsce w warunkach, gdy wodór wykorzystywany jest przez inne drobnoustroje [55].

Pierwotnikami produkującymi wodór w żwaczu są celulolityczne orzęski z rodzaju *Entodiniomorphida* oraz pektynolityczne z rodzaju *Holotricha*. Badania nad *Holotricha* ograniczają się do trzech gatunków, *Dasytricha ruminantium*, *Isotricha prostoma* i *Isotricha intestinalis*. Wykorzystują one głównie rozpuszczalne cukry proste jak D-glukoza, D-fruktoza, D-galaktoza a także rozpuszczalne oligo- i polisacharydy. Znaczenie pierwotników rodzaju *Holotricha* w fermentacji w żwaczu zależy od rodzaju pokarmu, którym karmi się zwierzęta. Jest ono małe, gdy paszę stanowi siano, a znacznie większe, gdy jest to pokarm bogaty w cukry, np. melasowane wysłodki buraczane. Produktami fermentacji orzęsków *Holotricha* są kwas mlekowy, kwas octowy, kwas masłowy, dwutlenek węgla i wodór. Wykrywa się również niewielkie ilości kwasu mrówkowego oraz propionowego. U pierwotników tych nie stwierdzono obecności dehydrogenazy mrówczanu. Uważa się, że przekształcenie pirogronianu do acetylo-CoA jak również szlaki prowadzące do powstania końcowych produktów fermentacji (mleczan, octan, maślan) przebiegają w analogiczny sposób jak te w fermentacji masłowej prowadzonej przez bakterie. Przekształcenie pirogronianu do acetylo-CoA, i dalsze reakcje prowadzące do powstania octanu oraz produkcja wodoru zlokalizowane są w wewnątrzkomórkowych organellach jakimi są hydrogenosomy [81], które będą omówione w następnym rozdziale.

Obecnie nie ma opracowanych warunków, aby hodować pierwotniki z rodzaju *Holotricha* poza żwaczem dłużej niż do 48 godzin. Z badań własnych autorki artykułu wiadomo, że hodowla *in vitro* *Dasytricha ruminantium* i *Isotricha prostoma* z glukożą jako źródłem węgla i przy ograniczeniu procesów metanogenezy produkuje gaz, który zawiera do 50% wodoru. Gaz ten jest w stanie zasilić chemiczne ogniwo paliwowe (niskotemperaturowe, polimerowe ogniwo paliwowe) pracujące w temperaturze pokojowej tak jak czysty wodór [65, dane przygotowywane do publikacji]. Drugą grupą pierwotników produkujących wodór w żwaczu są amyloolityczne i celulolityczne orzęski z rodziny *Entodiniomorphida*. Przykładowe gatunki to *Entodinium caudatum*, *Epidinium caudatum*, *Ophryosco-*

*lex caudatus*. Produktami ich metabolizmu są kwas octowy, masłowy, dwutlenek węgla, wodór, a także niewielkie ilości kwasu mlekowego, mrówkowego i propionowego [82].

Żwaczowymi grzybami produkującym wodór są np. *Neocallimastix frontalis*, rodzaje *Piromyces*, *Orpinomyces* czy *Anaeromyces* [61, 66]. Najlepiej poznany jest gatunek *Neocallimastix frontalis*. W procesie fermentacji prowadzonej przez *Neocallimastix frontalis* pirogronian powstały w czasie glikolizy przekształcany jest w octan, etanol, mleczan i bursztynian. U *Neocallimastix frontalis* oraz u grzybów z rodzaju *Piromyces* wykryto liazę pirogronian:mrówczan (PFL) w cytoplazmie i w hydrogenosomach. Stwierdzono też brak obecności enzymu PFO [28, 61]. Procesy prowadzące do powstania wodoru opisano w rozdziale dotyczącym hydrogenosomów.

## 2.6. Hydrogenosomy

Hydrogenosomy są to organella komórkowe otoczone podwójną błoną lipidowo-białkową, które pełnią funkcje energetyczne u beztlenowych organizmów eukariotycznych. Są przystosowaniem do życia w środowisku anaerobowym. Struktury te wykryto u beztlenowych pierwotników: pasożytniczych wiciowców, np. *Trichomonas vaginalis* (rzęśistek pochwoy), beztlenowych orzęsków, i beztlenowych grzybów. Organella te uważa się za odpowiedniki mitochondriów. Dane biochemiczne i molekularne wskazują na wspólne pochodzenie mitochondriów i hydrogenosomów. Stosunkowo dobrze poznane są hydrogenosomy *Trichomonas vaginalis*. W hydrogenosomach pierwotników znajdują się enzymy: oksydoreduktaza pirogronian:ferrodoksyna (PFO) oraz hydrogenazy. Pirogronian powstały w procesie glikolizy transportowany jest do hydrogenosomu. Tam ulega dekarboksylacji przez oksydoreduktazę pirogronian:ferrodoksyna do acetylo-CoA i dwutlenku węgla przy udziale ferredoksyny, która jest zredukowana. Następnie w wyniku przekształcania acetylo-CoA w octan na drodze fosforylacji substratowej przez transferazę octanowo-bursztynylo-CoA i syntetazę bursztynylo-CoA produkowane jest ATP. W ekstraktach komórkowych z pierwotników z rodzaju *Holotricha* nie wykryto tych dwóch enzymów. U tych pierwotników octan powstaje w wyniku reakcji prowadzonych przez fosfoacetyltransferazę i kinazę octanową [10, 28, 81]. Elektrony przekazywane są na ferrodoksynę a następnie przy udziale hydrogenaz następuje redukcja protonów do wodoru cząsteczkowego. Stąd nazwa organellum. W ten sposób następuje oddzielenie ostatnich etapów beztlenowych procesów metabolicznych prowadzących do produkcji energii w komórce eukariotycznej. Oddzielenie to służy zwiększeniu syntezy ATP przez generowanie

siły protomotorycznej analogicznie jak odbywa się to w mitochondriach. Usuwanie protonów z matrix hydrogenosomów przez tworzenie się cząsteczek wodoru i ich dyfuzję powoduje powstanie gradientu pH, co sprzyja syntezie ATP [10, 28]. U pierwotniaków z rodzaju *Holotricha* stwierdzono, że aktywność enzymów syntezy maślanu, fosfobutyrylotransferazy i kinazy maślanu oraz dehydrogenazy mleczanu jest również częściowo związana z hydrogenosomami [81].

W hydrogenosomach grzybów *Neocallimastix frontalis* podobnie jak z rodzaju *Piromyces* pirogronian przekształcany jest do acetylo-CoA i mrówczanu przez liazę pirogronian:mrówczan. U organizmów tych nie wykryto oksydoreduktazy PFO. Acetylo-CoA ulega fosforylacji substratowej przy udziale transferazy octanowo-bursztynilo-CoA i syntetazy bursztynilo-CoA w wyniku czego produkowane jest ATP i wodór jak opisano u pierwotniaków [24, 28]. Charakterystyczną cechą fermentacji *Neocallimastix* i *Piromyces* jest powstawanie znaczącej ilości pirogronianu z malonianu w hydrogenosomach. Według jednych autorów pirogronian powstały w procesie glikolizy przekształcany jest w cytoplazmie przez karboksylazę pirogronianu do szczawiooctanu [61]. Według innych szczawiooctan powstaje z fosfoenolpirogronianu w wyniku reakcji katalizowanej przez karboksykinazę fosfoenolpirogronianu. Następnie szczawiooctan ulega redukcji do malonianu przez dehydrogenazę malonianu. Malonian jest transportowany do hydrogenosomu, gdzie następuje jego utlenianie przez tzw. enzym malonianowy, w wyniku czego powstaje pirogronian (substrat dla liazy pirogronian:mrówczan), dwutlenek węgla i NAD(P)H. Elektrony przenoszone są przez oksydoreduktazę NADH:ferrodoxyna na ferrodoxynę. Dalej w wyniku aktywności hydrogenazy następuje redukcja protonów i produkowany jest wodór. W wyniku przekształceń malonianu w cytoplazmie powstaje bursztynian [28, 61]. U *Trichomonas vaginalis* również istnieje podobny szlak i część pirogronianu tworzy się z malonianu w hydrogenosomach w wyniku działania enzymu malonianowego [20]. U orzęsków rodzaju *Holotricha* pirogronian również może powstać z malonianu w podobny sposób, ale ma to miejsce w cytoplazmie [83]. Istnieją też mikroorganizmy, które nie posiadają hydrogenosomów, a wykryto u nich hydrogenazy i wiadomo, że są zdolne do produkcji wodoru. Należą do nich pasożytnicze pierwotniaki, np. *Giardia intestinalis*, wiciowiec powodujący infekcje przewodu pokarmowego człowieka, czy *Entamoeba histolytica* oraz *Spiroplasma barkhanus* [47].

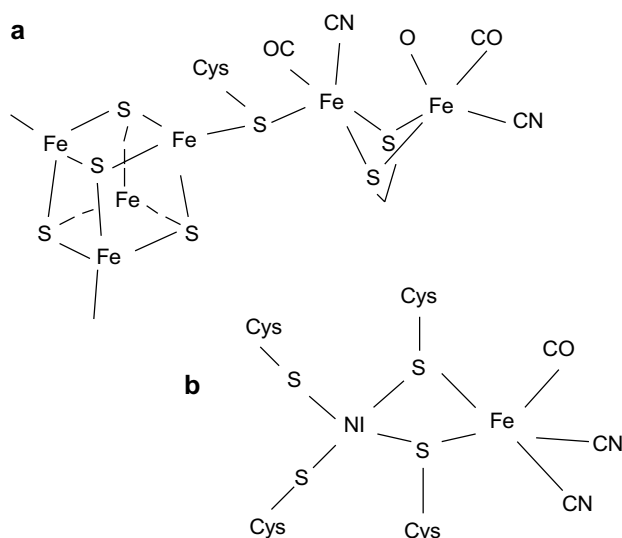
## 2.7. Hydrogenazy

Mianem hydrogenaz określa się rodzinę metaloenzymów, które katalizują odwracalną reakcję utleniania wodoru opisaną przez równanie 16:



Substrat hydrogenaz jest najmniejszym znanym w biologii. Ze względu na metal grupy prostetycznej znajdującej się w centrum aktywnym enzymu, hydrogenazy można podzielić na dwie główne klasy: hydrogenazy [FeFe], posiadające dwa atomy żelaza oraz hydrogenazy [FeNi], posiadające jeden atom żelaza i jeden atom niklu. Uważa się, że u organizmów prokariotycznych bardziej rozpowszechnione są hydrogenazy [NiFe] niż hydrogenazy [FeFe]. Obecność hydrogenaz [NiFe] stwierdzono tylko u organizmów prokariotycznych, u bakterii najczęściej w klasie *Clostridia*,  *$\gamma$ -Proteobacteria* i u archeonów. Hydrogenazy [FeFe] występują u bakterii i organizmów eukariotycznych, nie wykryto ich natomiast u archeonów. Funkcją hydrogenaz [FeFe] jest produkcja wodoru cząsteczkowego. Większość poznanych hydrogenaz [NiFe] przeprowadza reakcję utleniania wodoru do protonów i elektronów. Należą tu hydrogenazy pobierające (ang. *uptake hydrogenases*). Hydrogenazami [NiFe], które katalizują reakcje wytwarzania wodoru są hydrogenazy bakterii fermentacji mieszanej, np. *Escherichia coli*. U *E. coli* znane są cztery hydrogenazy [NiFe]. Dwie z nich, białka Hyd-1 i Hyd-2 utleniają wodór. Hydrogenaza Hyd-3 wchodzi w skład omawianego w rozdz. 2.3.3 i 2.3.4 kompleksu FHL odpowiedzialnego za produkcję wodoru w warunkach fermentacyjnych. Wykryto też hydrogenazę Hyd-4, produkt jednego z genów operonu *hyf*. Uważa się, że kompleks Hyf pełni analogiczną funkcję do kompleksu FHL, chociaż ekspresja genów operonu *hyf* jest słaba.

W budowie obu klas hydrogenaz [NiFe] i [FeFe] wyróżnia się silnie konserwowany rdzeń oraz różnorodne pomocnicze domeny i podjednostki. W przypadku hydrogenaz [FeFe] rdzeń ten składa się z domeny H o masie cząst. 40 kDa zbudowanej z 350 aminokwasów, która jest połączona z grupą prostetyczną [FeFe] oraz centrum żelazowo-siarkowym [4Fe-4S] poprzez atom siarki jednej reszty cysteiny (rys. 4a). Rdzeń hydrogenaz [NiFe] zbudowany jest z dużej i małej podjednostki. Duża podjednostka o masie cząst. 60 kDa związana jest z grupą prostetyczną [NiFe] przez atomy siarki czterech reszt cystein lub rzadziej trzech reszt cystein i jednej reszty selenocysteiny (rys. 4b). Mała podjednostka o masie cząst. 30 kDa wiąże od jednego do trzech centrów żelazowo-siarkowych [4Fe-4S] lub [3Fe-4S]. Budowa rdzenia obu typów hydrogenaz i ich dojrzewanie są zupełnie odmienne, co wskazuje na odrębne pochodzenie ewolucyjne mimo pełnienia podobnych funkcji. Natomiast cechą wspólną obu hydrogenaz są dwuatomowe ligandy CO i CN<sup>-</sup> połączone z atomami żelaza grup prostetycznych hydrogenaz. Hydrogenazy [NiFe] posiadają jedną cząsteczkę CO i dwie cząsteczki CN<sup>-</sup>. Hydrogenazy [FeFe] mają pięć ligandów, każdy atom Fe związany jest z jedną cząs-



Rys. 4. Centra aktywne hydrogenaz [FeFe] (a) i [FeNi] (b).  
Objaśnienia w tekście.

teczką CO i jedną  $\text{CN}^-$ , jest jeszcze dodatkowa część CO łącząca ze sobą dwa atomy żelaza.

Funkcją domen i podjednostek pomocniczych hydrogenaz jest transport elektronów do i z centrum aktywnego hydrogenazy. W przypadku obu hydrogenaz są one podobne i zawierają centra żelazowo-siarkowe [Fe-S]. Hydrogenazy [NiFe] są dimerami, a hydrogenazy [FeFe] głównie monomerami, spotyka się również dimery, trimery i tetramery. Hydrogenazy [FeFe] w przeciwieństwie do większości hydrogenaz [NiFe] są białkami cytoplazmatycznymi, formy peryplazmatyczne czy też związane z błonami komórkowymi należą do rzadkości.

Dojrzewanie hydrogenaz [NiFe] jest dobrze poznane dla hydrogenaz *E. coli*. Cechą charakterystyczną dla tych hydrogenaz jest to, że geny je kodujące oraz białka pomocnicze tworzą operony (patrz też rozdz. 2.3.4). Poszczególnymi etapami są synteza ligandów  $\text{CN}^-$  i CO, wiązanie z atomami żelaza i niklu, połączenie z dużą podjednostką hydrogenazy za co odpowiedzialne są białka pomocnicze Hyp; dojrzewanie centrum aktywnego hydrogenaz przez endoproteolityczne odcięcie C-terminalnego peptydu dużej podjednostki katalizowane przez specyficzne proteazy, inne dla każdej hydrogenazy; transport hydrogenaz do miejsc działania. Dojrzewanie hydrogenaz [FeFe] jest znacznie słabiej poznane niż hydrogenaz [NiFe]. Do tej pory nie stwierdzono istnienia operonów genów odpowiedzialnych za dojrzewanie hydrogenaz [FeFe]. Dużym postępem było wykrycie funkcji białek kodowanych przez geny *hydE*, *hydF* i *hydG* *Chlamydomonas reinhardtii*, które uczestniczą w dojrzewaniu hydrogenaz [FeFe]. Ich homologi stwierdzono u innych organizmów, u których występują hydrogenazy [FeFe].

Wyróżnia się też trzecią klasę hydrogenaz. Są to hydrogenazy Hmd występujące u metanogenów. W ich

centrum aktywnym występuje tylko jeden atom żelaza, nie posiadają też centrów żelazowo-siarkowych [Fe-S]. Katalizują one reakcję pośrednią w procesie metanogenezy, utleniania wodoru i redukcji  $N^5, N^{10}$ -metenyltetrahydrometanopteryny do  $N^5, N^{10}$ -metylenetetrahydrometanopteryny i protonu. Enzym ten też posiada ligandy w postaci CO i CN [18, 21, 54, 67].

## 2.8. Redukcja siarczanów

Wodór jest produkowany w czasie oddychania bez-tlenowego przez bakterie redukujące siarczany jako ostateczny receptor elektronów w procesie oddychania. Dobrze poznana bakterią jest *Desulfovibrio vulgaris*. Substratami dla bakterii redukujących siarczany są kwas mlekowy, także inne kwasy, alkohole oraz wodór. Gdy substratem jest np. kwas mlekowy to ulega on przekształceniu do pirogronianu, ten do acetylo-CoA, ostatecznym produktem procesu jest octan. U bakterii tych wykryto obecność zarówno oksydoreduktazy pirogronian:ferredoksyna jak i liazy pirogronian:mrówczan. Powstaje więc też mrówczan. Reakcjom tym towarzyszy uwalnianie wodoru w wyniku aktywności hydrogenaz cytoplazmatycznych. Peryplazmatyczne hydrogenazy utleniają wodór do protonów i elektronów. Protony przekazywane są do siarczanu redukując go do siarkowodoru. Jednocześnie transportowane są elektrony, w wyniku fosforylacji oksydatywnej powstaje ATP. Analizując produkty gazowe *Desulfovibrio vulgaris* stwierdzono, że zanim pojawi się siarkowodór, najpierw wykrywa się wodór a także tlenek węgla. Tlenek węgla przekształcany jest do dwutlenku węgla i wodoru w wyniku działania dehydrogenazy CO (CODH) podobnie jak ma to miejsce u *Rhodospirillum rubrum* [79].

Przy braku siarczanu w podłożu ma miejsce fermentacja, której ostatecznymi produktami są octan i wodór. Taki układ może istnieć np. przy synantroticnych związkach bakterii redukujących siarczany i metanogenów. Te ostatnie zapewniają korzystne warunki termodynamiczne do powstawania wodoru, utrzymując niskie jego stężenie przez wykorzystanie wodoru do produkcji metanu [75].

## 3. Podsumowanie

Wodór uważany jest za nośnik energii, który w przyszłości może, przynajmniej częściowo, zastąpić tradycyjne źródła energii. W związku z tym, że obecne metody produkcji wodoru są energochłonne, opierają się na tradycyjnych źródłach energii, powodują zatrucie środowiska i nie mogą być stosowane na większą skalę, nastąpiło duże zainteresowanie produkcją wodoru

z biomasy w procesach prowadzonych przez drobnoustroje w warunkach beztlenowych. Kierunek ten wydaje się bardzo atrakcyjny, ponieważ produkcja wodoru z biomasy może stanowić sposób usuwania różnorodnych odpadów organicznych. W artykule zostały szczegółowo omówione znane procesy biologiczne w wyniku których powstaje wodór: fermentacja, fotofermentacja, bezpośrednia i pośrednia biofotoliza, oddychanie beztlenowe bakterii redukujących siarczan przy braku siarczanu w podłożu. Najbardziej obiecujące z punktu widzenia przyszłych zastosowań wydają się być procesy fermentacji. Wiele obecnych badań dotyczy sposobów zwiększenia wydajności produkcji wodoru w warunkach fermentacji. Obiecującym kierunkiem badań jest zastosowanie nowoczesnych metod biologii molekularnej do selekcji, izolacji i identyfikacji nowych gatunków bakterii produkujących wodór z dużą wydajnością z różnych środowisk. Enzymami odpowiedzialnymi za produkcję wodoru we wszystkich procesach biologicznych są hydrogenazy. Są to metaloenzymy katalizujące odwracalną reakcję utleniania wodoru zgodnie z równaniem:  $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2$ . U beztlenowych mikroorganizmów eukariotycznych hydrogenazy znajdują się zwykle w wyspecjalizowanych organellach komórkowych zwanych hydrogenosomami. Hydrogenosomy są przystosowaniem do życia w środowisku anaerobowym. Organella te uważa się za odpowiedniki mitochondriów u organizmów tlenowych. W artykule omówiono również drobnoustroje odpowiedzialne za produkcję wodoru w żwaczu przeżuwaczy, który jest specyficznym ekosystemem, swoją komorą fermentacyjną.

## Piśmiennictwo

- Ahn Y., Park E.J., Oh Y.K., Park S., Webster G., Weightman A.J.: Biofilm microbial community of a thermophilic trickling biofilter used for continuous biohydrogen production. *FEMS Microbiol. Lett.* **249**, 31–38 (2005)
- Alexeeva S., de Kort B., Sawers G., Hellingwerf K.J., de Mattos M.J.T.: Effects of limited aeration and of the ArcAB system on intermediary pyruvate catabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**, 4934–4940 (2000)
- Altuvia S., Zhang A., Argaman L., Tiwari A., Storz G.: The *Escherichia coli* OxyS regulatory RNA represses *fhfA* translation by blocking ribosome binding. *EMBO J.* **17**, 6069–6075 (1998)
- Angenent L.T., Karim K., Al-Dahhan M.H., Wrenn B.A., Domiguez-Espinoza R.: Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends Biotechnol.* **22**, 477–485 (2004)
- Atta M., Meyer J.: Characterization of the gene encoding the [Fe]-hydrogenase from *Megasphaera elsdenii*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1476**, 368–371 (2000)
- Atteia A., van Lis R., Gelius-Dietrich G., Adrait A., Garin J., Joyard J., Rolland N., Martin W.: Pyruvate formate-lyase and a novel route of eukaryotic ATP synthesis in *Chlamydomonas* mitochondria. *J. Biol. Chem.* **281**, 9909–9918 (2006)
- Balint B., Bagi Z., Toth A., Rakhely G., Perei K., Kovacs K.L.: Utilization of keratin-containing biowaste to produce biohydrogen. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**, 404–410 (2005)
- Benemann J.: Hydrogen biotechnology: Progress and prospects. *Nature Biotechnol.* **14**, 1101–1103 (1996)
- Benemann J.: Feasibility analysis of photobiological hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy*, **22**, 979–987 (1997)
- Biagini G.A., Finlay B.J., Lloyd D.: Evolution of the hydrogenosome. *FEMS Microbiol. Lett.* **155**, 133–140 (1997)
- Bock A., Fermentation (w:) Encyclopedia of Microbiology, vol 2, Academic Press, 2000, s. 343.
- Brown K.: Producing renewable hydrogen from biomass. *BioCycle*, January 2004, 54–55 (2004)
- Burris R.H.: Nitrogenases. *J. Biol. Chem.* **266**, 9339–9342 (1991)
- Chen C.Y., Lu W.B., Liu C.H., Chang J.S.: Improved phototrophic  $\text{H}_2$  production with *Rhodospseudomonas palustris* WP3-5 using acetate and butyrate as dual carbon substrates. *Bioresour. Technol.* (2007) doi:10.1016/j.biortech.2007.07.037.
- Cheong D.Y., Hansen C.L.: Bacterial stress enrichment enhances anaerobic hydrogen production in cattle manure sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 635–643 (2006)
- Chung K.T.: Inhibitory effects of  $\text{H}_2$  on growth of *Clostridium cellobioparum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**, 342–348 (1976)
- Das D., Veziroglu T.N.: Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *Int. J. Hydrogen Energy*, **26**, 13–28 (2001)
- Das D., Dutta T., Nath K., Kotay S.M., Das A.K., Veziroglu T.N.: Role of Fe-hydrogenase in biological hydrogen production. *Current Science*, **90**, 1627–1637 (2006)
- Do Y.S., Smeenk J., Broer K.M., Kisting C.J., Brown R., Heindel T.J., Bobik T.A., DiSpirito A.A.: Growth of *Rhodospirillum rubrum* on synthesis gas: conversion of CO to  $\text{H}_2$  and poly-beta-hydroxyalkanoate. *Biotechnol. Bioeng.* **97**, 279–286 (2007)
- Dolezal P., Vanacova S., Tachezy J., Hrdy I.: Malic enzyme of *Trichomonas vaginalis*: two enzyme families, two distinct origins. *Gene*, **329**, 81–92 (2004)
- Forzi L., Sawers R.G.: Maturation of [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*. *Biometals*, **20**, 565–578 (2007)
- Fox J.D., Kerby R.L., Roberts G.P., Ludden P.W.: Characterization of the CO-induced, CO-tolerant hydrogenase from *Rhodospirillum rubrum* and the gene encoding the large subunit of the enzyme. *J. Bacteriol.* **178**, 1515–1524 (1996)
- Gavala H.N., Skiadas I.V., Ahring B.K., Lyberatos G.: Thermophilic anaerobic fermentation of olive pulp for hydrogen and methane production: modelling of the anaerobic digestion process. *Water Sci. Technol.* **53**, 271–279 (2006)
- Gelius-Dietrich G., Henze K.: Pyruvate formate lyase (PFL) and PFL activating enzyme in the chytrid fungus *Neocallimastix frontalis*: a free radical enzyme system conserved across divergent eukaryotic lineages. *J. Eukaryot. Microbiol.* **51**, 456–463 (2004)
- Ghirardi M.L., Zhang L., Lee J.W., Flynn T., Seibert M., Greenbaum E., Melis A.: Microalgae: a green source of renewable  $\text{H}_2$ . *Trends Biotechnol.* **18**, 506–511 (2000)
- Girbal L., Croux C., Vasconcelos I., Soucaille P.: Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *FEMS Microbiol. Rev.* **17**, 287–297 (1995)
- Gorrell T.E., Uffen R.L.: Fermentative metabolism of pyruvate by *Rhodospirillum rubrum* after anaerobic growth in darkness. *J. Bacteriol.* **131**, 533–543 (1977)
- Hackstein J.H.P., Akhmanova A., Boxma B., Harhangi H.R., Voncken G.J.: Hydrogenosomes: eukaryotic adaptations to anaerobic environments. *Trends Microbiol.* **7**, 441–447 (1999)

29. Hallenbeck P.C.: Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. *Water Sci. Technol.* **52**, 21–29 (2005)
30. Hallenbeck P.C., Benemann J.R.: Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *Int. J. Hydrogen Energy*, **27**, 1185–1193 (2002)
31. Hung C.H., Lee K.S., Cheng L.H., Huang Y.H., Lin P.J., Chang J.S.: Quantitative analysis of a high-rate hydrogen-producing microbial community in anaerobic agitated granular sludge bed bioreactors using glucose as substrate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**, 693–701 (2007)
32. Ito T., Nakashimada Y., Senba K., Matusi T., Nishio N.: Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *J. Biosci. Bioeng.* **100**, 260–265 (2005)
33. Jen C.J., Chou C.H., Hsu P.C., Yu S.J., Chen W.E., Lay J.J., Huang C.C., Wen F.S.: Flow-FISH analysis and isolation of clostridial strains in an anaerobic semi-solid bio-hydrogen producing system by hydrogenase gene target. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 1126–1134 (2007)
34. Kapdan I.K., Kargi F.: Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology*, **38**, 569–582 (2006)
35. Kawaguchi H., Hashimoto K., Hirata K., Miyamoto K.: H<sub>2</sub> production from algal biomass by a mixed culture of *Rhodobium marinum* A-501 and *Lactobacillus amylovorus*. *J. Biosci. Bioeng.* **91**, 277–282 (2001)
36. Kenealy W.R., Cao Y., Weimer P.J.: Production of caproic acid by cocultures of ruminal cellulolytic bacteria and *Clostridium kluyveri* grown on cellulose and ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 507–513 (1995)
37. Kern M., Klipp W., Klemme J.H.: Increased nitrogenase-dependent H<sub>2</sub> photoproduction by *hup* mutants of *Rhodospirillum rubrum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1768–1774 (1994)
38. Kim S.H., Han S.K., Shin H.S.: Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter. *Process Biochem.* **41**, 199–207 (2006)
39. Kotay S.M., Das D.: Microbial hydrogen production with *Bacillus coagulans* IIT-BT S1 isolated from anaerobic sewage sludge. *Bioresour. Technol.* **98**, 1183–1190 (2007)
40. Kovacs A.T., Rakhley G., Balogh J., Maroti G., Fulop A., Kovacs K.L.: Anaerobic regulation of hydrogenase transcription in different bacteria. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 36–38 (2005)
41. Kraemer J.T., Bagley D.M.: Improving the yield from fermentative hydrogen production. *Biotechnol. Lett.* **29**, 685–695 (2007)
42. Kumar N., Ghosh A., Das D.: Redirection of biochemical pathways for the enhancement of H<sub>2</sub> production by *Enterobacter cloacae*. *Biotechnol. Lett.* **23**, 537–541 (2001)
43. Kurokawa T., Tanisho S.: Effects of formate on fermentative hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. *Marine Biotechnol.* **7**, 112–118 (2005)
44. Levin D.B., Pitt L., Love M.: Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *Int J Hydrogen Energy*, **29**, 173–185 (2004)
45. Lin C.Y., Hung C.H., Chen C.H., Chung W.T., Cheng L.H.: Effects of initial cultivation pH on fermentative hydrogen production from xylose using natural mixed cultures. *Process Biochem.* **41**, 1383–1390 (2006)
46. Liu F., Fang B.: Optimization of bio-hydrogen production from biodiesel wastes by *Klebsiella pneumoniae*. *Biotechnol. J.* **2**, 374–380 (2007)
47. Lloyd D., Ralphs J.R., Harris J.C.: *Giardia intestinalis*, a eukaryote without hydrogenosomes, produces hydrogen. *Microbiology*, **148**, 727–733 (2002)
48. Logan B.E.: Extracting hydrogen and electricity from renewable resources. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 160A–167A (2004)
49. Maeda T., Sanchez-Torres V., Wood T.K.: Enhanced hydrogen production from glucose by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* DOI 10.1007/s00253-007-1217-0 (2007)
50. Mandal B., Nath K., Das D.: Improvement of biohydrogen production under decreased partial pressure of H<sub>2</sub> by *Enterobacter cloacae*. *Biotechnol. Lett.* **28**, 831–835 (2006)
51. Maness P.C., Weaver P.F.: Evidence for three distinct hydrogenase activities in *Rhodospirillum rubrum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**, 751–756 (2001)
52. Maness P.C., Weaver P.F.: Hydrogen production from a carbon-monoxide oxidation pathway in *Rubrivivax gelatinosus*. *Int J Hydrogen Energy*, **27**, 1407–1411 (2002)
53. Matsumoto M., Nishimura Y.: Hydrogen production by fermentation using acetic acid and lactic acid. *J. Biosci. Bioeng.* **103**, 236–241 (2007)
54. Meyer J.: [FeFe] hydrogenases and their evolution: a genomic perspective. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 1063–1084 (2007)
55. Miller T.J., Wolin M.J.: Bioconversion of cellulose to acetate with pure cultures of *Ruminococcus albus* and a hydrogen-using acetogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3832–3835 (1995)
56. Miller T.J., Wolin M.J.: Formation of hydrogen and formate by *Ruminococcus albus*. *J. Bacteriol.* **116**, 836–846 (1973)
57. Minnan L., Jinli H., Xiaobin W., Huijuan X., Jinzao C., Chuannan L., Fengzhang Z., Liangshu X.: Isolation and characterization of a high H<sub>2</sub>-producing strain *Klebsiella oxytoca* HP1 from a hot spring. *Res. Microbiol.* **156**, 76–81 (2005)
58. Nakashimada Y., TRachman M.A., Kakizono T., Nishio N.: Hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* altered by extracellular and intracellular redox state. *Int. J. Hydrogen Energy*, **27**, 1399–1405 (2002)
59. Nath K., Das D.: Hydrogen from biomass. *Current Science*, **85**, 265–271 (2003)
60. Nath K., Kumar A., Das D.: Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* strain O.U.001 using spent media of *Enterobacter cloacae* strain DM11. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**, 533–541 (2005)
61. O’Fallon J.V., Wright R.W., Calza R.E.: Glucose metabolic pathways in the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis* EB188. *Biochem. J.* **274**, 595–599 (1991)
62. Oh Y.K., Seol E.H., Kim J.R., Park S.: Fermentative biohydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp. Y19. *Int. J. Hydrogen Energy*, **28**, 1353–1359 (2003)
63. Oh S.E., Logan B.E.: Hydrogen and electricity production from a food processing wastewater using fermentation and microbial fuel cell technologies. *Water Res.* **39**, 4673–4682 (2005)
64. Piela P., Zelenay P.: Researchers redefine the DMFC roadmap. *Fuel Cell Review*, **1**, 17–23 (2004)
65. Piela P., Michałowski T., Szewczyk K.W., Miltko R., Sikora R., Piela B., Grzesiuk E., Sikora A.: Construction of microbial fuel cell based on rumen microorganisms. Sesja sprawozdawcza w Instyt. Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. *Workshop on: Molecular Biology of the Cell. Implications for health and biotechnology.* Warsaw, 25–28 October, 2006, Abstrakt II.37.

66. Philips M.W., Gordon G.L.R.: Carbohydrate fermentation by three species of polycentric ruminal fungi from cattle and water buffalo in tropical Australia. *Anaerobe*, **1**, 41–47 (1995)
67. Pilak O., Mamat B., Vogt S., Hagemeyer C.H., Thauer R.K., Sima S., Vonnrhein C., Warkentin E., Ermler U.: The crystal structure of the apoenzyme of the iron-sulphur cluster-free hydrogenase. *J. Mol. Biol.* **358**, 798–809 (2006)
68. Pinto F.A.L., Troshina O., Lindblad P.: A brief look at three decades of research on cyanobacterial hydrogen evolution. *Int. J. Hydrogen Energy*, **27**, 1209–1215 (2002)
69. Ren N., Xing D., Rittmann B.E., Zhao L., Xie T., Zhao X.: Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production. *Environ. Microbiol.* **9**, 1112–1125 (2007)
70. Russell J.B.: Rumen fermentation (w:) Encyclopedia of microbiology. Academic Press, Nowy Jork, 2000, s. 185.
71. Sawers R.G.: Formate and its role in hydrogen production in *Escherichia coli*. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 42–46 (2005)
72. Schlegel H.G.: Mikrobiologia ogólna, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2001.
73. Shin H.S., Youn J.H., Kim S.H.: Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *Int. J. Hydrogen Energy*, **29**, 1355–1363 (2004)
74. Skowrońska A., Zmysłowska I.: Współczesne metody identyfikacji bakterii stosowane w ekologii mikroorganizmów wodnych – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH). *Post. Mikrobiol.* **45**, 183–193 (2006)
75. Stolyar S., Dien S.V., Hillesland K.L., Pinel N., Lie T.J., Leigh J.A., Stahl D.A.: Metabolic modeling of a mutualistic microbial community. *Mol. Syst. Biol.* **3**:92, doi: 10.1038/msb4100131 (2007)
76. Stryer L.: Biochemia, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 1999.
77. Tamagnini P., Axelsson R., Lindberg P., Oxelfelt F., Wunschiers R., Lindblad P.: Hydrogenases and hydrogen metabolism of Cyanobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 1–20 (2002)
78. Valdez-Vazquez I., Sparling R., Risbey D., Rinderknecht-Seijas N., Poggi-Varaldo H.M.: Hydrogen generation via anaerobic fermentation of paper mill wastes. *Bioresour. Technol.* **96**, 1907–1913 (2005)
79. Voordouw G.: Carbon monoxide cycling by *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *J. Bacteriol.* **184**, 5903–5911 (2002)
80. Wilde E., Collins M.D., Hippe H.: *Clostridium pascui* sp. nov., a new glutamate-fermenting sporeformer from a pasture in Pakistan. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 164–170 (1997)
81. Williams A.G., Coleman G.S.: Metabolism of Holotrich Protozoa (w:) The Rumen Protozoa, red. A.G. Williams, G.S. Coleman, G.S. Springer-Verlag, New York, 1992, s. 256.
82. Williams A.G., Coleman G.S.: Metabolism of Entodiniomorphid Protozoa (w:) The Rumen Protozoa, red. A.G. Williams, G.S. Coleman, G.S. Springer-Verlag, New York, 1992, s. 173.
83. Yarlett N., Hann A.C., Lloyd D., Williams A.: Hydrogenosomes in the rumen protozoon *Dasytricha ruminantium* Schuberg. *Biochem. J.* **200**, 365–372.
84. Yokoyama H., Waki M., Ogino A., Ohmori H., Tanaka Y.: Hydrogen fermentation properties of undiluted cow dung. *J. Biosci. Bioeng.* **104**, 82–85 (2007)
85. Younesi H., Najafpour G., Ismail K.S.K., Mohamed A.R., Kamaruddin A.H.: Biohydrogen production in a continuous stirred tank bioreactor from synthesis gas by anaerobic photosynthetic bacterium: *Rhodospirillum rubrum*. *Bioresour. Technol.* doi: 10.1016/j.biortech.2007.04.059 (2007)
86. Yoshida A., Nishimura T., Kawaguchi H., Inui M., Yukawa H.: Enhanced hydrogen production from formic acid by formate hydrogen lyase-overexpressing *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 6762–6768 (2005)
87. Yoshida A., Nishimura T., Kawaguchi H., Inui M., Yukawa H.: Enhanced hydrogen production from glucose using *ldh*- and *frd*-inactivated *Escherichia coli* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**, 67–72 (2006)
88. Zhang Y., Pohlmann E.L., Ludden P.W., Roberts G.P.: Mutagenesis and functional characterization of the *glnB*, *glnA* and *nifA* genes from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* **182**, 983–992 (2000)
89. Zhu H., Beland M.: Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. *Int J Hydrogen Energy*, **31**, 1980–1988 (2006)
90. Zhu J., Wu X., Miller C., Yu F., Chen P., Ruan R.: Biohydrogen production through fermentation using liquid swine manure as substrate. *J. Environ. Sci. Health B.* **42**, 393–401 (2007)

Praca powstała w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 2P04B00429

# WPLYW STĘŻEŃ PODPROGOWYCH (SUB-MICS) ANTYBIOTYKÓW NA OSŁONY POWIERZCHNIOWE BAKTERII GRAM-UJEMNYCH

Dorota Wojnicz

Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej Akademii Medycznej  
ul. Mikulicza-Radeckiego 9, 50-367 Wrocław, tel. 071 784 15 12,  
e-mail: wojnicz@biolog.am.wroc.pl

Wpłynęło w sierpniu 2007 r.

1. Wstęp. 2. Wpływ sub-MICs antybiotyków na syntezę ściany komórkowej. 3. Wpływ sub-MICs antybiotyków na białka błony zewnętrznej. 4. Wpływ sub-MICs antybiotyków na syntezę otoczek. 5. Podsumowanie

## The effect of subinhibitory concentrations (sub-MICs) of antibiotics on the external surface of Gram-negative bacteria

**Abstract:** The subinhibitory concentrations (sub-MICs) of various antibiotics are able to modify the molecular architecture of the external surface of bacteria and some bacterial functions, such as the ability to adhere to the host cell, the production of toxins, the susceptibility to host defense mechanisms and motility. It has been reported in literature that treatment of different bacteria with various antimicrobial agents at low doses results in cell wall, cytoplasmic and outer membrane as well as capsule changes. This review focuses on studies describing the effects of sub-MICs of antibiotics on the surface architecture of Gram-negative bacteria.

1. Introduction. 2. Effect of sub-MICs of antibiotics on the synthesis of cell wall. 3. Effect of sub-MICs of antibiotics on outer membrane proteins. 4. Effect of sub-MICs of antibiotics on the synthesis of capsules. 5. Summary

---

**Słowa kluczowe:** antybiotyki, stężenia podprogowe, osłony bakteryjne

**Key words:** antibiotics, subinhibitory concentrations, external surface of bacteria

---

## 1. Wstęp

Jednym z parametrów charakteryzujących relację między antybiotykiem, a drobnoustrojem jest minimalne stężenie hamujące wzrost (MIC – *minimal inhibitory concentration*). Jest to najmniejsze stężenie leku, które całkowicie hamuje wzrost bakterii. Powszechnie uważa się, że dobry efekt terapeutyczny można osiągnąć wówczas, gdy pomiędzy kolejnymi dawkami leku, przez około połowę czasu, stężenie antybiotyku przewyższa wartość MIC. Często jednak w przebiegu antybiotykoterapii bakterie przez większość czasu poddane są działaniu leku o stężeniu podprogowym, czyli niższym niż MIC (sub-MIC – *sub-minimal inhibitory concentration*).

Znajomość wpływu dawek podprogowych na drobnoustroje jest bardzo przydatna, szczególnie w przypadku leków, których penetracja do pewnych tkanek i narządów jest ograniczona [13]. Przykładem tego może być penicylina benzylowa oraz antybiotyki aminoglikozydowe, których przenikanie do kości jest utrudnione, a ich stężenia są mniejsze niż MIC. Chinolony, makrolidy oraz aminoglikozydy gorzej przenikają do płynu mózgowo-rdzeniowego przez barierę krew-mózg. Również ograniczona jest penetracja leków aminoglikozydowych do płuc, a ich stężenie w wydzielinie drzewa oskrzelowego jest niewielkie [15].

Podprogowe stężenia leków nie zabijają bakterii, są one w stanie indukować zmiany w morfologii i strukturach powierzchniowych komórek, hamować produkcję toksyn oraz adhezję do komórek gospodarza. Znajomość wpływu dawek sub-MICs antybiotyków na drobnoustroje w połączeniu z ich parametrami farmakodynamicznymi, może okazać się bardzo przydatna w racjonalnej antybiotykoterapii. Stężenia podprogowe leków przyczyniają się jednak do wyselekcjonowania szczepów opornych, a powstawanie zmienionych morfologicznie komórek bakteryjnych utrudnia ich identyfikację [5–7, 28].

Osłony powierzchniowe bakterii Gram-ujemnych, do których zaliczany jest peptydoglikan, błona zewnętrzna i cytoplazmatyczna oraz ewentualnie otoczek, stanowią barierę ochronną, biorą one udział w transporcie substancji odżywczych do cytoplazmy, a także w usuwaniu zbędnych metabolitów na zewnątrz komórki. Dzięki tym strukturom bakterie mogą kolonizować zarówno tkanki organizmów wyższych jak i powierzchni abiotyczne. Prawidłowa struktura osłon bakteryjnych odgrywa znaczącą rolę w ochronie drobnoustrojów przed wnikaniem cząsteczek antybiotyków do ich wnętrza [16].

W poniższej pracy opisano wyniki badań, dotyczących wpływu działania sub-MICs leków na osłony komórkowe bakterii Gram-ujemnych (Tabela I).

Tabela I

Efekty działania sub-MICs antybiotyków i chemioterapeutyków na strukturę osłon powierzchniowych bakterii Gram-ujemnych

Antybiotyk/ chemioterapeutyk	Drobnoustroj	Efekt	Piśmien- nictwo	
Cefalosporyny: ceftazydym cefotaksym ceftriakson cefodyzym cefodyzym	<i>E. coli</i>	filamentacja komórek	[1, 9, 25]	
	<i>K. pneumoniae</i>	zmniejszona grubość otoczki	[19]	
Karbapenemy: imipenem meropenem panipenem biapenem	<i>E. coli</i> <i>S. marcescens</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>P. vulgaris</i> <i>P. mirabilis</i>	formy kuliste	[9]	
	imipenem <i>E. aerogenes</i>	zmieniona liczba OMP	[31]	
Chinolony: ciprofloksacyna	<i>E. coli</i>	filamentacja komórek komórki typu „ghost” zmieniona liczba OMP zmniejszona liczba komórek posiadających otoczki	[25, 30] [30] [27] [29]	
		rufloksacyna	<i>E. coli</i> filamentacja komórek komórki typu „ghost”	[2]
		moksyfloksacyna lewofloksacyna ofloksacyna	<i>K. pneumoniae</i> <i>P. aeruginosa</i> filamentacja komórek zmieniona liczba OMP	[4] [18]
Aminoglikozydy: amikacyna	<i>E. coli</i>	filamentacja komórek zmieniona liczba OMP zmniejszona liczba komórek posiadających otoczki	[30] [27] [29]	
	gentamycyna	<i>P. aeruginosa</i> zmniejszona grubość otoczki	[20]	
azytromycyna	<i>E. coli</i>	formy kuliste	[25]	
trimetoprim	<i>E. coli</i>	zmieniona liczba OMP	[24]	
diazepam	<i>K. pneumoniae</i>	zmieniona liczba OMP	[23]	

## 2. Wpływ sub-MICs antybiotyków na syntezę ściany komórkowej

Antybiotyki  $\beta$ -laktamowe są lekami hamującymi syntezę ściany komórkowej bakterii. Miejscem docelowym ich działania jest grupa specyficznych białek PBP (*penicillin binding proteins*), odpowiedzialnych za syntezę peptydoglikanu w obrębie bakteryjnej ściany komórkowej. PBP są enzymami o charakterze transpeptydaz, transglikozydaz i karboksypeptydaz, które uczestniczą w tworzeniu połączeń poprzecznych (sieciovania) między łańcuchami peptydoglikanu. Jednym z najlepiej poznanych białek wiążących penicylinę u *Escherichia coli* jest PBP1B. Jest ono główną transpeptydazą i transglikozylazą uczestniczącą w procesie wbudowywania nowo syntetyzowanych fragmentów peptydoglikanu do „starej” mureiny. Białko PBP1B

bierze udział w polimeryzacji mureiny z prekursorów, złożonych z disacharydopentapeptydu, oraz w tworzeniu mostków peptydowych pomiędzy sąsiednimi łańcuchami peptydowymi. W ostatnim etapie syntezy mureiny bierze udział białko PBP1A, wykazujące również podwójną aktywność enzymatyczną – transpeptydazy i transglikozylazy. Natomiast białko PBP3 uczestniczy w syntezie mureiny podziałowej (przegrodowej). Zaburzenia w funkcjonowaniu PBP3 hamuje wytwarzanie przegród wewnątrzkomórkowych i tym samym powoduje wzrost bakterii w postaci wydłużonych filamentów [3].

Zmiany w morfologii komórek bakteryjnych pod wpływem działania sub-MICs leków  $\beta$ -laktamowych są wynikiem zahamowania lub zaburzeń procesu syntezy składników ściany komórkowej. V r a n e s i wsp. [25] badali wpływ sub-MICs ceftazydymu na morfo-



logię komórek *E. coli*. Stężenie 1/2 MIC leku powodowało tworzenie się filamentów. Takie formy morfologiczne obecne były także w hodowlach *E. coli* poddanych działaniu sub-MICs cefodyzimu, cefotaksymu oraz ceftriaksonu. Najwięcej zmienionych morfologicznie komórek powstawało w obecności 1/8 MIC cefodyzimu oraz 1/16 MIC cefotaksymu i ceftriaksonu [1]. H o r i i i wsp. [9] badali wpływ 1/2 MIC ceftazydymu, imipenemu, panipenemu, meropenemu i biapenemu na komórki *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* oraz *Proteus mirabilis*. Jedynie ceftazydym indukował powstawanie filamentów, natomiast karbapenemy powodowały pojawienie się form kulistych.

Zmiany kształtu komórek bakterii były także obserwowane podczas inkubacji drobnoustrojów w sub-MICs leków z innych grup niż  $\beta$ -laktamy [2, 4, 25, 30]. B r a g a i wsp. [2] zaobserwowali pojawienie się krótkich filamentów o długościach od 5 do 15  $\mu\text{m}$  oraz długich filamentów o długościach powyżej 15  $\mu\text{m}$  w hodowlach *E. coli* w obecności sub-MICs rufloksacyny. Najwięcej zmienionych morfologicznie komórek powstawało pod wpływem 1/2 MIC po 2 godzinach inkubacji. Pozostałe stężenia – 1/4, 1/8, 1/16 i 1/32 MIC powodowały powstanie filamentów w mniejszej ilości. Ci sami autorzy zaobserwowali występowanie komórek typu „ghost”. już w 4-godzinnej hodowli pałeczek okrężnicy w obecności wszystkich sub-MICs rufloksacyny, z wyjątkiem 1/16 MIC. Zjawisko filamentacji komórek *K. pneumoniae* w obecności 1/4 i 1/8 MIC moksyflokscyny zaobserwowali D r a g o i i wsp. [4]. Pałeczki *E. coli* poddane działaniu sub-MICs ciprofloksacyny utworzyły filanty, natomiast inkubacja tych szczepów w obecności sub-MICs azytromycyny spowodowała powstanie komórek o kształtach kulistych [25]. W badaniach własnych także obserwowano znaczące zmiany w morfologii komórek *E. coli* w obecności sub-MICs ciprofloksacyny [30]. Stężenie 1/32 MIC powodowało pojawienie się w hodowli szczepu *E. coli* 998 długich filamentów. Obecne były one także w próbach zawierających 1/16 MIC (*E. coli* 353, 998 i 5643) i 1/8 MIC (*E. coli* 315, 353 i 998). Ekspozycja wszystkich badanych szczepów na 1/4 lub 1/2 MIC ciprofloksacyny powodowała powstawanie długich filamentów. Krótkie filanty obserwowano we wszystkich hodowlach poddanych działaniu sub-MICs tego fluorochinolonu. W niektórych hodowlach bakteryjnych zwrócono uwagę na obecność komórek typu „ghost”, pozbawionych częściowo ściany komórkowej. Pojawiły się one w przypadku dwóch szczepów *E. coli* poddanych działaniu 1/8 lub 1/4 MIC ciprofloksacyny, a także we wszystkich badanych szczepach inkubowanych w obecności 1/2 MIC tego antybiotyku. Natomiast w obecności sub-MICs amikacyny tylko niewielka liczba pałeczek *E. coli* ulegała wydłużeniu.

Działanie stężeń podprogowych fluorochinolonów na komórki bakteryjne związane jest z ich oddziaływaniem na kompleks DNA-gyryza. Gyryza, produkt genów *gyrA* oraz *gyrB*, współdziała z topoizomerazą typu I. Ich aktywność jest niezbędna do utrzymania superspiralnej struktury chromosomu bakteryjnego, co warunkuje właściwą replikację DNA. Inhibicja gyrazy powoduje zahamowanie procesu syntezy DNA. Fluorochinolony w stężeniach podprogowych mogą zaburzać działanie gyrazy, a w konsekwencji replikację chromosomu bakteryjnego, transkrypcję i translację białek enzymatycznych PBP1B i PBP3 biorących udział w syntezie mureiny [21]. E i c k i i wsp. [5] wykazali, że stężenia 1/4 MIC moksyflokscyny i gatiflokscyny, powodowały spontaniczne mutacje w genie *gyrA*, kodującym podjednostkę A gyrazy. Można na tej podstawie przypuszczać, że w komórkach bakteryjnych, do których wniknął lek, następuje indukcja systemu SOS składającego się z różnych genów i ich białkowych produktów, które biorą udział w reparaacji DNA. W czasie naprawy DNA zahamowane zostają podziały komórek bakteryjnych, nie tworzą się septy, a cytoplazma ulega silnej wakuolizacji [8, 11, 17, 22].

Powstawanie filamentów pod wpływem sub-MICs aminoglikozydów wiąże się z ich mechanizmem działania. Po wnikięciu do wnętrza komórki bakteryjnej cząsteczki leków wiążą się z małymi podjednostkami rybosomu (30S), czego konsekwencją może być zahamowanie powstawania kompleksu inicjującego (70S) i całego procesu biosyntezy białka. W sytuacji takiej nie powstają m.in. enzymy uczestniczące w syntezie ściany komórkowej bakterii. Związanie aminoglikozydu z podjednostką 30S może prowadzić także do zaburzeń w etapie elongacji łańcuchów białkowych, z powodu błędnego odczytywania kodonów w mRNA przez cząsteczki tRNA. Powstają wtedy cząsteczki białka ze zmienioną sekwencją aminokwasów, które w przypadku enzymów nie są w stanie spełniać swoich funkcji [14].

Przyczyną powstawania filamentów jest również brak przegród oddzielających siostrzane komórki. W ich budowie bierze udział białko FtsZ. Zaburzenie aktywności gyrazy oraz procesu translacji może powodować niewłaściwą ekspresję genu *fts*. Wówczas białko FtsZ jest syntetyzowane w zbyt małych ilościach lub z powodu zmienionej sekwencji nie może spełniać swojej funkcji [12].

### 3. Wpływ sub-MICs antybiotyków na białka błony zewnętrznej

U bakterii Gram-ujemnych peptydoglikan otoczony jest błoną zewnętrzną. Jej warstwa wewnętrzna zbudowana jest przede wszystkim z cząsteczek fosfolipidów,

natomiast warstwę zewnętrzną tworzą białka (OMP – *outer membrane protein*) oraz cząsteczki lipopolisacharydu. Tylko część OMP charakteryzuje się aktywnościami enzymatycznymi. Niektóre z nich pełnią ważną rolę w stabilizacji struktury błony zewnętrznej oraz w jej wiązaniu z warstwą mureiny (białko OmpA). Inne białka zwane porynami tworzą kanały dyfuzyjne.

V ä i s ä n e n i wsp. [24] badali wpływ sub-MICs trimetoprimu na białka błony zewnętrznej szczepów *E. coli*. Na proteinogramie OMP wyizolowanych z komórek inkubowanych w 1/2, 1/4 i 1/8 MIC autorzy stwierdzili obecność dodatkowego białka o masie cząst. 21,2 kDa, które nie występowało w błonie zewnętrznej szczepów nie poddanych działaniu antybiotyku. Stężenie 1/2 MIC trimetoprimu spowodowało także utratę dwóch białek w błonie zewnętrznej *E. coli*. N a k a j i m a i wsp. [18] stwierdzili obecność dużych ilości dodatkowego białka o masie cząst. 43 kDa w błonie zewnętrznej komórek *Pseudomonas aeruginosa* inkubowanych w obecności 1/2 MIC lewofloksacyny i ofloksacyny. Na proteinogramie białek wyizolowanych ze szczepu *K. pneumoniae*, który został poddany działaniu sub-MIC diazepam, zaobserwowano utratę białek o masie cząsteczkowej 34 i 36 kDa i znaczny wzrost ilości białka o masie cząst. 42 kDa [23]. Zanik białka o masie cząst. 42 kDa stwierdzono w błonie zewnętrznej szczepu *Enterobacter aerogenes* po jego inkubacji w stężeniu podprogowym imipenemu [31].

Sub-MICs tetracykliny, chloramfenikolu, gentamycyny, piperacyliny i rifampicyny nie powodowały natomiast zmian w składzie OMP *P. aeruginosa* [18]. Liczba oraz ilość białek błony zewnętrznej pałeczek *Shigella dysenteriae* type 1 nie uległa zmianie po inkubacji w obecności 1/2 i 1/4 MIC aminoglikozydów [10].

We wstępnych badaniach własnych określono wpływ sub-MICs amikacyny i ciprofloksacyny na obecność OMP [27]. Wykazano występowanie różnic w elektroforegramach białek szczepów *E. coli* nie poddanych działaniu leków i szczepów inkubowanych w obecności stężeń podprogowych amikacyny lub ciprofloksacyny. Przykładowo na elektroforegramie białek wyizolowanych z pałeczek *E. coli* 998 poddanych działaniu 1/2 MIC amikacyny stwierdzono obecność dwóch białek o masach cząsteczkowych 105,44 kDa i 84,15 kDa, które nie występowały w komórkach szczepu *E. coli* 998 inkubowanego w pożywce bez leku, a także stwierdzono brak 3 białek o masach cząst. 114,62 kDa, 14,51 kDa i 6,6 kDa, które były obecne w błonie zewnętrznej *E. coli* 998. Elektroforegram OMP pochodzących z komórek *E. coli* 998 hodowanych w 1/2 MIC ciprofloksacyny wskazywał na obecność czterech dodatkowych białek o masach cząst. 105,99 kDa, 84 kDa, 40,78 kDa i 29,7 kDa, a także brak 3 białek o masach cząst. 114,62 kDa, 14,51 kDa i 6,6 kDa w porównaniu z pałeczkami z hodowli kontrolnej.

Utrata lub pojawienie się nowych białek w warstwie powierzchniowej komórek *E. coli* związane jest z „odpowiedzią” pałeczek na obecność w pożywce antybiotyków. Środowisko powoduje zmianę składu struktur budujących błonę zewnętrzną. Być może, wystąpienie nowych białek w komórkach *E. coli* hodowanych w obecności sub-MICs, związane jest z częściową hydrolizą OMP obecnych w błonie zewnętrznej pałeczek nie poddanych działaniu leków. To mogłoby wyjaśnić brak niektórych białek w komórkach szczepów kontrolnych.

#### 4. Wpływ sub-MICs antybiotyków na syntezę otoczek

Otoczka chroni komórkę bakteryjną przed wysychaniem oraz działaniem związków chemicznych. Stanowi ważny czynnik wirulencji bakterii, ponieważ zabezpiecza je przed mechanizmami obronnymi organizmu wyższego oraz utrudnia transport antybiotyków do wnętrza komórki [26].

Obserwacje prowadzone w mikroskopie elektronowym przez N o m u r a i N a g a y a m a [19] wykazały, że warstwa otoczki *K. pneumoniae* zmniejszała się pod wpływem działania 1/2 MIC cefodyzumu do 32 nm. W próbie kontrolnej grubość otoczek *K. pneumoniae* wynosiła 160 nm. O w l i a i wsp. [20] także zaobserwowali zmniejszenie się grubości otoczek wokół komórek *P. aeruginosa* pod wpływem działania 1/2 i 1/4 MIC gentamycyny.

W badaniach własnych wykazano, że sub-MICs amikacyny i ciprofloksacyny hamowały syntezę otoczek K1 przez szczepy *E. coli* [29]. Stężenie 1/2 MIC ciprofloksacyny spowodowało, że jedynie 22–36% klonów poszczególnych szczepów posiadało otoczki. Stężenie 1/2 MIC amikacyny tylko w niewielkim stopniu powodowało obniżenie odsetka komórek bakteryjnych zdolnych do syntezy antygeny K1. Brak otoczek prawdopodobnie był spowodowane zaburzeniami ekspresji genów tworzących operon *kps* przez cząsteczki leków. Brak, choćby jednego, białka związanego z syntezą NeuNAc lub transportem jego na zewnątrz komórki bakteryjnej, mogło przyczynić się do braku otoczki polisacharydowej.

#### 5. Podsumowanie

Osłony bakteryjne należą do jednych z najważniejszych struktur komórki prokariotycznej. Chronią drobnoustroje przed działaniem czynników fizycznych i chemicznych, a także zabezpieczają je przed nadmierną utratą wody. Za pośrednictwem osłon bakterie kontaktują się ze środowiskiem zewnętrznym, pobie-

rając składniki odżywcze lub usuwając niepotrzebne związki przemian metabolicznych.

Pod wpływem działania antybiotyków w dawkach podprogowych dochodzi do zmian w strukturach powierzchniowych komórek bakteryjnych. Zaburzenia w syntezie ściany komórkowej zwykle prowadzą do powstawania form kulistych lub wydłużonych, pozbawionych sept międzypodziałowych. Zmieniony kształt komórek bakterii może utrudniać ich wstępną diagnostykę. Niskie dawki leków powodują również zaburzenia w transporcie substancji przez błony komórkowe, a niekontrolowany przepływ makrocząsteczek i jonów prowadzi to zmian homeostazy wewnątrzkomórkowej. Inkubacja bakterii w obecności dawek subinhibicyjnych może przyczyniać się także do zmniejszenia się grubości otoczki lub jej całkowitej utraty. Drobnoustroje pozbawione antygeny otoczkowego znacznie łatwiej ulegają fagocytozie i są bardziej wrażliwe na działanie antybiotyków.

## Piśmiennictwo

- Braga P.C., Dal Sasso M., Maci S.: Cefodizime: effects of subinhibitory concentrations on adhesiveness and bacterial morphology of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*: comparison with cefotaxime and ceftriaxone. *J. Antimicrob. Chemother.* **39**, 79–84 (1997)
- Braga P.C., Sala M.T., Dal Sasso M.: Pharmacodynamic effects of subinhibitory concentrations of rifloxacin on bacterial virulence factors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1013–1019 (1999)
- Buijs J., Dofferhoff A.S., Mouton J.W., Wagenvoort J.H., Van der Meer J.W.: Concentration-dependency of beta-lactam-induced filament formation in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**, 344–349 (2008)
- Drago L., De Vecchi E., Nicola L., Gismondo M.R.: Evaluation of antibacterial in vitro activity of moxifloxacin and its effects on pulmonary clearance of *Klebsiella pneumoniae* in an animal experimental model. *Arzneimittelforschung*, **55**, 473–477 (2005)
- Eick S., Schmitt A., Sachse S., Schmidt K.H., Pfister W.: In vitro antibacterial activity of fluoroquinolones against *Porphyromonas gingivalis* strains. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**, 553–556 (2004)
- Gillespie S.H., Basu S., Dickens A.L., O'Sullivan D.M., McHugh T.D.: Effect of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin on *Mycobacterium fortuitum* mutation rates. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 344–348 (2005)
- Henderson-Begg S.K., Livermore D.M., Hall L.M.C.: Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on mutation frequency in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 849–854 (2006)
- Hill T.M., Sharma B., Valjavec-Gratian M., Smith J.: Sfi-independent filamentation in *Escherichia coli* is *lexA* dependent and requires DNA damage for induction. *J. Bacteriol.* **179**, 1931–1939 (1997)
- Horii T., Kobayashi M., Sato K., Ichiyama S., Ohta M.: An in-vitro study of carbapenem-induced morphological changes and endotoxin release in clinical isolates of Gram-negative bacilli. *J. Antimicrob. Chemother.* **41**, 435–442 (1998)
- Hostacka A., Karelova E.: Hydrophobicity and outer membrane proteins of *Shigella dysenteriae* type 1 after treatment with subinhibitory concentrations of aminoglycosides. *Folia Microbiol.* **42**, 565–568 (1997)
- Jaworski A., Serwecińska L., Stączek P.: Organizacja, funkcja i filogeneza bakteryjnego systemu naprawy błędnie sparowanych zasad w DNA. *Post. Mikrobiol.* **42**, 285–300 (2003)
- Kaca W., Amano K.: Interaction and division of bacterial cells. *Post. Mikrobiol.* **40**, 31–41 (2001)
- Kaczmarczyk L., Jakoniuk P.: Efekt terapeutyczny niektórych antybiotyków w doświadczalnych zakażeniach gronkowcowych oraz jego powiązania z aktywnością in vitro antybiotyków w stężeniach subinhibicyjnych wobec szczepów *Staphylococcus aureus*. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **55**, 1–10 (2003)
- Kotra L.P., Haddad J., Mobashery S.: Aminoglycosides: Perspectives on Mechanisms of Action and Resistance and Strategies to Counter Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 3249–3256 (2000)
- Leone M., Sampol-Manos E., Santelli D., Grabowski S., Alliez B., Durand A., Lacarelle B., Claude M.: Brain tissue penetration of ciprofloxacin following a single intravenous dose. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, 607–609 (2002)
- Markiewicz Z.: Struktura i funkcje osłon bakteryjnych. PWN, Warszawa 1993
- Mason D.J., Power E.G.M., Talsania H., Phillips I., Gant V.A.: Antibacterial action of ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 2752–2758 (1995)
- Nakajima A., Hoshikawa M., Nakae T.: Antibiotic stress induces a large amount of outer membrane protein in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **165**, 261–265 (1998)
- Nomura S., Nagayama A.: Mechanism of enhancement of bactericidal activity of phagocytes against *Klebsiella pneumoniae* treated with subminimal inhibitory concentrations of cefodizime. *Chemotherapy*, **41**, 267–275 (1995)
- Owlia P., Behzadiyan-Nejad Q., Souri E., Sadari H.: Microscopic study of the effects of sub-inhibitory concentrations of gentamicin on capsule production of *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Iran. Med.* **4**, 18–20 (2001)
- Sonstein S.A., Burnham J.C.: Effect of low concentrations of quinolone antibiotics on bacterial virulence mechanisms. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **16**, 277–289 (1993)
- Subbalakshmi C., Sitaram N.: Mechanism of antimicrobial action of indolicin. *FEMS Microbiol. Lett.* **160**, 91–96 (1998)
- Tavio M.M., Vila J., Perilli M., Casanas L.T., Macia L., Amicosante G., Jimenez de Anta M.: Enhanced active efflux, repression of porin synthesis and development of Mar phenotype by diazepam in two enterobacteria strains. *J. Med. Microbiol.* **53**, 1119–1122 (2004)
- Väisänen V., Lounatmaa K., Korhonen T.K.: Effect of sublethal concentrations of antimicrobial agents on the hemagglutination, adhesion and ultrastructure of pyelonephritogenic *Escherichia coli* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **22**, 120–127 (1982)
- Vranes J., Zagar Z., Kurbel S.: Influence of subinhibitory concentrations of ceftazidime, ciprofloxacin and azithromycin on the morphology and adherence of P-fimbriated *Escherichia coli*. *J. Chemother.* **8**, 254–260 (1996)
- Wilson J.W., Schurr M.J., LeBlanc C.L., Ramamurthy R., Buchanan K.L., Nickerson C.A.: Mechanisms of bacterial pathogenicity. *Postgrad. Med. J.* **78**, 216–224 (2002)

27. Wojnicz D.: Wstępne badania nad wpływem stężeń podprogowych amikacyny i ciprofloksacyny na występowanie białek powierzchniowych u *Escherichia coli*. W: Forum Mikrobiologów Wrocławskich. Monografia: sesja naukowa, 2005, 107–122
28. Wojnicz D.: Wpływ stężeń podprogowych antybiotyków na zdolności adhezyjne bakterii. *Adv. Clin. Exp. Med.* **16**, 141–148 (2007)
29. Wojnicz D., Cisowska A., Jankowski S.: The effect of sub-inhibitory concentration (sub-MIC) of amikacin and ciprofloxacin on the loss of capsular antigen K1 by *Escherichia coli* strains. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 109 (2004), 14<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Prague, 1–4 May 2004.
30. Wojnicz D., Kłak M., Adamski R., Jankowski S.: Influence of subinhibitory concentrations of amikacin and ciprofloxacin on morphology and adherence ability of uropathogenic strains. *Folia Microbiol.* **52**, 429–436 (2007)
31. Yigit H., Anderson G.J., Biddle J.W., Steward C.D., Rasheed J.K., Valera L.L., McGowan J.E., Tenover F.C.: Carbapenem resistance in a clinical isolate of *Enterobacter aerogenes* is associated with decreased expression of OmpF and OmpC porin analogs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3817–3822 (2002)

Alicja Krutkiewicz\*, Danuta Klimuszko

Katedra Nauk Przedklinicznych, Zakład Bakteriologii i Biologii Molekularnej  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Wpłynęło w maju 2008 r.

1. Wstęp. 2. Oporność *Campylobacter* spp. na fluorochinolony. 3. Oporność *Campylobacter* spp. na makrolidy. 4. Oporność *Campylobacter* spp. na tetracykliny. 5. Oporność *Campylobacter* spp. na aminoglikozydy/aminocyklitole. 6. Oporność *Campylobacter* spp. na antybiotyki β-laktamowe. 7. Oporność *Campylobacter* spp. na sulfonamidy. 8. Podsumowanie

#### Mechanisms of resistance of *Campylobacter* spp. to antimicrobial agents

**Abstract:** *Campylobacter* is recognized as the major cause of acute bacterial gastroenteritis in the world. Two species of the genus *Campylobacter*, *C. jejuni* and *C. coli*, are most frequently isolated from cases of human infection. Patients usually recover without any antimicrobial therapy, but treatment with erythromycin or fluoroquinolones may be needed in some cases of prolonged illness. Increasing antimicrobial resistance of *Campylobacter* strains in both medicine and agriculture has been recognized. Some reports have suggested that the use of fluoroquinolones for veterinary medicine results in the establishment of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* strains. Moreover it has been found that *C. jejuni* is able to acquire resistance determinants from outside of the genus (from Gram-positive organisms) by horizontal transfer and genes can be incorporated into plasmids or the chromosome. High-level resistance to erythromycin is mediated by mutation in the domain V of the 23S rRNA gene. Fluoroquinolone resistance appears to be mainly due to mutations in the *gyrA* gene encoding part of the GyrA subunit of DNA gyrase. In this article, the mechanisms of antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp. are presented.

1. Introduction. 2. Resistance of *Campylobacter* spp. to fluoroquinolones. 3. Resistance of *Campylobacter* spp. to macrolides. 4. Resistance of *Campylobacter* spp. to tetracyclines. 5. Resistance of *Campylobacter* spp. to aminoglycosides. 6. Resistance of *Campylobacter* spp. to β-lactam antibiotics. 7. Resistance of *Campylobacter* spp. to sulphonamides. 8. Summary

**Słowa kluczowe:** antybiotyki, *Campylobacter*, oporność

**Key words:** antibiotics, *Campylobacter*, resistance

## 1. Wprowadzenie

Pałeczki z rodzaju *Campylobacter* należące do klasy ε-Proteobacteria są mikroaerofilnymi, Gram-ujemnymi bakteriami zdolnymi do ruchu dzięki obecności rzęski. Występują one w przewodzie pokarmowym wielu gatunków zwierząt, zwłaszcza ptaków, jako składnik bioty komensalicznej. Dwa gatunki: *Campylobacter jejuni* i *C. coli* przeniesione na ludzi, stają się jednym z najczęściej izolowanych etiologicznych czynników bakteryjnych zakażeń pokarmowych u ludzi. Dane dotyczące częstości występowania wskazują że 95–99% zakażeń dotyczy *C. jejuni*. Kampylobakterioza przebiega najczęściej pod postacią zapalenia żołądkowo-jelitowego lub zapalenia jelit. Opiswane są przypadki, kiedy u zainfekowanych osób dochodzi do infekcji systemowych, przeniesienia zakażenia na inne organy lub posocznicy. Sporadycznie pałeczki *Campylobacter* mogą wywołać powikłania, takie jak reaktywny artretyzm, oraz choroby neurologiczne: zespół Guillain-Barre (GBS), czy zespół Miller-Fisher

(MFS). W przypadkach objawiających się ostrą, krwawą biegunką z towarzyszącą wysoką temperaturą, utrzymującą się ponad tydzień, zwłaszcza u osób z obniżoną odpornością wskazane jest leczenie etiotropowe. Lekiem z wyboru w leczeniu kampylobakteriozy jest erytromycyna, lub azytromycyna. Decyduje o tym łatwość jej użycia, niski poziom toksyczności oraz wysoka skuteczność. U osób dorosłych, w przypadku stwierdzonych stanów zapalnych jelit bez identyfikacji czynnika etiologicznego powodującego chorobę stosowane są również fluorochinolony będące antybiotykami o szerokim spektrum działania [8].

W ostatnim czasie obserwuje się znaczący wzrost liczby przypadków zakażeń pałeczkami z rodzaju *Campylobacter*. Wprowadzenie do powszechnego użycia antybiotyków, zarówno w medycynie jak i weterynarii warunkuje zjawisko narastania oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki szczepów *Campylobacter* izolowanych zarówno od ludzi i zwierząt, jak i żywności. Opisano szczepy odporne na ciprofloksacynę i inne fluorochinolony, makrolidy i linkozamidy,

\* Autor korespondencyjny: Katedra Nauk Przedklinicznych, Zakład Bakteriologii i Biologii Molekularnej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: alicjakrutek@wp.pl

chloramfenikol, aminoglikozydy, tetracyklinę, ampicylinę i inne  $\beta$ -laktamy [24, 26]. Wzrastający poziom bakteryjnej oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki jest uwarunkowany nabywaniem nowych genów na drodze horyzontalnego transferu oraz mutacji.

## 2. Oporność *Campylobacter* spp. na fluorochinolony

Działanie fluorochinolonów ściśle zależy od stężenia leku w tkankach i surowicy. Są one często stosowane w zakażeniach przewodu pokarmowego, również w zakażeniach pałeczkami *Campylobacter*, zwłaszcza szczepami wieloopornymi.

Oporność bakterii na fluorochinolony jest wynikiem punktowych mutacji chromosomowych, a nie nabywania genów od innych gatunków [23]. Dlatego występowanie oporności jest uzależnione od częstości stosowania fluorochinolonów. Oporność ma charakter krzyżowy w obrębie tej grupy antybiotyków, z tego też powodu postuluje się wycofywanie z użycia chinolonów I generacji (kwasu nalidyksowego), by zmniejszyć ryzyko narastania oporności na nowsze generacje. Fluorochinolony powinny być stosowane dopiero w sytuacjach niewrażliwości lub nadwrażliwości na leki I rzutu. W ostatnich latach zaobserwowano gwałtowny wzrost częstości pojawiania się szczepów opornych na fluorochinolony wśród wielu gatunków bakterii, w tym szczepów *Campylobacter jejuni* [17].

Mechanizm oporności na fluorochinolony polega na blokowaniu topoizomerazy II (gyrazy DNA), oraz topoizomerazy IV-enzymów biorących udział w replikacji, transkrypcji i naprawie DNA bakterii. Enzymy te pod wpływem antybiotyku ulegają unieczynnieniu, co prowadzi do zahamowania replikacji a także transkrypcji DNA, a w następstwie do śmierci komórki bakteryjnej [1].

Najpowszechniejszy typ oporności obejmuje mutacje w genach kodujących gyrazę (*gyrA* i *gyrB*) i topoizomerazę IV (*por C* i *por E*). Najczęstszą przyczyną oporności *Campylobacter jejuni* na fluorochinolony jest mutacja punktowa w kodonie 86 (ACA>ATA) w obrębie regionu QRDR (quinolone resistance determining region), będącego obszarem genu strukturalnego podjednostki A gyrazy i kodującego od 67 do 108 aminokwasów. Efektem wystąpienia tej mutacji jest zamiana treoniny na izoleucynę co powoduje powstanie zmienionego białka, pozbawionego zdolności wiązania się z cząsteczką antybiotyku [28]. Zamiana ta jest homologiczna do substytucji seryny 83 przez leucynę, powodującej 40-krotny wzrost MIC ciprofloksacyny dla *E. coli*. Wyniki wielu badań wskazują, że szczepy *C. jejuni* odporne na ciprofloksacynę posiadają mutację w kodonie 86 genu *gyrA*. Wartość MIC

ciprofloksacyny dla opornych szczepów *C. jejuni* wynosiła >32 mg/L [18].

Opisano również inną mutację punktową w genie *gyrA* *C. jejuni* powodującą zamianę aminokwasu w kodonie 86 (treonina → alanina), która powoduje wysoki poziom oporności na kwas nalidyksowy, oraz niższy poziom oporności na ciprofloksacynę niż w przypadku substytucji (treonina → izoleucyna). Podwyższenie poziomu oporności szczepów *C. jejuni* na fluorochinolony bywa także efektem, choć znacznie rzadziej, zmian aminokwasu w kodonie 70 (alanina → treonina), 86 (treonina → lizyna), 90 (asparaginian → asparagina), 104 (prolina → seryna). Zostały również opisane podwójne mutacje punktowe w genie *gyrA* powodujące zastąpienie treoniny 86 izoleucyną i asparaginianu 85 tyrozyną, lub asparaginianu 90 asparaginą, bądź proliny 104 seryną [12]. Zmian w podjednostce GyrB będących wynikiem mutacji powodujących oporność na fluorochinolony u pałeczek *Campylobacter* nie odnotowano [28]. Nie zidentyfikowano również genu homologicznego do genu strukturalnego *parC* topoizomerazy IV w chromosomie *C. jejuni*, odgrywającego rolę w rozdziale kopii chromosomu podczas podziałów komórkowych np. u *E. coli*. Powstanie mutacji w tym genie zwiększa stopień oporności na fluorochinolony u bakterii należących do wielu różnych rodzajów [30].

Opisano również inne mechanizmy oporności na fluorochinolony jak np. obecność pomp MDR (oporność wieloraka, ang. multi-drug resistance), które skutecznie usuwają chinolony z komórki bakteryjnej. U pałeczek *Campylobacter* najlepiej poznanym mechanizmem jest ATP-zależny system białek CmeABC (Campylobacter-multidrug-efflux), składający się z białka peryplazmatycznego (CmeA), białka transportowego zlokalizowanego w błonie wewnętrznej (CmeB), oraz transmembranowego białka błony zewnętrznej (CmeC). Białka te wykazują dużą homologię do białek superrodziny (inaczej pomp) RND (ang. resistance-nodulation-division) występujących wyłącznie u bakterii Gramujemnych. Są one odpowiedzialne za wieloraką oporność *C. jejuni* na: fluorochinolony, erytromycynę, tetracyklinę, chloramfenikol i ampicylinę. Wiele z nich oprócz antybiotyków usuwa z komórki również inne szkodliwe czynniki jak np. jony metali czy bromek etydy. Współwystępowanie ATP-zależnego systemu białek CmeABC wraz mutacjami punktowymi w genie *gyrA* u *C. jejuni* przyczynia się do osiągnięcia wysokiego poziomu oporności na fluorochinolony [21].

## 3. Oporność *Campylobacter* spp. na makrolidy

Mechanizm działania antybiotyków makrolidowych polega na hamowaniu biosyntezy białek na poziomie podjednostki 50S rybosomu, co powoduje blokowanie

wydłużania łańcucha peptydowego. Miejsce wiązania makrolidów do rybosomu bakteryjnego znajduje się w obrębie cząsteczki 23S rRNA. U bakterii z rodzaju *Campylobacter* kodowana chromosomalnie oporność na erytromycynę i inne makrolidy związana jest z modyfikacją genu 23S rRNA, oraz białek L4 i L22 w podjednostce 50S rybosomu [1].

Opisano wysoki poziom oporności na makrolidy ( $MIC \geq 128$  mg/L) w przypadku klinicznych szczepów *Campylobacter jejuni* i *C. coli*. Jest on wynikiem mutacji w pozycji 2074 i 2075 w genie kodującym podjednostkę V 23S rRNA. Najczęstszą mutacją występującą u 78–100% szczepów jest tranzycja A→G w pozycji 2075, zaś mutacja polegająca na zamianie A→C lub A→G w pozycji 2074 oraz podwójna tranzycja A→C i A→G zostały opisane u pojedynczych szczepów *Campylobacter* opornych na erytromycynę [40]. U bakterii, u których występuje więcej niż jedna kopia genu 23S rRNA, poziom oporności na makrolidy zależy od liczby zmutowanych alleli. Szczepy *Campylobacter* zawierają trzy kopie i uważa się, że liczba zmutowanych alleli wpływa na poziom oporności na makrolidy. Niezbędne są co najmniej mutacje w dwóch kopiach do ujawnienia się oporności. Najwięcej klinicznych izolatów *Campylobacter* opornych na makrolidy zawiera trzy kopie zmutowanych alleli [16].

Oprócz opisanej powyżej modyfikacji genu 23S rRNA, zmianie mogą też ulegać rybosomalne białka L4 i L22 w podjednostce 50S rybosomu. Opisano szczepy *C. jejuni* i *C. coli* u których występowały zmiany pojedynczego aminokwasu w białku L4 i od dwóch do kilku substytucji aminokwasów w białku L22. U dwóch izolatów opornych na erytromycynę *C. jejuni* i *C. coli* zidentyfikowano substytucję aminokwasu A→V (alanina→walina) w pozycji 103 w białku L22 [10].

System białek CmeABC warunkuje oporność na wiele antybiotyków m.in. na fluorochinolony, antybiotyki β-laktamowe, oraz makrolidy. Zaobserwowano zależność pomiędzy występowaniem modyfikacji w systemie białek CmeABC a poziomem oporności na makrolidy (M). Wzrost aktywności „pompy” spowodowany nadekspresją genów *cmeABC* nadaje niski poziom oporności szczepów pałeczek *Campylobacter* na erytromycynę ( $MIC$  8–16 mg/L). Współwystępując z modyfikacją genu 23S rRNA, poziom ten wzrasta [22].

Została określona rola mutacji w genach kodujących białka systemu CmeABC w niepowodzeniu leczenia ludzi erytromycyną. Dlatego ustalono nowe wytyczne, według których za szczepy wrażliwe uważa się takie, których  $MIC \leq 8$  mg/L, a za odporne,  $MIC \geq 32$  mg/L, sugerując, że infekcje powodowane przez szczepy *Campylobacter* niosące te mutacje mogą być nadal skutecznie leczone erytromycyną [7].

Erytromycyna lub azytromycyna uznawane są za lek z wyboru w leczeniu kampylobakteriozy u ludzi.

Jak w przypadku innych antybiotyków, zbyt częste, nieuzasadnione lub niewłaściwe stosowanie makrolidów może doprowadzić do zwiększenia częstości występowania szczepów opornych. Szczególnie niebezpieczne jest zjawisko krzyżowej oporności z β-laktamami.

#### 4. Oporność *Campylobacter* spp. na tetracykliny

Tetracykliny jako antybiotyki o szerokim spektrum działania, obejmującym zarówno bakterie Gram-dodatnie, Gram-ujemne, jak również patogeny atypowe (*Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Chlamydia*), należą do jednej z grup antybiotyków najszerzej stosowanych, a oporność bakterii na tetracykliny stanowi poważny problem z medycznego punktu widzenia. Częstość izolacji szczepów opornych na różne tetracykliny wzrasta wraz z rozszerzeniem stosowania tych antybiotyków nie tylko w medycynie w celach leczniczych, ale także w rolnictwie w profilaktyce zakażeń powodowanych przez różne patogeny. Zjawisku temu sprzyja lokalizacja genów determinujących oporność na tetracyklinę na ruchomych elementach genetycznych [6].

Tetracykliny są antybiotykami bakteriostatycznymi, których mechanizm działania polega na hamowaniu biosyntezy białek i procesów fosforylacji w komórkach bakteryjnych. Mechanizmy oporności na tetracykliny mogą być związane z aktywnym usuwaniem antybiotyku z komórki bakterii, obecnością białek chroniących rybosom przed przyłączeniem tetracykliny (RPPs, ang. ribosomal-protection-proteins) [6] oraz z enzymatyczną inaktywacją cząsteczek antybiotyku, którą opisano u *Bacteroides* [34]. Rzadziej oporność jest wynikiem mutacji w genie kodującym 16S rRNA, którą znaleziono u *Propionibacterium acnes* i *H. pylorii* [32, 38]. Głównym mechanizmem oporności na tetracykliny nadającym bakteriom oporność na duże dawki antybiotyku jest czynne wypompowywanie antybiotyku z komórki bakteryjnej. Białko o charakterze pompy należy do grupy MFS (ang. major-facilitator-superfamily) i do swojej aktywności wykorzystuje siłę protonomotoryczną [23].

Mechanizm oporności szczepów *Campylobacter jejuni* i *C. coli* na tę grupę antybiotyków wyraża się poprzez wytwarzanie białka Tet(O), należącego do białek chroniących rybosom. Białko Tet(O) nadaje oporność poprzez usunięcie tetracykliny z jej pierwotnego miejsca wiązania na rybosomie i wymaga do tego obecności GTP. W efekcie uwalnia rybosom od hamującego wpływu antybiotyku na syntezę białek. tRNA z grupą aminoacylową (aa-tRNA) zostaje związany z miejscem A na rybosomie i synteza białek może być kontynuowana [9].

Gen *tet(O)* u *C. jejuni* zlokalizowany jest najczęściej na plazmidzie i wykazuje około 75% homologii

do genu *tet (M)* *Streptococcus pneumoniae*, który to znajduje się na transpozonie Tn916 i wykryto go u wielu bakterii m.in. *Ureaplasma*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *Staphylococcus*, *Clostridium*. Zawartość par G+C w genie *tet (O)* wynosi 40% i jest podobna do *tet(M)*, lecz wyższa niż w całym genomie *C. jejuni*.

Badania dowodzą, że od 13–52% szczepów *C. jejuni* izolowanych od ludzi zawiera różnej wielkości plazmidy, w większości niosące geny oporności na antybiotyki. Plazmidy zawierające gen *tet(O)* mają wielkość od 30–60 kb, nadają wysoki poziom oporności na tetracyklinę (512 mg/L) [15] i stanowią jak podają Ross i wsp. [31] 30, czy nawet 90% izolowanych plazmidów. Zsekwencjonowano dwa duże plazmidy nadające oporność na tetracykliny: pTET (45,2 kb) ze szczepu *C. jejuni* 81–176 (Z1) i pCC31 (44,7 kb) ze szczepu *C. coli* CC31. Wykazują one wysoki poziom homologii sekwencji (94,3%) i organizacji genetycznej mimo, że były izolowane na przestrzeni 20 lat i na różnych kontynentach [5]. Zawierają gen *tet(O)*, geny biorące udział w replikacji i koniugacji, homolog genu metylazy, oraz 30 ORF o nieznannej funkcji. Spośród szczepów opornych na tetracyklinę 53% niosło gen *tet(O)* na plazmidzie koniugacyjnym, co może sprzyjać rozprzestrzenianiu się oporności na tę grupę antybiotyków na drodze horyzontalnego transferu tego genu [42].

Na plazmidzie niosącym gen *tet(O)* została zidentyfikowana sekwencja insercyjna IS607\* podobna do IS607 znalezionej na chromosomie *Helicobacter pylori*. Dlatego też możliwe jest, że inne ruchome elementy genetyczne a nie samoprzekazywalny plazmid mogą być związane ze zdolnością nabywania i rozpowszechniania genu *tet (O)*.

Lokalizacja genu *tet(O)* na chromosomie została opisana u 33% szczepów *C. jejuni* opornych na tetracyklinę wyizolowanych w Kanadzie, oraz 76% w Australii, wśród których zaś u 26% nie wykryto plazmidów [31].

## 5. Oporność *Campylobacter* spp. na aminoglikozydy/aminocyklitole

Oporność na antybiotyki aminoglikozydowe, oraz na niektóre inne chemioterapeutyki hamujące syntezę białka bakteryjnego jest związana z kilkoma mechanizmami. Niektóre bakterie mają osłony komórkowe o obniżonej przepuszczalności dla aminoglikozydów, mogą wypompowywać antybiotyki z tej grupy z wnętrza komórki oraz syntetyzować enzymy modyfikujące aminoglikozydy. Najczęstszą przyczyną oporności na streptomycynę oraz na inne antybiotyki aminoglikozydowe jest inaktywacja enzymatyczna antybiotyku. Występuje zarówno u bakterii Gram-dodatnich

jak i Gram-ujemnych i może być sprzężona zarówno z genami plazmidowymi jak i chromosomowymi. Inaktywacja cząsteczek antybiotyków odbywa się przy udziale enzymów zaklasyfikowanych do trzech rodzin enzymów modyfikujących: *N*-acetylotransferazy aminoglikozydowej (AAC), *O*-adenylotransferazy aminoglikozydowej (ANT) i *O*-fosfotransferazy aminoglikozydowej (APH) [1].

U szczepów *Campylobacter* opisano i zsekwencjonowano geny kodujące fosfotransferazy [2]. Gen *aphA-3*, początkowo opisywany tylko u Gram-dodatnich ziarniaków [39], został zidentyfikowany na 48-kb plazmidzie wyizolowanym ze szczepu *C. coli* [36] i na dużych plazmidach wyizolowanych ze szczepów *C. jejuni* [15]. U *C. jejuni* gen ten zlokalizowany jest na plazmidzie w stronę końca 3' od sekwencji insercyjnej IS607\*, lub jako część zgrupowania genów oporności *aadE-sat4-aphA-3*, który koduje enzymy: 6' adenylotransferazę (*aadE*), streptomycynową acetylotransferazę (*sat4*) i 3'-fosfotransferazę aminoglikozydową typu III (*aphA-3*). Zgrupowanie genów oporności *aadE-sat4-aphA-3* jest częścią transpozonów typu Tn5405, które występują u gronkowców [11]. Organizacja genetyczna zgrupowania genów *aadE-sat4-aphA-3* sugeruje, że został on nabyty przez *C. jejuni* od bakterii Gram-dodatnich [15].

Geny determinujące syntezę enzymów modyfikujących aminoglikozydy najczęściej występują na plazmidach i mogą być związane z transpozonami wielorakiej oporności. Z klinicznego szczepu *C. jejuni*, który charakteryzowała oporność wieloraka wyizolowano plazmid pCG8245. Zawierał on 10 genów kodujących enzymy inaktywujące aminoglikozydy zarówno u bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych. Zgrupowanie genów oporności *aadE-sat4-aphA-3* występowało na tym plazmidzie obok dwóch transpozonów hybrydowych *H. pylori*: ISHp608 i IS606 [19, 25].

Genem odpowiedzialnym za oporność na kanamycynę u *C. jejuni* jest gen *aphA-7* kodujący fosfotransferazę. Został on zlokalizowany na plazmidzie pS1178 o wielkości 14 kbp [37]. Otwarta ramka odczytu genu strukturalnego ma 753 par zasad i koduje białko o masie cząst. 29 kDa. Sekwencja DNA tego genu wykazuje 55% podobieństwo do genu *aphA-3* występującego u *Streptococcus faecalis*. Zawartość par G+C wynosi 32,8% i jest podobna do odsetka w całym genomie *C. jejuni*, co sugeruje, że gen ten może być endemiczny dla całego rodzaju *Campylobacter* [37].

Wyniki badań dowodzą, że geny warunkujące oporność *C. jejuni* na kanamycynę mogą występować na jednym plazmidzie razem z genem nadającym oporność na tetracyklinę. Opisano koniugacyjny transfer determinant oporności na oba te antybiotyki pomiędzy szczepami *C. jejuni* [15].



## 6. Oporność *Campylobacter* spp. na antybiotyki $\beta$ -laktamowe

Głównymi mechanizmami warunkującymi oporność komórek bakteryjnych na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe są: produkcja  $\beta$ -laktamaz, które unieczynniają antybiotyków poprzez hydrolizę pierścienia  $\beta$ -laktamowego, zmniejszenie przepuszczalności osłon bakteryjnych, przede wszystkim błony zewnętrznej dla antybiotyku, oraz zmiany w celu działania antybiotyku  $\beta$ -laktamowego – tzn. w syntezie białka wiążącego penicylinę (PBP, penicillin-binding-protein) o zmniejszonym powinowactwie do antybiotyku [23].

Mechanizmy oporności mogą się na siebie nakładać, natomiast w przypadku takich antybiotyków  $\beta$ -laktamowych jak ampicylina i cefalosporyny o szerokim spektrum działania są zmienne i nie do końca jasno zdefiniowane [35].

Większość szczepów *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli* jest opornych na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe z wyjątkiem karbapenemów, imipenu i meropenemu [1].

Oporność szczepów *C. jejuni* i *C. coli* na penicyliny i cefalosporyny o wąskim spektrum działania jest warunkowana przez mechanizm dotyczący zmian celu działania antybiotyku  $\beta$ -laktamowego. Zmiany w PBP szczepów opornych polegają przede wszystkim na utracie powinowactwa do penicyliny. Zmniejszone powinowactwo nie wywołuje zaburzeń naturalnych funkcji PBP tj. uczestnictwa w biosyntezie mureiny.

Mechanizm oporności na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe polegający na wytwarzaniu przez bakterie różnorodnych  $\beta$ -laktamaz (w tym  $\beta$ -laktamaz klasy D-oxacylinazy) został opisany u szczepów *C. jejuni* i *C. coli*. Badania na 100 szczepach *C. jejuni* wykazały, że  $\beta$ -laktamazy występowały u 88% szczepów [35].

$\beta$ -laktamazy klasy D należą do superrodziny serynowych transferaz penicyloilowych, inaktywujących penicyliny i cefalosporyny. Mogą one hydrolizować również karbapenemy, nie są one jednak metyloenzymami. Wykazują różną aktywność wobec cefalosporyn III generacji. Hamowane są przez kwas klawulanowy, tazobaktam i sulbaktam, wykazują dużą aktywność wobec kloksacyliny i oksacyliny. Oksacylinazy mogą być kodowane chromosomalnie, jakkolwiek niektóre geny mogą znajdować się na ruchomych elementach genetycznych (plazmidy, integrony), umożliwiając ich rozprzestrzenianie. U szczepów *Campylobacter* oporność na ampicylinę związana z produkcją  $\beta$ -laktamaz jest kodowana chromosomalnie. Sklonowano gen *bla*<sub>OXA61</sub> kodujący białko strukturalne  $\beta$ -laktamazy należącej do klasy molekularnej D. Stwierdzono, że szczep *C. jejuni* wrażliwy na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe, do którego wprowadzono sklonowany gen, zmienia fenotyp na oporny na ampicylinę, piperacylinę i karbenicylinę [3].

U bakterii Gram-ujemnych oporność na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe powodowana zmniejszoną przepuszczalnością błony zewnętrznej zwykle nie jest wysoka, lecz mechanizm ten jest skuteczniejszy w połączeniu z aktywnością  $\beta$ -laktamaz znajdujących się w przestrzeni peryplazmatycznej. Zmiany w osłonach ograniczające penetrację antybiotyków  $\beta$ -laktamowych wiążą się przede wszystkim z białkami (porynami) w błonie zewnętrznej.

Na zjawisko oporności na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe nakłada się coraz powszechniej spotykana u bakterii oporność wieloraka. Zaobserwowano, również u szczepów *Campylobacter*, zjawisko indukcji oporności na antybiotyki tej grupy nie tylko jako konsekwencji ich stosowania, lecz także przez inne antybiotyki.

## 7. Oporność *Campylobacter* spp. na sulfonamidy

Oporność *Campylobacter jejuni* na sulfonamidy związana jest z wytwarzaniem zmodyfikowanego (substytucja czterech reszt aminokwasowych) enzymu, syntetazy dihydropterynianowej (DHPS), czego rezultatem jest redukcja powinowactwa do chemioterapeutyku [2]. Gen warunkujący oporność umiejscowiony jest na plazmidzie, natomiast drugi gen, znajdujący się na chromosomie szczepów zarówno wrażliwych jak i opornych, koduje syntezę normalnego enzymu DHPS wrażliwego na sulfonamidy.

Inny mechanizmem oporności na sulfonamidy polega na nadprodukcji kwasu *p*-aminobenzoowego (PABA), który bezpośrednio współzawodniczy o dostęp do centrum aktywnego DHPS [23].

Szczepy wielolekooporne charakteryzuje wysoka oporność na trimetoprim (analog kwasu dihydrofoliowego). Wśród pałeczek *Campylobacter* oporność na trimetoprim jest szeroko rozpowszechniona, do czego przyczynia się na pewno fakt, że należy on do selekcyjnych związków dodawanych do podłoża bakteryjnych przy izolacji szczepów *Campylobacter* z różnych źródeł.

Wykazano, że oporność na ten chemioterapeutyk wśród klinicznych szczepów *C. jejuni* związana jest z obecnością na chromosomie genów *dfr1* i *dfr9*, kodujących reduktazy dihydrofolianowe, niewrażliwe na działanie leku. Około 10% badanych szczepów, które nie miały tych genów wykazywały niższy poziom oporności na trimetoprim niż pozostałe izolaty [13]. Obszar DNA otaczający geny *dfr1* i *dfr9* wykazuje cechy charakterystyczne dla transpozonów i integronów [14], które odgrywają istotną rolę w rozpowszechnianiu się genów lekooporności wśród bakterii Gram-ujemnych [20]. Obecność genów *dfr* na transpozonach i integronach sprzyja rozpowszechnianiu oporności na tę grupę chemioterapeutyków na drodze horyzontalnego transferu [14].

Opisano rolę integronów klasy pierwszej i tzw. kaset genowych warunkujących oporność na antybiotyki na drodze umiejscowionej rekombinacji. Stwierdzono obecność ponad 75 kaset genowych niosących geny oporności na antybiotyki. W wyniku włączenia kilku kaset oporności do jednego plazmidu, powstaje plazmid, który może warunkować fenotyp wielorakiej oporności [27].

## 8. Podsumowanie

Pałeczki *C. jejuni* i *C. coli* są z reguły wrażliwe na antybiotyki, jednakże w ostatnich latach udokumentowana została wzrastająca oporność na powszechnie stosowane terapeutyki, co jest prawdopodobnie istotnym problemem w leczeniu zakażeń *Campylobacter*. Poziom oporności na antybiotyki stosowane w terapii zapalenń żołądkowo-jelitowych wzrasta, zarówno w krajach uprzemysłowionych jak i w krajach rozwijających się. Szczególnie niepokojący jest wzrost odsetka szczepów *Campylobacter* spp. opornych na antybiotyki z grupy makrolidów. Badania prowadzone w Polsce pokazują, że wśród szczepów *C. jejuni* izolowanych od ludzi (najczęściej od dzieci do 2 roku życia) największy odsetek szczepów opornych obserwowano w odniesieniu do ciprofloksacyny do 58%, tetracykliny do 29%, ampicyliny do 21% [33].

Wśród szczepów *Campylobacter* spp. występują szczepy wielolekooporne. W badaniu wrażliwości *C. jejuni* na erytromycynę, ciprofloksacynę, ampicylinę, tetracyklinę oraz gentamycynę 35% szczepów wykazywało oporność na jeden antybiotyk, 23% na dwa antybiotyki bądź chemioterapeutyki oraz 6% na trzy [41]. Ciprofloksacyna nie jest stosowana u dzieci poniżej 16 roku życia, dlatego też wysoki odsetek szczepów opornych prawdopodobnie ma swoje przyczyny w zbyt częstym użyciu fluorochinolonów w medycynie weterynaryjnej, zwłaszcza na fermach drobiu. Stosowanie tej grupy antybiotyków u drobiu, który jest głównym rezerwuarem pałeczek *Campylobacter* spp. może prowadzić do selekcji szczepów opornych, a następnie do ich transmisji na ludzi poprzez skażoną żywność. W wielu krajach oporność *Campylobacter* spp. na fluorochinolony jest niższa, dzięki ograniczeniom stosowania tych antybiotyków jako leku z wyboru w leczeniu kamylobakteriozy, jak to ma miejsce np. w Australii, lecz są też takie kraje jak np. Hiszpania, gdzie odsetek szczepów *C. jejuni* opornych przekroczył 80%.

Zagrożenie jakim jest narastająca lekooporność szczepów pałeczek z rodzaju *Campylobacter* wymaga właściwej diagnostyki, oraz uzasadnionego stosowania antybiotyków w leczeniu ludzi, wykluczając infekcje przebiegające z tendencją do samowyleczenia.

## Piśmiennictwo

1. Aarestrup F.M., Engberg J.: Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. *Vet. Res.* **32**, 311–321 (2001)
2. Alfredson D., A., Korolik V.: Antibiotic resistance and mechanisms in *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **277**, 123–132 (2007)
3. Alfredson D., Korolik V.: Isolation and expression of a novel molecular class D  $\beta$ -lactamase, OXA-61, from *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2515–2518 (2005)
4. Bacon D.J., Alm R.A., Burr D.H., Hu L., Kopecko D.J., Ewing C.P., Trust T.J., Guerry P.: Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81–176. *Infect. Immun.* **68**, 4384–4390 (2002)
5. Batchelor R.A., Pearson B.M., Friis L.M., Guerry P., Wells J.M.: Nucleotide sequences and comparison of two large conjugative plasmids from different *Campylobacter* species. *Microbiology*, **150**, 3507–3517 (2004)
6. Chopra I., Roberts M.: Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 232–260 (2001)
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated of Fastidious Bacteria: Approved Guideline M45A. CLSI, PA, USA 2006
8. Coker A.O., Isokpehi R.D., Thomas B.N., Amisu K.O., Obi C.L.: Human campylobacteriosis in developing countries. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 237–243 (2002)
9. Connell S.R., Tracz D.M., Nierhaus K.H., Taylor D.E.: Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 3675–3681 (2003)
10. Corcoran D., Quinn T., Cotter L., Fanning S.: An investigation of the molecular mechanism contributing to high-level erythromycin resistance in *Campylobacter*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **27**, 40–45 (2006)
11. Derbise A., Aubert S., El Solh N.: Mapping the regions carrying the three contiguous antibiotic resistance genes *aadE*, *sat4*, and *aphA-3* in the genomes of staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 1024–1032 (1997)
12. Ge B., McDermott P., White D., Meng J.: Role of efflux pumps and topoisomerase mutations in fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 3347–3354 (2005)
13. Gibreel A., Skold O.: High-level resistance to trimethoprim in clinical isolates of *Campylobacter jejuni* by acquisition of foreign genes (*dfr1* and *dfr9*) expressing drug-insensitive dihydrofolate reductases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 3059–3064 (1998)
14. Gibreel A., Skold O.: An integron cassette carrying *dfr1* with 90-bp repeat sequences located on the chromosome of trimethoprim-resistant isolates of *Campylobacter jejuni*. *Microb. Drug Resist.* **6**, 91–98 (2000)
15. Gibreel A., Skold O., Taylor D.E.: Characterization of plasmid-mediated *aphA-3* kanamycin resistance in *Campylobacter jejuni*. *Microb. Drug Resist.* **10**, 98–105 (2004)
16. Gibreel A., Taylor D.E.: Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**, 243–255 (2006)
17. Gupta A., Nelson J.M., Barrett T.I.: Antimicrobial resistance among *Campylobacter* strains, United States, 1997–2001. *Emerg. Infect. Disease*, **10**, 1102–1109 (2004)

18. Engberg J., Aarestrup F.M., Taylor D.E., Gerner-Smidt P., Nachamkin I.: Quinolone and macrolides resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerg. Infect. Disease*, **7**, 24–34 (2001)
19. Kersulyte, D., B. Velapatino, G. Dailide, A.K. Mukhopadhyay, Y. Ito, L. Cahuayme, A.J. Parkinson, R.H. Gilman, D.E. Berg.: Transposable element ISHp608 of *Helicobacter pylori*: non-random geographic distribution, functional organization, and insertion specificity. *J. Bacteriol.* **184**, 992–1002 (2002)
20. Lee M.D., Sanchez S., Zimmer M., Umelaalim I., Berang M.E., McDermott P.F.: Class 1 integron-associated tobramycin-gentamicin resistance in *Campylobacter jejuni* isolated from the broiler chicken house environment. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3660–3664 (2002)
21. Lin J., Michel L.O., Zhang Q.: CmeABC functions as a multi-drug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**, 2124–2131 (2002)
22. Lin J., Yan M., Sahin O.: Effect of macrolide usage on emergence of erythromycin-resistant *Campylobacter* isolates in chickens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 1678–1686 (2007).
23. Markiewicz Z., Kwiatkowski Z.A.: Bakterie, antybiotyki, lekooporność. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2001
24. Moore J.E., Barton M.D., Blair I.S.: The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. *Microbes Infect.* **8**, 1955–1966 (2006)
25. Nirdnoy W., Mason C.J., Guerry P.: Mosaic structure of a multiple-drug-resistant, conjugative plasmid from *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2454–2459 (2005)
26. Padungton P., Kaneene J.B.: *Campylobacter* spp. in human, chickens, pigs and their antimicrobial resistance. *J. Vet. Med. Sci.* **65**, 161–170 (2003)
27. Payot S., Bolla J.M., Corcoran D., Fanning S., Megraud F., Zhang Q.: Mechanism of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* sp. *Microbes Infect.* **8**, 1967–1971 (2006)
28. Payot S., Dridi S., Laroche M.: Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter coli* isolated from fattening pigs in France. *Vet. Microbiol.* **101**, 91–99 (2004)
29. Piddock L.J., Ricci V., Pumbwe L., Everett M.J., Griggs D.J.: Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* species from man and animals: detection of mutation in topoisomerase genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**, 19–26 (2003)
30. Pratt A., Korolik V.: Tetracycline resistance of Australian *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**, 452–460 (2005)
31. Ross J.L., Eady E.A., Cove J.H., Cunliffe W.J.: 16S rRNA mutation associated with tetracycline resistance in a gram-positive bacterium. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 1702–1705 (1998)
32. Rozynek E., Dzierżanowska-Fangrat K., Korsak D., Konieczny P., Wardak S., Szych J., Jarosz M., Dzierżanowska D.: Comparison of antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from humans and chicken carcasses in Poland. *J. Food Protect.* **71**, 602–607 (2008)
33. Speer B.S., Salyers A.A.: Novel aerobic tetracycline resistance gene that chemically modifies tetracycline. *J. Bacteriol.* **171**, 148–153 (1989)
34. Tajada P., Gomez-Garcez J.L., Alos J.I., Balas D., Cogollos R.: Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* to 12  $\beta$ -lactam agents and combinations with  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 1924–1925 (1996)
35. Taylor D.E.: Genetics of *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**, 35–64 (1992)
36. Tenover F.C., Gilbert T., O'Hara P.: Nucleotide sequence of a novel kanamycin resistance gene, *aphA-7*, from *Campylobacter jejuni* and comparison to other kanamycin phosphotransferase genes. *Plasmid*, **22**, 52–58 (1989)
37. Trieber C.A., Taylor D.E.: Mutations in the 16S ribosomal RNA genes of *Helicobacter pylori* mediate resistance to tetracycline. *J. Bacteriol.* **184**, 2131–2140 (2002)
38. Trieu-Cuot P., Gerbaud G., Lambert T., Courvalin P.: In vivo transfer of genetic information between gram-positive and gram-negative bacteria. *EMBO J.* **4**, 3583–3587 (1985)
39. Vacher S., Menard A., Bernard E., Megraud F.: Detection of mutations associated with macrolide resistance in thermophilic *Campylobacter* spp. by real-time PCR. *Microb. Drug Resist.* **11**, 40–47 (2005)
40. Wardak S., Szych J., Duda U.: Wrażliwość na antybiotyki i chemioterapeutyki szczepów pałeczek *Campylobacter* sp. izolowanych od ludzi w latach 2005–2006 w regionie Bielsko-Bialskim. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **59**, 43–49 (2007)
41. Wardak S., Szych J., Zasada A.A.: Antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* clinical isolates from Poland. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 1123–1125 (2007)



**Karol Fijałkowski\*, Danuta Czernomysy-Furowicz, Magdalena Ferlas**

Katedra Immunologii i Mikrobiologii, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt,  
Akademia Rolnicza, ul. Dr Judyma 24, 71-466 Szczecin

Wpłynęło w kwietniu 2007 r.

1. Wstęp. 2. Początek infekcji. 3. Czynniki wirulencji *S. aureus*. 4. Toksyny gronkowcowe w walce z układem odpornościowym. 5. Czynniki wirulencji a wrodzona odporność komórkowa. 6. Podsumowanie

#### **Staphylococcus aureus versus the immune system**

**Abstract:** *Staphylococcus aureus* can cause various forms of subclinical and clinical infections in people and animals. These bacteria are able to produce a large array of virulence factors. *Staphylococcal* virulence factors are enzymes, cell-wall compounds and toxins. *S. aureus* uses many mechanisms which allow the bacteria to 'deceive' the host immune system. *Staphylococcus aureus* produces proteins which inhibit complement activation and can express substances inhibiting neutrophil chemotaxis and opsonisation by antibodies and complement proteins. Furthermore, the cell-wall structure and the ability to express polysaccharide capsule and mucus capsule helps the bacteria defeat or survive phagocytosis. *S. aureus* also secretes several superantigen-like toxins, which cause anergy of lymphocytes and immunosuppression.

1. Introduction. 2. The beginning of infection. 3. Virulence factors of *S. aureus*. 4. Staphylococcal toxins versus the immune system. 5. Virulence factors and innate immunity. 6. Summary

---

**Słowa kluczowe:** czynniki wirulencji, *Staphylococcus aureus*, układ odpornościowy

**Key words:** virulence factors, *Staphylococcus aureus*, immune system

---

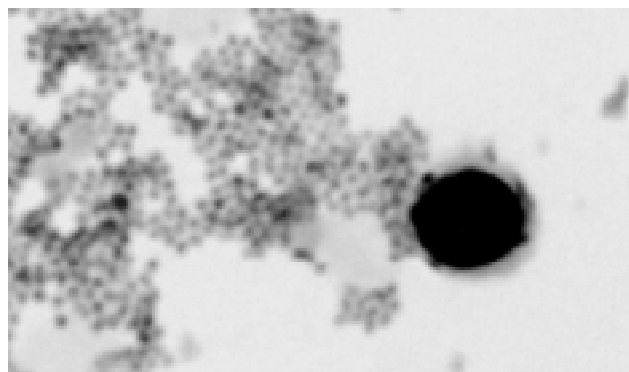
## **1. Wstęp**

Spośród wszystkich gatunków z rodzaju *Staphylococcus*, za najgroźniejszy uznawany jest *Staphylococcus aureus*. Gatunek ten powoduje częste infekcje bakteryjne zarówno ludzi jak i zwierząt. Wywołuje on różnego rodzaju choroby skórne, choroby układu oddechowego, układu moczowego, przewodu pokarmowego, posocznice, zapalenie szpiku i kości, zespół wstrząsu toksycznego, zapalenie gruczołu mlekowego – *mastitis*. *S. aureus* jest drobnoustrojem wykazującym bardzo dużą zjadliwość, a przy tym znaczną oporność na antybiotyki i chemioterapeutyki. Jego wysoka aktywność biochemiczna oraz zdolność do wytwarzania licznych czynników wirulencji sprzyja kolonizacji i zakażeniu.

Do czynników zjadliwości *S. aureus* należą enzymy, składniki ściany komórkowej i toksyny.

## **2. Początek infekcji**

Pierwszą wewnętrzną barierą obronną, na którą napotykać infekujące komórki *S. aureus*, są białka układu dopełniacza, aktywowane na drodze alternatywnej. Częstki C3a i C5a, które są uwalniane podczas aktywacji dopełniacza, powodują przyciąganie fagocytów

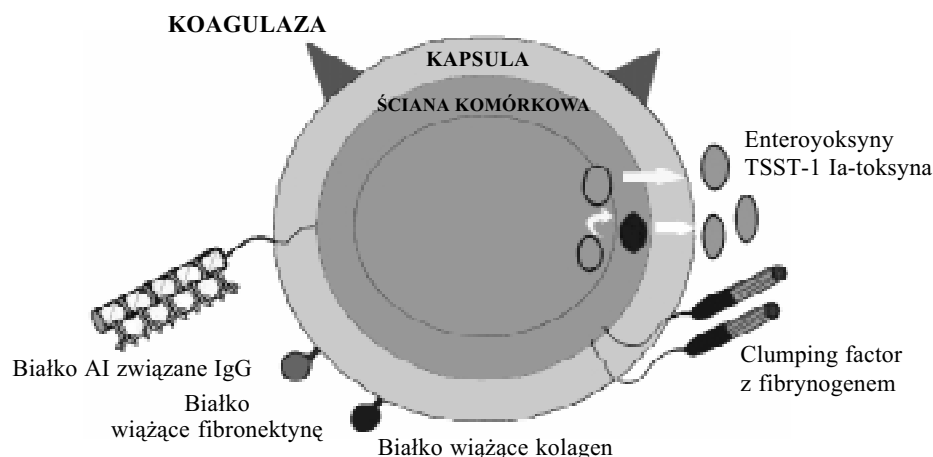


Rys. 1. *Staphylococcus aureus* i limfocyt

do miejsca infekcji. Następnie komórki żerne w procesie fagocytozy pochłaniają i usiłują usunąć atakujące mikroorganizmy. Z kolei komórki prezentujące antygen po wchłonięciu *S. aureus* wędrują do węzłów chłonnych. W węzłach uczulone limfocyty B transformują w komórki plazmatyczne syntetyzujące swoiste przeciwciała. Przeciwciała te neutralizują toksyny i zapoczątkowują bardziej efektywną fagocytozę komórek bakteryjnych [7]. Obecność na neutrofilach i monocytach/makrofagach specyficznych receptorów dla regionu Fc immunoglobulin klasy G, a także składowej C1 dopełniacza, ułatwia efektywniejsze wchłanianie i trawienie komórek bakteryjnych opłaszczonych tymi opsoninami [12, 40]. W przypadku bakterii jaką jest

---

\* Adres korespondencyjny: Katedra Immunologii i Mikrobiologii, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Akademia Rolnicza, ul. Dr Judyma 24, 71-466 Szczecin; tel. (091) 45-41-521 w. 384; e-mail: karol.fijalkowski@wp.pl



Rys. 2. Czynniki wirulencji wytwarzane przez *S. aureus*

*S. aureus*, opsoniny te są niezbędne do przeprowadzenia skutecznej fagocytozy. Nawet w obecności czynników aktywujących takich jak np. TNF, ale przy braku przeciwciał i białek dopełniacza komórki żerne pozostają nieskuteczne wobec *S. aureus* [14].

### 3. Czynniki wirulencji *S. aureus*

*S. aureus* wykształcił szereg specyficznych mechanizmów ułatwiających „oszukanie” układu odpornościowego gospodarza. Przeciwciała i pamięć immunologiczna okazują się niewystarczające, aby zapobiec kolejnym infekcjom powodowanym przez ten mikroorganizm. Do czynników wirulencji produkowanych przez *S. aureus* należą hialuronidazy, lipazy i nukleazy oraz koagulaza i fibrynolizyna, które działają destrukcyjnie na tkanki oraz ułatwiają rozprzestrzenianie się toksyn. Toksyny takie jak:  $\alpha$ -hemolizyna,  $\beta$ -hemolizyna,  $\gamma$ -hemolizyna,  $\lambda$ -hemolizyna, leukocydyna i leukocydyna Paton-Valentine powodują efekt cytolityczny i uszkadzają tkanki [17]. Z kolei, enterotoksyny i toksyna TSST-1 mogą wywołać m.in. szok septyczny [6]. *S. aureus* wytwarza także białka powierzchniowe, sprzyjające adhezji bakterii do uszkodzonej tkanki i powierzchni komórek gospodarza oraz produkuje proteiny wiążące się z białkami i komórkami krwi (białko A, clumping factor CF), co sprzyja blokowaniu odpowiedzi immunologicznej i odgrywa ważną rolę w inicjacji i/lub nasileniu zapalenia [11, 45].

### 4. Toksyny gronkowcowe w walce z układem odpornościowym

Znaczącą rolę w patogenezie *S. aureus* odgrywają odmienne w swoim działaniu, ale należące do tej samej grupy toksyn (egzotoksyny) – leukotoksyny i superantygeny [42].

Leukotoksyny są rodziną toksyn formujących pory, które w bezpośredni sposób mogą zabijać fagocyty. Gamma-hemolizyny (Hl $\gamma$ A, Hl $\gamma$ B i Hl $\gamma$ C), zwane także gamma-toksynami, Panton-Valentine leukocydyny PVL (LukS-PV i LukF-PV) i różne warianty leukocydyn (LukM, LukE, LukD) produkowane przez *S. aureus* są toksynami dwuskładnikowymi. Aktywne toksyny składają się z proteiny pochodzącej z podrodziny składników S (LukS-PV, Hl $\gamma$ A, Hl $\gamma$ C, LukM, LukE) i proteiny pochodzącej z podrodziny składników F (LukF-PV, Hl $\gamma$ B, LukD). Składniki są kolejno wbudowywane w błony wrażliwych komórek, indukując wypływanie Ca<sup>2+</sup>, następnie formując pory i umożliwiając napływ etydyny. Konsekwencją tego procesu jest śmierć komórki – fagocytu [2, 10, 17, 46, 48]. Dodatkowo leukotoksyny o określonej kombinacji składników F i S, mogą powodować silne reakcje zapalne w wyniku masowego uwalniania mediatorów zapalnych [19, 44].

Superantygeny są grupą egzotoksyn, składającą się z wielu strukturalnie i funkcjonalnie spokrewnionych molekuł. Zaliczane są tu TSST-1 (toxic shock syndrome toxin-1) oraz enterotoksyny (SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE, SEG, SEH, SIE, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SEU), a także dwa warianty eksfoliatyny (ETA i ETB). Kilka wariantów enterotoksyn jest wytwarzanych przez *S. aureus* w sposób specyficzny dla gatunku (SEC<sub>bovine</sub>, SEC<sub>ovine</sub>, TSST<sub>ovine</sub>) [27, 25, 29, 30, 33, 44, 47, 51]. Enterotoksyny te są nazywane superantygenami (SAGs) [23, 50], co ściśle związane jest z ich mechanizmem działania. Klasyczny antygen powoduje aktywację tylko nieznacznej liczby limfocytów jednej populacji – mających receptor TCR złożony z łańcuchów  $\alpha$  i  $\beta$  swoistych dla tego antygeny. Superantygen natomiast ma zdolność do pobudzenia znacznej ilości limfocytów należących do wielu różnych klonów. Cząsteczki superantygenów wiążą się do receptorów limfocytów T pomocniczych (T<sub>h</sub>) oraz głównego układu zgodności

tkankowej (MHC II) komórek prezentujących antygen, nie poprzez unikatowe, swoiste miejsce receptora TCR wiążące antygen utworzone przez obydwa łańcuchy, lecz łącząc się tylko z zewnętrzną powierzchnią odcinka V łańcucha  $\beta$ . Dzięki temu superantygeny aktywują wszystkie klony limfocytów T – zarówno  $CD4^+$  i  $CD8^+$ , które mają TCR z łańcuchem  $\beta$ , niezależnie od wchodzącego w skład łańcucha  $\alpha$  [16, 41]. Każdy rodzaj enterotoksyny/superantygeny rozpoznaje specyficzny zestaw zmiennych łańcuchów  $\beta$  receptora TCR np. SEA i SEB –  $V\beta 3$  i  $V\beta 8$  myszy,  $V\beta 5$  – u człowieka [13, 28, 31, 32, 49].

Proces wiązania superantygenów z cząsteczkami MHC klasy II przebiega nietypowo, bez przetworzenia i prezentacji antygeny jako peptydu w rowku MHC, co jest wymagane do swoistej aktywacji limfocyty T [40]. Różne superantygeny łączą się z innym miejscem cząsteczki MHC klasy II, a niektóre z nich np. SEB (gronkowcowa enterotoksyna B) wiążą się również z MHC klasy I. Superantygeny wiążące się z dużą siłą z łańcuchem  $V\beta$  TCR np. SEC (gronkowcowa enterotoksyna C) mogą nawet aktywować limfocyty T bez żadnego udziału cząsteczki MHC, proces ten zależny jest od miejsca wiązania do  $V\beta$  [13]. Ostatnio opisana enterotoksyna H (SEH) powoduje aktywację limfocytów T typową dla superantygenów ale poprzez odmienne wiązanie się z receptorami TCR *via* domena  $V\alpha$  [36].

Superantygeny wiążąc się z zewnętrzną powierzchnią białek MHC klasy II na powierzchni komórek prezentujących antygen i poprzez łączenie się z receptorem TCR na powierzchni limfocytów T, powodują jednoczesne zablokowanie obu typów komórek, ponieważ w tym czasie nie prezentują one, ani nie rozpoznają antygenów [12, 28]. Superantygeny mogą powodować przyłączanie się nawet 20% limfocytów T do komórek prezentujących antygen, a następnie ich aktywację [8]. Nienaturalna aktywacja tak wielu komórek T może być toksyczna, gdyż pociąga za sobą produkcję i uwolnienie nadmiernej ilości cytokin przez komórki układu odpornościowego. Nadmiernie pobudzone przez superantygeny do proliferacji limfocyty T wchodzi w stan anergii lub giną na drodze apoptozy [9, 24, 28].

Nadprodukcja cytokin dotyczy przede wszystkim: czynnika martwicy nowotworów ( $TNF-\alpha$ ), interferonu- $\gamma$  ( $IFN-\gamma$ ), interleukiny-2 ( $IL-2$ ) i interleukiny-12 ( $IL-12$ ) [20, 38]. Bardzo mocno zwiększone wydzielanie tych cytokin może prowadzić do szoku toksycznego, a nawet śmierci organizmu.

Superantygeny mogą ponadto stymulować nadmierną produkcję interleukiny 10 ( $IL-10$ ) i interleukiny 4 ( $IL-4$ ). Duże stężenie  $IL-10$  i  $IL-4$  przyczynia się do rozwoju immunosupresji, poprzez hamowanie aktywności limfocytów  $CD4$  i pobudzanie dużej liczby supresorowych limfocytów  $CD8$ . Powstająca w ten

sposób supresja układu odpornościowego sprzyja dalszemu rozwijaniu się infekcji i nasileniu się objawów chorobowych [1, 4, 20, 38, 39, 37].

Superantygeny wytwarzane przez *S. aureus* „oszukują” prawidłową odpowiedź immunologiczną zapobiegając proliferacji swoistych limfocytów T w odpowiedzi na antygeny prezentowane na cząsteczkach MHC klasy II, wywołując w ten sposób stan anergii. Konsekwencją anergii jest immunosupresja wynikająca z braku indukcji antygenowo specyficznych limfocytów T, które nie mogą ulegać aktywacji i proliferacji w odpowiedzi na prezentowany antygen [22]. Niektóre enterotoksyny (TSST-1) mają ponadto zdolność do hamowania odporności humoralnej, wpływając supresyjnie na produkcję i wydzielanie przeciwciał [26].

## 5. Czynniki wirulencji

### a wrodzona odporność komórkowa

*S. aureus* może także udaremniać wrodzoną odpowiedź komórkową neutrofilów i makrofagów [14]. Odbywa się to poprzez wydzielanie białek, które hamują aktywację dopełniacza, chemotaksję neutrofilów a także neutralizują peptydy antybakteryjne. Około 60% szczepów *S. aureus* wydziela białka hamujące chemotaksję (chemotaxis inhibitory protein of staphylococci CHIPS), które mogą silnie wiązać się zarówno z receptorem peptydów formylowanych (formyl peptide receptor FPR) jak i receptorem  $C5a$  ( $C5aR$ ) [5].

Zdolność *S. aureus* do „unikania” opsonin obecnych w surowicy jest kolejnym ważnym czynnikiem ułatwiającym i wzmagającym infekcję. Przeciwciała obecne w surowicy gospodarza rozpoznają komponenty ściany komórkowej takie jak kwas teichojowy, peptydoglikan i białka powierzchniowe. *S. aureus* wytwarza powierzchniowe anty-opsonityczne białka i otoczkę polisacharydową, które uniemożliwiają internalizację przeciwciał i aktywację dopełniacza na drodze klasycznej i alternatywnej, poprzez zablokowanie receptorów dla białek dopełniacza i odcinka Fc immunoglobulin [12]. Konsekwencją interakcji pomiędzy białkiem A a odcinkiem Fc immunoglobulin klasy G jest pokrycie powierzchni bakterii immunoglobulinami zorientowanymi odcinkami Fab na zewnątrz. Uniemożliwia to obecnym na neutrofilach receptorom dla odcinka Fc rozpoznanie kompleksu antygen-przeciwciało. Clumping factor A (ClfA) jest antyopsonitycznym białkiem, pokrywającym komórki gronkowców fibrynogenem, co również utrudnia ich opsonizację i fagocytozę [34].

Modyfikacje kwasu teichojowego i lipoteichojowego w ścianie komórkowej *S. aureus* (WTA – wall teichoic acid) oraz fosfolipidów powierzchniowych pozwalają przeżyć mechanizmy bójcze sfagocytowanym drobnoustrojom – ściana komórkowa odporna

na lizozym [35]. Biochemiczne podstawy odporności *S. aureus* na lizozym przypisywane są związanej z błoną *O*-acetylotransferazie, która modyfikuje grupę hydroksylową C6 kwasu muraminowego [3].

*S. aureus* potrafi przeżyć fagocytozę, między innymi poprzez: hamowanie fuzji fagosomu z ziarnami lizosomalnymi zawierającymi enzymy i substancje antybakteryjne [14]. Dodatkowo, bakteria unika letalnego efektu wolnych rodników tlenowych, które powstają podczas procesu oddychania wewnątrzkomórkowego. Właściwości takie wykazuje karotenoidowy pigment, który ma zdolność do oczyszczania środowiska z wolnych rodników [21]. Bakterie nie wytwarzające tego pigmentu są bardziej podatne na zabijanie przez neutrofile i mniej zjadliwe podczas infekcji. Ponadto *S. aureus* wytwarza 2 enzymy dysmutazy nadtlencowej, które usuwają  $O_2^-$  [18]. Bakterie nie wytwarzające tych enzymów mają zredukowaną zjadliwość, co wskazuje na rolę jaką odgrywają te enzymy w zwalczaniu stresu oksydacyjnego *in vivo*. Ponieważ kationy dwuwartościowe mają nieenzymatyczną aktywność dysmutazy nadtlencowej, dlatego ważnym czynnikiem obrony wrodzonej przeciw stresowi oksydacyjnemu jest także homeostaza manganowa [15]. Aktywne rodniki tlenowe mogą niszczyć proteiny poprzez oksydację atomu siarki w metioninie do szkodliwej formy sulfotlenku metioniny. *S. aureus* wytwarza 3 reduktazy sulfotlenku metioniny pozwalające na eliminację szkodliwej dla bakterii substancji [43].

## 6. Uwagi końcowe

Wszystkie przedstawione mechanizmy *S. aureus* utrudniają indukcję wrodzonej i nabytej odporności oraz opracowanie skutecznej szczepionki przeciwko temu gronkowcowi. Dlatego profilaktyka i zwalczanie chorób wywoływanych przez szczepy *S. aureus* opierają się głównie na zwiększeniu higieny, a leczenie – na stosowaniu antybiotyków, które niszczą bakterie, osłabiają naturalny komórkowy system obronny.

## Piśmiennictwo

- Alluwaimi A.M., Leutenegger C.M., Farver T.B., Rossitto P.V., Smith W.L., Cullor J.S.: The cytokine markers in *Staphylococcus aureus* mastitis of bovine mammary gland. *J. Vet. Med.* **B50**, 105–111 (2003)
- Barrio M.B., Rainard P., Prevost G.: LukM/LukF'-PV is the most active *Staphylococcus aureus* leukotoxin on bovine neutrophils. *Microbes and Infection*, **8**, 2068–2074 (2006)
- Bera A., Herbert S., Jakob A., Vollmer W., Gotz F.: Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan *O*-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **55**, 778–787 (2005)
- Chang B.S., Bohach G.A., Lee S.U., Davis W.C., Fox L.K., Ferens W.A., Seo K.S., Koo H.C., Kwon N.H., Park Y.H.: Immunosuppression by T regulatory cells in cows infected with staphylococcal superantigen. *J. Vet. Sci.* **6** (3), 247–250 (2005)
- De Haas C.J., Veldkamp K.E., Peschel A., Weerkamp F., Van Wamel W.J., Heezius E.C., Poppelier M.J., Van Kessel K.P., Van Strijp J.A.: Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial anti-inflammatory agent. *J. Exp. Med.* **199**, 687–695 (2004)
- Dinges M.M., Orwin P.M., Schlievert P.M.: Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 16–34 (2000)
- Dryla A., Prustomersky S., Gelbmann D., Hanner M., Bettinger E., Kocsis B., Kustos T., Henics T., Meinke A., Nagy E.: Comparison of antibody repertoires against *Staphylococcus aureus* in healthy individuals and in acutely infected patients. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **12**, 387–398 (2005)
- Faulkner L., Cooper A., Fantino C., Altmann D.M., Sriskandan S.: The mechanism of superantigen – mediated toxic shock: not a simple Th1 cytokine storm. *J. Immunol.* **175**, 6870–6877 (2005)
- Ferens W.A., Davis W.C., Hamilton M.J., Park Y.H., Deobald C.F., Fox L., Bohach G.: Activation of bovine lymphocyte subpopulations by staphylococcal enterotoxin C. *Infect. Immunol.* **66**, 573–580 (1998)
- Ferreras M., Hoper F., Dalla Serra M., Colin D.A., Prevost G., Menestrina G.: The interaction of *Staphylococcus aureus* bi-component gamma-hemolysins and leukocidins with cells and lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1414**, 108–126 (1998)
- Foster T.J., Hook M.: Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* **6**, 484–488 (1998)
- Foster T.J.: Immune evasion by *Staphylococci*. *Nature*, **3**, 948–958 (2005)
- Gołąb J., Jakóbisiak M., Lasek W. (Red.): Immunologia, Wyd. Naukowe PWN 2005
- Gresham H.D., Lowrance J.H., Caver T.E., Wilson B.S., Cheung A.L., Lindberg F.P.: Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J. Immunol.* **164**, 3713–3722 (2000)
- Horsburgh M.J., Wharton S.J., Cox A.G., Ingham E., Peacock S., Foster S.J.: MntR modulates expression of the PerR regulon and superoxide resistance in *Staphylococcus aureus* through control of manganese uptake. *Mol. Microbiol.* **44**, 1269–1286 (2002)
- Hudson K.R., Robinson H., Fraser J.D.: Two adjacent residues in staphylococcal enterotoxins A and E determine T cell receptor V $\beta$  specificity. *J. Exp. Med.* **177**, 175–184 (1993)
- Kaneko J., Kamio Y.: Bacterial two-component and heteroheptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68** (5), 981–1003 (2003)
- Karavolos M.H., Horsburgh M.J., Ingham E., Foster S.J.: Role and regulation of the superoxide dismutases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, **149**, 2749–2758 (2003)
- Konig B., Prevost G., Konig W.: Composition of staphylococcal bi-component toxins determines pathophysiological reactions. *J. Med. Microbiol.* **46**, 479–485 (1997)
- Kushiya K., Nakagawa S., Taneike I., Iwakura N., Imanishi K., Uchiyama T., Tsukada H., Gejyo F., Yamamoto T.: Inhibitory effect of antimicrobial agents and anisodamine on the staphylococcal superantigenic toxin-induced overproduction of proinflammatory cytokines by human peripheral blood mononuclear cells. *J. Infect. Chemother.* **11**, 192–195 (2005)



21. Liu G.Y., Essex A., Buchanan J.T., Datta V., Hoffman H.M., Bastian J.F., Fierer J., Nizet V.: *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J. Exp. Med.* **202**, 209–215 (2005)
22. Lussow A.R., MacDonald H.R.: Differential effects of superantigen-induced “anergy” on priming and effector stages of a T cell-dependent antibody response. *Eur. J. Immunol.* **24**, 445–449 (1994)
23. Marrack P., Kappler J.: The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science*, **248**, 705–711 (1990)
24. Migita K., Ochi A.: The fate of anergic T cell in vivo. *J. Immunol.* **150**, 763–774 (1993)
25. Monday S.R., Bonach G.A.: Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in *staphylococcal* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 3411–3414 (1999)
26. Moseley A.B., Huston D.P.: Mechanism of *Staphylococcus aureus* exotoxin A inhibition of Ig production by human B cells. *J. Immunol.* **146**, 826–832 (1991)
27. Munson S.H., Tremaine M.T., Betley M.J., Welch R.A.: Identification and characterization of Staphylococcal enterotoxins types G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immunol.* **66**, 3337–3348 (1998)
28. Muraille E., De Smedt T., Andris F., Pajak B., Armant M., Urbain J., Moser M., Leo O.: *Staphylococcal* enterotoxin B induces an early and transient state of immunosuppression characterized by  $\nu\beta$ -unrestricted T cell unresponsiveness and defective antigen-presenting cell functions. *J. Immunol.* **158**, 2638–2647 (1997)
29. Murray D.L., Prasad G.S., Earhart C.A., Leonard B.A., Kreiswirth B.N., Novick R.P., Ohlendorf D.H., Schlievert P.M.: Immunobiologic and biochemical properties of mutants of toxic shock syndrome toxin-1. *J. Immunol.* **152**, 87–95 (1994)
30. Nawrotek P., Borkowski J., Boroń-Kaczmarek A., Furwicz A.J.: Charakterystyka enterotoksyn gronkowcowych wytwarzanych przez szczepy izolowane od krów z zapaleniem gruczołu mlekowego (*mastitis*), z uwzględnieniem elementów epidemiologicznych. *Przegl. Epidemiol.* **59**, 891–902 (2005)
31. Newton D.W., Dohlstien M., Olsson C., Segrén S., Lundin K.E., Lando P.A., Kalland T., Kotb M.: Mutations in the MHC class II binding domains of staphylococcal enterotoxin A differentially affect T cell receptor  $\nu\beta$  specificity. *J. Immunol.* **157**, 3988–3994 (1996)
32. Norton S.D., Schlievert P.M., Novick R.P., Jenkins M.K.: Molecular requirements for Tcell activation by the staphylococcal toxic shock syndrome toxin-1. *J. Immunol.* **144**, 2089–2095 (1990)
33. Omoe K., Hu D.L., Takahashi-Omoe H., Nakane A., Shinagawa K.: Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbiol. Lett.* **246**, 191–198 (2005)
34. Palmqvist N., Patti J.M., Tarkowski A., Josefsson E.: Expression of staphylococcal clumping factor A impedes macrophage phagocytosis. *Microbes Infect.* **6**, 188–195 (2004)
35. Peschel A., Jack R.W., Otto M., Collins L.V., Staubitz P., Nicholson G., Kalbacher H., Nieuwenhuizen W.F., Jung G., Tarkowski A., Van Kessel K.P.M., Van Strijp J.A.G.: *Staphylococcus aureus* resistance to human defenses and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with L-lysine. *J. Exp. Med.* **193**, 1067–1076 (2001)
36. Petersson K., Pettersson H., Skartved N. J., Walse B., Forsberg G.: Staphylococcal enterotoxin H induces  $\nu\alpha$  – specific expansion of T cell. *J. Immunol.* **170**, 4148–4154 (2003)
37. Riollet C., Rainard P., Poutrel B.: Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *J. Dairy Sci.* **84**, 1077–1084 (2001)
38. Riollet C., Rainard P., Poutrel B.: Cells and cytokines in inflammatory secretions of bovine mammary gland. *Adv. Exp. Med. Biol.* **480**, 247–258 (2000)
39. Riollet C., Rainard P., Poutrel B.: Kinetics of cells and cytokines during immune – mediated inflammation in the mammary gland of cows systemically immunized with *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *Inflamm. Res.* **49**, 486–496 (2000)
40. Roitt I., Brostoff J., Male D.: Immunologia. Wyd. Medyczne Slotwiński Verlag pod red. J. Żeromskiego, Brema, 1996
41. Salyers A.A., Whitt D.D.: Mikrobiologia. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2005
42. Schuberth H.J., Krueger C., Zerbe H., Bleckmann E., Leibold W.: Characterization of leukocytotoxic and superantigen-like factors produced by *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Vet. Microbiol.* **82**, 187–199 (2001)
43. Singh V.K., Moskovitz J.: Multiple methionine sulfoxide reductase genes in *Staphylococcus aureus*: expression of activity and roles in tolerance of oxidative stress. *Microbiology*, **149**, 2739–2747 (2003)
44. Siqueira J.A., Speeg-Schatz C., Freitas F.I., Sahel J., Monteil H., Prevost G.: Channel-forming leukotoxins from *Staphylococcus aureus* cause severe inflammatory reactions in a rabbit eye model. *J. Med. Microbiol.* **46**, 486–494 (1997)
45. Skaar E.P., Schneewind O.: Iron-regulated surface determinants (Isd) of *Staphylococcus aureus*: stealing iron from heme. *Microbes Infect.* **6**, 390–397 (2004)
46. Staali L., Monteil H., Colin D.A.: The staphylococcal pore-forming leukotoxins open  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the membrane of human polymorphonuclear neutrophils. *J. Membrane Biol.* **162**, 209–216 (1998)
47. Su Y.C., Wong A.C.: Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin H. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1438–1443 (1995)
48. Szmigielski S., Prevost G., Monteil H., Colin D.A., Jeljaszewicz J.: Leukocidal toxins of Staphylococci. *Zentralbl. Bakteriologie* **289**, 185–201 (1999)
49. Taub D.D., Lin Yee-Shin, Rogers T.J.: Characterization and genetic restriction of suppressor-effector cells induced by staphylococcal enterotoxin B. *J. Immunol.* **144**, 456–462 (1990)
50. White J., Herman A., Pullen A.M., Kubo R., Kappler J.W., Marrack P.: The V beta-specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T-cells a clonal deletion in neonatal mice. *Cell*, **56**, 27–35 (1989)
51. Zhang S., Iandolo J.J., Stewart G.C.: The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). *FEMS Microbiol. Lett.* **168**, 227–233 (1998)



---

# NAJNOWSZA HISTORIA POLSKIEJ MIKROBIOLOGII

---

Profesor Piotr B. Heczko przysyłając do Redakcji *Postępów Mikrobiologii* szkic pt. „**Mikrobiologia lekarska na Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie – wczoraj i dziś**” uświadomił mi, że wchodząc w XXI wiek powinniśmy zacząć pisać o historii polskiej mikrobiologii od nowa lub przynajmniej znacznie ją uzupełnić.

Próby opracowania historii mikrobiologii polskiej, obejmujące okres od 1918 roku do końca dwudziestolecia międzywojennego, zostały poczynione ok. 20 lat temu na łamach *Post. Mikrobiol.* przez śp. prof. dr hab. Władysława J.H. Kunickiego-Goldfingera. Profesor opublikował wtedy dwa artykuły pt. „**Migawki z dziejów mikrobiologii polskiej**” (*Post. Mikrobiol.* **26**, 135, 1987) oraz „**Mikrobiologia polska w okresie dwudziestolecia międzywojennego**” (*Historia Nauki Polskiej*, tom V). Bibliografia do ostatniego artykułu wraz z krótkim omówieniem została opublikowana w osobnym suplemencie *Post. Mikrobiol.* tom **31**, w roku 1992). Wreszcie w *Postęпах Mikrobiologii* wydrukowaliśmy wykład Profesora wygłoszony w trakcie Jubileuszowej Sesji Naukowej Uniwersytetu Jagiellońskiego poświęconej 100-leciu pierwszego akademickiego wykładu z mikrobiologii lekarskiej wygłoszonego przez Odo Bujwida. Tytuł wykładu W.J.H. Kunickiego-Goldfingera „**Rola Krakowa w powstaniu mikrobiologii polskiej. Wspomnienie o Odonie Bujwidzie (1857–1942)**” – *Post. Mikrobiol.* **34**, 111–141, 1995.

Ważnym przyczynkiem do historii XX-letniej polskiej mikrobiologii były też dwa opublikowane przez nas artykuły, pierwszy z okazji Jubileuszu Państwowego Zakładu Higieny M.A. Balińskiej pt. „**Państwowy Zakład Higieny a zdrowie publiczne w Polsce 1918–1939**”. (*Post. Mikrobiol.* **37**, 37–46, 1997) oraz przygotowany z okazji Jubileuszu PTM artykuł J.F. Kubicy i S. Kałużewskiego zatytułowany „**70 lat działalności Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów**” (*Post. Mikrobiol.* **37**, 237–243, 1997).

W obecnym zeszycie publikujemy dwie następne prace z tego cyklu tj. artykuł P.B. Heczki i wsp., który przedstawia lata powojenne i współczesne krakowskiej mikrobiologii oraz drugi artykuł (debiut dwu studentek Uniwersytetu Łódzkiego), w którym opisują one historię życia Rudolfa Stefana Weigla. Artykuł o Weiglu szczególnie napawa mnie optymizmem. Jest on bowiem dowodem wielkiej dojrzałości i właściwej postawy najmłodszych polskich mikrobiologów.

*Jerzy Hrebenda*  
*Redaktor PM*



Jadwiga Wójkowska-Mach\*, Jadwiga Witalis,  
Anna B. Macura, Piotr B. Heczko

Katedra Mikrobiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego  
ul. Czysta 18, 31-121 Kraków

Wpłynęło w kwietniu 2008 r.

1. Od zaborów do II wojny światowej. 2. Lata powojenne i współczesność. 3. Podsumowanie

#### Medical microbiology at Jagiellonian University in Kraków – modern and historical perspective

*Abstract:* The Chair of Microbiology at the Jagiellonian University Medical School is one of the oldest divisions in Poland in which research and education in the field of medical microbiology is conducted. This article presents the history of medical microbiology in Cracow and the contribution of several generations of scientists into its development.

1. From the period of the Partitions of Poland to the II World War. 2. Post-war period and the present times. 3. Summary

---

**Słowa kluczowe:** mikrobiologia lekarska, Uniwersytet Jagielloński

**Key words:** medical microbiology, Jagiellonian University

---

### 1. Od zaborów do II wojny światowej

Dzisiejsza Katedra Mikrobiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie jest kontynuatką działalności jednej z najstarszych na ziemiach polskich placówek, prowadzących badania naukowe i pracę dydaktyczną w zakresie mikrobiologii lekarskiej. Podwaliny tej szerokiej dziś dyscypliny naukowej stworzyły niezwykle znaczące odkrycia Josepha Listera, Ludwika Pasteura i Roberta Kocha w dziedzinie higieny i bakteriologii w drugiej połowie XIX wieku. W Krakowie historia mikrobiologii lekarskiej rozpoczyna się w latach 80-tych XIX wieku, kiedy Wydział Lekarski Uniwersytetu Jagiellońskiego podjął zabiegi o utworzenie katedry higieny, co powiodło się dopiero w roku akademickim 1892/93. Rektor UJ prof. dr Stanisław Pora y - M a d e y s k i w trakcie inauguracji roku akademickiego poinformował wtedy o powstaniu na Wydziale Lekarskim UJ Nadzwyczajnej Katedry Higieny z siedzibą przy ulicy Strzeleckiej 7 w Krakowie [30, 31]. Tak jak w Austrii w tamtych czasach, także na ziemiach polskich pod zaborem austriackim, w ramach działalności katedry higieny odbywało się również nauczanie bakteriologii. Kierownictwo Katedry Higieny powierzono Odo B u j w i d o w i, który już jako młody lekarz swoją działalnością w Warszawie zyskał znaczne uznanie środowiska naukowego. Dzięki szerokiej wiedzy, zdobytej m.in. w trakcie stypendiów naukowych w laboratoriach P a s t e u r a

i K o c h a, stał się on pionierem i popularyzatorem bakteriologii i higieny, mając w swoim dorobku oprócz osiągnięć m.in. w zakresie badań naukowych nad gruźlicą, cholera i promieniowcami, także opracowanie metody kontroli sanitarnej wody wodociągowej oraz założenie pierwszej na ziemiach polskich stacji szczepień przeciwko wścieklźnie i pierwszego zakładu badania żywności [1, 15, 19–21, 30].

Odo B u j w i d po objęciu swoich obowiązków wprowadził do programu Wydziału Lekarskiego UJ w roku akademickim 1893/94 wykłady z higieny oraz ćwiczenia z higieny i bakteriologii [31]. W roku akademickim 1894/95 wykłady miały już tytuł „Higiena i bakteriologia”. Fakt wygłoszenia przez B u j w i d a pierwszych wykładów z bakteriologii uczczono 100 lat później uroczystą Jubileuszową Sesją Naukową Uniwersytetu Jagiellońskiego dla upamiętnienia początków mikrobiologii lekarskiej na UJ [17], choć w tym miejscu należy wspomnieć, że jeszcze przed powstaniem Katedry Higieny, tj. w roku akademickim 1891/92 studenci Wydziału Lekarskiego mieli możliwość wysłuchania prelekcji doc. dr P o n i k ł y pt. „O etyologii chorób zakaźnych i zapobieganiu im. Oddzielne demonstracje bakteriologiczne” [31].

Oddzielenie wykładów z zakresu bakteriologii od higieny nastąpiło w roku akademickim 1895/96. W 1899 roku Katedra Higieny podniesiona została do rangi katedry zwyczajnej, a B u j w i d mianowany profesorem zwyczajnym [30, 31]. Oprócz Odo B u j w i d a

---

\* Autor korespondencyjny: Katedra Mikrobiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego; 31-121 Kraków, ul. Czysta 18; tel. 012 633 00 60, fax. 012 423 39 24; e-mail: mbmach@cyf-kr.edu.pl

wykłady zaczął prowadzić jego wychowanek i współpracownik Roman Nitsch, bakteriolog i epidemiolog, znany m.in. jako późniejszy rektor Akademii Stomatologicznej w Warszawie [1, 26] oraz współzałożyciel Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów i Epidemiologów, przekształconego w istniejące do dziś Polskie Towarzystwo Mikrobiologów [27].

Poza wykładami dla studentów medycyny, profesor Bujwid organizował również kursy praktyczne dla lekarzy, np.: „Wykłady i ćwiczenia praktyczne dla lekarzy ze szczególnym uwzględnieniem postępów higieny i bakteriologii”, „Kurs czterotygodniowy szczepień ochronnych i leczniczych”, „Metody badania zarazków chorobotwórczych” i inne [31].

Obok intensywnej pracy naukowej i dydaktycznej, O. Bujwid prowadził w Krakowie działalność gospodarczą (wytwórnia szczepionek, zakład badania żywności), udzielał się jako radny (budowa wodociągu), a także zajmował się postępową działalnością społeczną (pierwsze w Krakowie gimnazjum żeńskie, walka o dopuszczenie kobiet do studiów uniwersyteckich, finansowanie Uniwersytetu Ludowego, popieranie reform w gospodarce rolnej, walka z uprzedzeniami klasowymi i antysemityzmem) [1, 8]. Nie zjednało mu to przychylności w konserwatywnym krakowskim środowisku akademickim. Stopniowo ograniczano jego wpływy, aż do zawieszenia w prawach wykładowcy i kierownika Katedry Higieny UJ w roku 1916 (rehabilitacja Bujwida, oskarżanego o nadużycia finansowe, nastąpiła dopiero w latach 1920–1921) [8]. Tak więc uczony, którego nazywa się ojcem polskiej mikrobiologii, którego wychowanekami byli naukowcy tej miary co Filip Eisenberg [1, 34] i Rudolf Weigl [2], mimo ogromnych zasług dla UJ, zakończył swoją współpracę z Wydziałem Lekarskim. Przejściowo zastąpił go w kierowaniu katedrą Roman Nitsch, który – zanim przeprowadził się do Warszawy – uczestniczył jeszcze w roku 1919 w przeniesieniu „części bakteriologicznej” Katedry Higieny do budynku przy ulicy Czystej 18 w Krakowie [31]. Ostateczny rozdział bakteriologii i higieny nastąpił w roku akademickim 1923/24 [31]. Marian Gieszczykiewicz, mianowany profesorem, objął wtedy wakuujące stanowisko kierownika Nadzwyczajnej Katedry Bakteriologii, którą administracyjnie związane z Instytutem Weterynarii i Medycyny Doświadczalnej – gospodarzem budynku przy ulicy Czystej 18. Budynek ten, mieszczący do dziś Katedrę Mikrobiologii CM UJ, wybudowano w latach 1912–1914 dzięki staraniom profesora Juliana Ignacego Nowaka, którego ambicją było doprowadzenie kierowanego przez siebie Instytutu Weterynarii do formy zbliżonej do Instytutu Pasteura w Paryżu [23, 31].

Weterynaria była drugim kierunkiem Wydziału Lekarskiego UJ, na którym rozpoczęto działalność dy-

daktyczną z zakresu chorób zakaźnych, ale nieco później od Katedry Higieny: docent Stanisław Droba wykładał od 1904 roku „O mikrobach chorobotwórczych w ogólności, ze szczególnym uwzględnieniem biologii pasorzyta (*pisownia oryginalna*) gruźliczego i pokrewnej mu grupy”, a od 1905 profesor Julian Nowak rozpoczął wykłady z „Mikrobiologii ogólnej i szczegółowej, ze szczególnym uwzględnieniem techniki badań bakteriologicznych” [31].

Obie jednostki, ulokowane przy ulicy Czystej 18, współpracowały w zakresie nauczania. Profesorowie Nowak i Gieszczykiewicz podzielili się wykładami z bakteriologii oraz obowiązkami egzaminatorów, ćwiczenia prowadził asystent z bakteriologii Antoni Donhaiser i asystenci z weterynarii. Stan taki utrzymywał się aż do roku 1935, w którym profesor Nowak odszedł na emeryturę, a Instytut Weterynarii UJ został zlikwidowany [31], wskutek czego Katedra Bakteriologii (a dokładnie: Katedra i Zakład Bakteriologii) w pełni usamodzielniała się administracyjnie.

Rok później wnioskowano o zmianę nazwy na Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, co lepiej odpowiadało charakterowi jednostki, ale z powodu opieszałości działań administracji prawnie dokonano się to dopiero po II wojnie światowej (już po wyłączeniu Wydziału Lekarskiego ze struktur Uniwersytetu Jagiellońskiego) [31].

Począwszy od 1936 roku w budynku przy ul. Czystej 18 swoją lokalizację miały trzy niezależne od siebie zakłady: Zakład Bakteriologii, Zakład Patologii (obecna Katedra Patofizjologii) oraz Zakład Mikrobiologii Rolniczej, w którym – trzeba tu wspomnieć – dyplom zrobił wybitny uczony i autor znanego podręcznika „Życie bakterii” profesor Władysław J.H. Kunicki-Goldfinger [21].

Kierownik ówczesnego Zakładu Bakteriologii, profesor Gieszczykiewicz rozpoczął okres intensywnego rozwoju zakładu w kilku kierunkach: chorób zakaźnych, wakcynologii i serologii (głównie immunochemii). On sam był też wybitnym znawcą systematyki bakterii. W uznaniu zasług Gieszczykiewicza, w oparciu o jego prace, wprowadzono do systematyki bakterii rząd *Rickettsiales* Gieszczykiewicz oraz rodzinę *Bartonellaceae* Gieszczykiewicz [35]. W czasie okupacji profesor Gieszczykiewicz prowadził tajne nauczanie studentów oraz współpracował z ruchem oporu, wytwarzając szczepionki dla AK i getta żydowskiego. Za tę działalność został aresztowany w listopadzie 1941 roku. Po kilku miesiącach więzienia przy Montelupich w Krakowie trafił do obozu koncentracyjnego w Oświęcimiu, gdzie został zastrzelony w lipcu 1942 roku [1, 24, 29, 35]. Jego imieniem nazwano salę wykładową obecnej Katedry Mikrobiologii CM UJ.

W budynku przy ul. Czystej 18 w Krakowie już w pierwszych dniach wojny utworzono niemiecki instytut badań wirusów i duru plamistego *Institut für Virus und Fleckfiebforschung Oberkommando der Wehrmacht*, kierowany najpierw przez N. Styera, mikrobiologa z Instytutu Pfeiffera we Wrocławiu, a potem od stycznia 1940 roku przez Hermana Eyera z Wojskowej Akademii Medycznej w Berlinie [24]. Instytut ten zajmował się przede wszystkim produkcją szczepionki przeciwko tyfusowi na potrzeby armii niemieckiej, a w konspiracji – także dla polskiego ruchu oporu, bowiem pod zarządem niemieckim pracowała tu część personelu przedwojennego, m.in. Zdzisław Przybyłkiewicz. Po wyzwoleniu on to właśnie odnalazł i przeprowadził rewindykację wyposażenia, wywiezionego przez Niemców [31].

## 2. Okres powojenny i współczesność

W październiku 1946 roku kierownikiem Zakładu Bakteriologii został przybyły z Wilna profesor Stanisław Legeżyński [18, 25, 36]. W latach powojennych główna działalność Zakładu skupiała się na podstawowych problemach życia w kraju zrujnowanym wojną: zwalczaniem wszawicy, biegunkami, jaglicą, mikrobiologicznym bezpieczeństwem leków, szczepionkami. Zakład Bakteriologii prowadził też działalność dydaktyczną na wydziałach: lekarskim, farmaceutycznym i matematyczno-przyrodniczym Uniwersytetu Jagiellońskiego. W roku 1950, kiedy tworzono w całej Polsce samodzielne akademie medyczne – najczęściej na bazie dotychczasowych Wydziałów Lekarskich – również zakres zainteresowań Zakładu został ograniczony do mikrobiologii lekarskiej. W roku 1952 profesor Legeżyński przeniósł się do Akademii Medycznej w Białymstoku, a kierownikiem Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej został Zdzisław Przybyłkiewicz [31].

Lata 50-te przyniosły gwałtowny rozwój nowoczesnej mikrobiologii, co znalazło odbicie w zainteresowaniach naukowych pracowników Zakładu [14].

W 1958 roku ukazał się pierwszy artykuł autorstwa Zofii Porwit-Bóbr, dotyczący metody hodowli *in vitro* komórek ludzkiego szczepu nowotworowego HeLa [3]. Temat był kontynuowany w dalszych latach również przez Jerzego Georgiadesa oraz Izabellę Zgórnjak-Nowosielską. Zespół ten rozpoczął i koordynował wieloletnie, szerokie badania nad związkiem zakażeń wirusowych a onkogenezą [28]. I. Zgórnjak-Nowosielska w latach 60-tych wprowadziła nowe kierunki badań; nad problemem zakażeń przez mykoplazmy hodowli komórkowych i zawiesin wirusów, stosowanych dla celów naukowych i w produkcji szczepionek oraz nad mykoplazmowy-

mi zakażeniami układu moczowo-płciowego i oddechowego [39]. Okres ten to także bardzo intensywny wkład krakowskiej wirusologii w badania nad wirusowymi zapaleniami wątroby [16].

Również z początkiem lat 50-tych rozpoczęto badania nad antybiotykoopornością drobnoustrojów – szczególnie gronkowców i innych ziarenkowców Gram-dodatnich oraz rozpoczęto systematyczne studia nad zakażeniami szpitalnymi. W 1958 roku ukazały się pierwsze prace związane z opieką pooperacyjną na oddziale chirurgicznym oraz antybiotykoterapią ran operacyjnych [37]. W 1959 roku opisano niezwykle nowatorski, jak na tamte czasy, problem oceny wartości antybiogramu w pracy oddziału chirurgicznego [13]. Pojawił się również zapoczątkowany przez zespół Doleżalowa – Zgórnjak-Nowosielska temat teorii powstawania oporności i metod jej oznaczania („klasyczne i bezpośrednie”). Dodatkowo podjęto problem oporności gronkowców, ich nosicielstwa u personelu szpitalnego i zjawisko oporności krzyżowej. Zagadnienie to było w późniejszych latach kontynuowane przez Piotra B. Heczko i Małgorzatę Bulandę [9, 10]. W połowie lat 60-tych intensywne badania nad zakażeniami szpitalnymi oraz patomechanizmami zakażeń gronkowcowych rozpoczął Jan Bóbr, który w 1966 roku we współpracy z Januszem Jeljaszewiczem przeprowadził pierwsze w Polsce i jedne z nielicznych wówczas na świecie, wielośrodkowe badania nad występowaniem zakażeń w szpitalach [6, 7].

W 1956 roku Jan Starzyk rozpoczął długoletnie studia nad toksoplazmozą [12], kontynuowane przez Krystynę Zemburową do lat 80-tych.

W połowie lat 60-tych wśród dominujących zagadnień pojawiła się immunologia – temat podjęty początkowo przez Zdzisława Przybyłkiewicza, następnie przez Zofię Porwit-Bóbr i Włodzimierza Ptaka [32], a także zainteresowanie Zofii Laskownickiej grzybami drożdżopodobnymi [22].

W roku 1970 na bazie Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej powstał Instytut Mikrobiologii (od 2002 – Katedra Mikrobiologii), a w nim Zakłady: Bakteriologii, Wirusologii, Mykologii, Parazytologii oraz Immunologii (ten ostatni zakład w 1990 roku został przekształcony w samodzielną Katedrę Immunologii).

W Zakładzie Bakteriologii, którego kierownikiem w latach 1970–78 był Zdzisław Przybyłkiewicz, a po nim Piotr B. Heczko, zasadniczym kierunkiem badań były mechanizmy ekologiczne zachodzące na skórze ludzkiej ze szczególnym uwzględnieniem przedsiionka nosa jako niszy ekologicznej. Badano różnice w jakościowym i ilościowym obrazie flory drobnoustrojowej skóry zależnie od wieku, schorzeń współistniejących oraz różnic geograficznych. Udowodniono związek pomiędzy nosicielstwem nosowym

*Staphylococcus aureus*, a zapadalnością na zakażenie rany operacyjnej o takiej etiologii oraz możliwość profilaktyki poprzez zastosowanie procedury eradykacji przed zabiegiem operacyjnym. Badania te były niezwykle ważnym wkładem polskich badaczy w przygotowanie obecnie powszechnie obowiązujących rekomendacji dotyczących zakażeń miejsca operowanego po zabiegach operacyjnych przeprowadzonych w polu mikrobiologicznie czystym [10, 11]. W Zakładzie zastosowano technikę typowania bakteriofagowego gronkowców, stosowano również nowoczesne techniki diagnostyki mikrobiologicznej oparte na metodach molekularnych [33]. Począwszy od lat 90-tych i obecnie szczególnie intensywnie prowadzi się badania nad ekologią drobnoustrojów oraz zastosowaniem probiotyków i prebiotyków w profilaktyce i leczeniu schorzeń, takich jak waginoza bakteryjna czy biegunka rotawirusowa, jak również tych o złożonej etiologii, jaką jest na przykład choroba Leśniowskiego-Crohna. Drugim znaczącym kierunkiem badań jest epidemiologia i mikrobiologia zakażeń szpitalnych oraz antybiotykooporność i terapia przeciwdrobnoustrojowa.

Zakład Wirusologii kierowany był do roku 1996 przez Izabellę Zgórnjak-Nowosielską, potem do roku 2001 przez Janusza Borysiewicza, a następnie do 2007 przez Barbarę Zawilińską. W Zakładzie kontynuowano rozpoczęte wcześniej prace nad zakażeniami mykoplazmowymi, zróżnicowaniem systematycznym tych drobnoustrojów i doskonaleniem metod diagnostycznych [38, 39]. Prowadzono też szczegółowe badania *in vitro* i *in vivo* nad aktywnością przeciwwirusową związków chemicznych, w tym również pochodzenia roślinnego. Zastosowano przy tym, we współpracy z Akademią Górniczo-Hutniczą w Krakowie (Pracownia Biocybernetyki kierowana przez Ryszarda Ta de u s i e w i c z a), zaawansowane technologie cyfrowe oraz „maszynę cyfrową”. Zainteresowania techniczne Janusza Borysiewicza obejmowały nie tylko nowoczesne „maszyny”, ale również urządzenia do bieżącej analizy mikrobiologicznej: w roku 1976 opracował on przyrząd do mierzenia strefy zahamowania wzrostu drobnoustroju – tzw. cyrkiel mikrobiologiczny [4, 5]. Od lat 80-tych ważnym elementem zainteresowań badawczych były okołoporodowe zakażenia ciężarnych, położnic i noworodków nie tylko o etiologii wirusowej, ale i bakteryjnej: mykoplazmowej, ureaplazmowej oraz chlamydowej. Pozostałe znaczące tematy to zakażenia powodowane przez wirus cytomegalii oraz onkogenność i diagnostyka wirusa brodawczaka ludzkiego.

Kierownictwo Zakładu Mykologii w 1970 roku powierzono Marcie Doleżał, która od wielu lat zajmowała się głównie odczynami serologicznymi w diagnostyce schorzeń grzybiczych. Kierownikiem była do 1975 roku, po niej tę funkcję na trzy lata objął Piotr B. Heczko.

W latach 70-tych i 80-tych cenny wkład do dorobku naukowego Zakładu wniosła Zofia Laskownicka, która w latach 60-tych zdobywała wiedzę mykologiczną w Instytucie Pasteura w Paryżu. Jej zainteresowania były skoncentrowane głównie na problematyce kryptokokozy i grzybic powierzchniowych wywołanych przez dermatofity. Od 1978 roku Zakładem kierował Bolesław Pawlik, a od roku 2001 Anna B. Macura. Problematyka naukowa Zakładu Mykologii to zagadnienia epidemiologii i diagnostyki grzybic powierzchniowych i narządowych oraz działanie leków przeciwgrzybiczych. Ten ostatni temat wiąże się z badaniami nad powstawaniem szczepów opornych na powszechnie stosowane leki przeciwgrzybicze. Bardzo istotnym zagadnieniem współczesnej medycyny jest powstawanie grzybic jatrogennych – w tym zakresie w Zakładzie prowadzi się badania nad mechanizmami patogenności u grzybów, a w szczególności nad determinantami patogenności. Poza tym, w Zakładzie są prowadzone szeroko zakrojone badania epidemiologiczne nad występowaniem grzybów w środowisku różnych placówek opieki zdrowotnej i produkcją mykotoksyn przez te grzyby.

Pierwszym kierownikiem i organizatorem Zakładu Parazytologii był Jan Starzyk, następnie w latach 1974–1992 Zakładem kierowała Krystyna Zemburwa, a po niej do roku 2006 Mieczysław Dymon. Wiodącymi kierunkami badań Zakładu Parazytologii były problemy związane z toksoplazmozą, rzęsistkowicą i pneumocytozą (temat ten pojawił się zanim szczegółowo poznano gatunek *Pneumocystis carinii*, obecna nazwa: *Pneumocystis jiroveci*, zaliczony do grzybów), a w ostatnich latach także z toksokarozą.

W roku 2007 miała miejsce częściowa reorganizacja Katedry Mikrobiologii. Powstał Zakład Bakteriologii, Ekologii Drobnoustrojów i Parazytologii pod kierownictwem profesora Piotra B. Heczko oraz nowy Zakład Epidemiologii Zakażeń, kierowany przez dr hab. Małgorzatę Bulandę. Kierownikiem Zakładu Wirusologii została dr hab. Magdalena Kosz-Vnenczak, związana do tej pory z Wydziałem Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Obecnie w Katedrze pracuje 49 osób, w tym 1 profesor zwyczajny, 1 profesor nadzwyczajny, 2 adiunktów habilitowanych oraz 11 osób ze stopniem doktora.

Katedra prowadzi zajęcia dydaktyczne dla studentów Wydziału Lekarskiego CM UJ, Wydziału Stomatologii, Wydziału Farmaceutycznego (analityka) i Wydziału Nauk o Zdrowiu (pielęgniarstwo, położnictwo, inspekcja sanitarna, ratownictwo medyczne). Ponadto kształci studentów obcokrajowców oraz realizuje zadania z zakresu kształcenia podyplomowego lekarzy mikrobiologów, lekarzy chorób zakaźnych, diagnostów mikrobiologów medycznych i inny grup zawodowych.



### 3. Podsumowanie

Obecnie w Polsce działa wiele ośrodków, które mogą poszczycić się znaczącymi naukowymi i dydaktycznymi osiągnięciami w zakresie mikrobiologii lekarskiej. Zamiarem autorów było przypomnienie korzeni tej dziedziny, sięgających czasów zaborów oraz roli uczelni krakowskiej, która organizacyjnie i naukowo dała początek polskiej mikrobiologii, co w dużej mierze było zasługą profesora Odon Bujwida – jego energii, wszechstronności i głębokiej wiedzy. Uczniowie Bujwida stanowili potem trzon kadry naukowej w latach międzywojennych w Odrodzonej Polsce, rozwijając następne znakomite ośrodki we Lwowie, Warszawie, Poznaniu i innych miastach [21].

Przedstawiając wkład kolejnych pokoleń naukowców w rozwój mikrobiologii lekarskiej w Krakowie, ze względu na skromne rozmiary artykułu, nie wymieniono wszystkich nazwisk. Na zakończenie należy więc jeszcze podkreślić, że na przestrzeni ponad stu lat historii naszej jednostki, od Katedry Higieny do Katedry Mikrobiologii, związanych z nią było wiele zasłużonych osób – poza wspomnianymi w tekście – i nie tylko jako etatowi pracownicy naukowo-dydaktyczni i naukowo-techniczni, ale też jako studenci, doktoranci oraz współpracownicy przy realizacji tematów badawczych.

### Piśmiennictwo

- Bilek M., Polscy uczeni zasłużeni dla krakowskich służb sanitarnych i przeciwepidemicznych (w): Od królewskich edyktów do inspekcji sanitarnej, red. J. Bukowski, M. Bilek, STUDIO ARTPRESS, Kraków, 68–189 (2007)
- Bilek M.: Krakowskim szlakiem Profesora Rudolfa Weigla, Alma Mater, Lipiec, 66–70 (2007)
- Bobrowa-Porwit Z., Chłap Z., Kowalczykowska J., Przybyłkiewicz Z.: Cytopatologia szczepu nowotworowego Hela (*carcinoma cervicis* GEY) w wyniku działania wirusa krowianki ospowej. *Patol. Pol.* **2**, 163–73 (1958)
- Borysiewicz J., Tadeusiewicz R.: Computer evaluation of antiviral activities of some thiosemicarbasones in experiments in vivo. *Acta Virol.* **20**, 402–410 (1976)
- Borysiewicz J., Tadeusiewicz R.: Zastosowanie maszyny cyfrowej w badaniach wirusologicznych. *Informatyka*, **5**, 12–13 (1976)
- Bóbr J., Zabiego J. i wsp.: Częstość występowania i rodzaj zakażeń noworodków w szpitalach. *Pol. Tyg. Lek.* **9**, 297 (1966)
- Bóbr J., Kucharzyk J.: Wpływ cech osobniczych i postępowania zabiegowego na częstość występowania zakażeń ran operacyjnych. *Przegl. Epidemiol.* **22**, 89 (1968)
- Bujwid O., Osamotnienie. Pamiętniki z lat 1932–1942, Wyd. Literackie, Kraków, 1990
- Bulanda M., Gruszka M., Heczko B.: Effect of mupirocin on nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *J. Hosp. Infect.* **14**, 117–124 (1989)
- Bulanda M., Heczko P.B.: Zaburzenia składu mikroflory skóry ludzkiej. *Post. Mikrob.* **24**, 209–215 (1985)
- Bulanda M., Kunstmann G., Mauff G., Kurek M., Pulverer G., Heczko P.B.: Antibodies against toxic shock syndrome toxin no. 1 (TSST-1) in Poland. *Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg.* **270**, 396–9 (1989)
- Doleżał M., Przybyłkiewicz Z., Starzyk J.: Wpływ LAR-GACTILU na *Toxoplasma gondii*. *Med. Dosw. Mikrobiol.* **2**, 172– (1956)
- Zasowska A., Doleżałowa M.: Próba oceny wartości antybiogramu w pracy oddziału chirurgicznego. *Pol. Przegl. Chirurg.* **3**, 273–277 (1959)
- Działalność naukowa Akademii Medycznej w Krakowie w latach 1953 i 1954. Wykaz bibliograficzny. Kraków, 1955
- Gajda Z.: Odo Bujwid (1857–1942). *Post. Mikrobiol.* **33**, 431–434 (1994)
- Georgiades J.: Biologia i próby klasyfikacji systematyki wirusa *Motol*. *Post. Mikrobiol.* **2**, 197 (1963)
- Heczko P.: Jubileuszowa Sesja Naukowa Uniwersytetu Jagiellońskiego poświęcona 100-leciu pierwszego akademickiego wykładu z mikrobiologii lekarskiej wygłoszonego przez profesora Odon Bujwida. *Post. Mikrobiol.* **33**, 563–564 (1994)
- Jeżyna Cz.: Prof. dr hab. Stanisław Legeżyński (1895–1970) (w) Ci, którzy odeszli. Biografie profesorów i zasłużonych pracowników, Wyd. Akademia Medyczna w Białymstoku, 1990, s. 37–44.
- Kempa M.E., Sabat D.: Odo Bujwid (1857–1942) – pionier badań cytologicznych układu oddechowego, bakteriologii i higieny w Polsce. *Ann. Acad. Med. Silesiensis*, **25** (Suppl.) 207–219 (1997)
- Kucharz E.: Życie i działalność Odon Bujwida – polskiego lekarza, społecznika i esperantysty. *Wiad. Lek.* **39**, 123–129 (1986)
- Kunicki-Goldfinger W.J.H.: Rola Krakowa w powstaniu mikrobiologii polskiej. Wspomnienie o Odonie Bujwidzie (1857–1942). *Post. Mikrobiol.* **34**, 111–114 (1995)
- Laskowicka Z., Rybarska I., Krakowska M., Sęk S.: Niektóre zagadnienia diagnostyki hodowlanej kandydozy. *Folia Med. Crac.* **2**, 229 (1965)
- Lisiewicz J., Sałkowski J., Urbanowicz A., Nowak Julian Ignacy (w) Polski Słownik Biograficzny, Wyd. PAU, 1978, T. 23/2, Zeszyt 9/7, s. 265–267.
- Michalewicz J. (red.): Z prac Archiwum Uniwersytetu Jagiellońskiego. Relacje pracowników Uniwersytetu Jagiellońskiego o ich losach osobistych i dziejach uczelni w czasie drugiej wojny światowej, Wyd. Secesja, Kraków, 2005, Seria F, T. 5, s. 185–188.
- Ostrowska T.: Legeżyński Stanisław Emil Władysław (w:) Polski Słownik Biograficzny, Zakład Narodowy im. Ossolińskich, Wyd. PAN, Wrocław–Waszawa–Kraków–Gdańsk, 1972, T. XVII/1, Zeszyt 72, s. 3.
- Ostrowska T.: Nitsch Roman Franciszek Henryk (w:) Polski Słownik Biograficzny, Zakład Narodowy im. Ossolińskich, Wyd. PAN, Wrocław–Waszawa–Kraków–Gdańsk, 1978, T. XXIII, s. 151.
- Polskie Towarzystwo Mikrobiologów (online), <http://www.microbiology.pl/pl/main.html> (08.07.2008)
- Porwit-Bóbr Z., Chłap Z., Przybyłkiewicz Z.: Badania nad onkotwórczym działaniem wirusa polyoma *in vitro* oraz *in vivo*. I. Przebieg zakażenia wirusem polyoma w hodowli komórek zarodka mysiego. *Folia Biol. (Kraków)*, **10**, 187 (1962)
- Przybyłkiewicz Z.: Gieszczykiewicz Marian Teodor (w:) Polski Słownik Biograficzny, Wyd. PAU, Kraków, 1948, T. VII/1, Zeszyt 31, s. 457.

30. Przybyłkiewicz Z.: Odo Bujwid (w) Sześćsetlecie medycyny lwowskiej. Życiorysy, red. L. Tochowicz, AM Kraków, 1963, Tom. I., s. 265–280.
31. Przybyłkiewicz Z.: Powstanie i rozwój Katedry Mikrobiologii w Krakowie. Historia Katedr (w:) Sześćsetlecie medycyny lwowskiej, red. L. Tochowicz, AM Kraków, 1964, T. II., s. 611–628.
32. Przybyłkiewicz Z.: Analiza immunoelektryczna precypityn króliczych dla białek surowicy ludzkiej. *Acta Med. Pol.* **1**, 105 (1963)
33. Pulverer G., Heczko P.B., Peters G.: Phage-typing of coagulase-negative Staphylococci. *Z. Allg. Mikrob.* **5**, 361 (1980)
34. Śródka A.: Filip Eisenberg (w:) Uczeni Polscy XIX–XX stulecia, Wyd. Aries, Warszawa, 1994, T. I, s. 442.
35. Śródka A.: Album Lekarzy i Farmaceutów Polskich. Marian Gieszczykiewicz, *Arch. Hist. Filoz. Med.* **52**, 413–414 (1989)
36. Worowski K.: Stanisław Legeżyński. *Medyk Białostocki*, **43/44**, 39–40 (2006)
37. Zgórnjak-Nowosielska I., Reiss J., Chaja W.: Oporność na antybiotyki szczepów bakteryjnych wyosobnionych od chirurgicznie leczonych chorych oraz od nosicieli. *Pol. Przegl. Chirurg.* **4**, 375–387 (1958)
38. Zgórnjak-Nowosielska I., Sednik W.D., Hummeler K., Korprowski H.: Nowa metoda wykazywania mykoplazm z zawiesin wirusowych oraz z hodowli komórek. *J. Virol.* **1**, 1227 (1967)
39. Zgórnjak-Nowosielska I.: Mycoplasmy i ich rola w schorzeniach u ludzi. *Post. Hig. Med. Dosw.* **21**, 497 (1967)

Agata Ciepierska\*, Marta Czerna

Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej UŁ, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

Wpłynęło w maju 2008 r.

### Professor Rudolf Stefan Weigl (1883–1957)

**Abstract:** It is the 21<sup>st</sup> century, we are young, both world wars and people who lived then belong to the history. Some of us have heard about professor Weigl, however not much beyond mere facts: born in 1883, a brilliant scientist in many fields: zoology, parasitology, anatomy, histology, entomology and microbiology, inventor of the first effective vaccine against epidemic typhus (spotted fever) caused by *Rickettsia*. During the Second World War professor Weigl was the head of Typhoid Institute organized by the Nazis. Apart from saving people by making them workers of the Institute, he rescued many lives illegally distributing his vaccine to the occupied areas. He received many honors for his research. Professor Weigl was not only an excellent scientist but also a great patriot and a lot of people owe their lives to him. For us he is a role model and an authority. Despite the hard times, he did not care for fame and money. He just wanted to create something new in science and to be a good man. Charles Nicolle said: “Weigl has saved the lives of thousands of people. He is the man who deserves the highest praise”.

**Słowo kluczowe:** *Rickettsia*, szczepionka, Weigl Rudolf Stefan

**Key words:** *Rickettsia*, vaccine, Weigl Rudolf Stefan

Rudolf Stefan Weigl – nazwisko, które kojarzy się dziś przede wszystkim z wynalezieniem szczepionki przeciwko tyfusowi plamistemu. I słusznie. Mało kto jednak wie że biolog Ten, urodzony 2 września 1883 roku w Prerowie na Morawach w niemieckiej rodzinie był nie tylko naukowcem. Był patriotą, który wychowany w Polsce umiłował naszą ojczyznę do tego stopnia, że pomimo korzyści jakie mógł osiągnąć odrzucił propozycję zmiany narodowości podczas drugiej wojny światowej. Zawsze powtarzał, że jest Polakiem. Wszechstronnie wykształcony: w roku 1907 ukończył studia przyrodnicze na Uniwersytecie Lwowskim, a następnie, w roku 1913, habilitował się z zakresu histologii, zoologii i anatomii porównawczej. Nie traktował nauki jako jedyne go celu w życiu. Wręcz przeciwnie: nauka pomagała Mu osiągać inne, niemniej ważne cele [1, 4, 6, 8, 9].

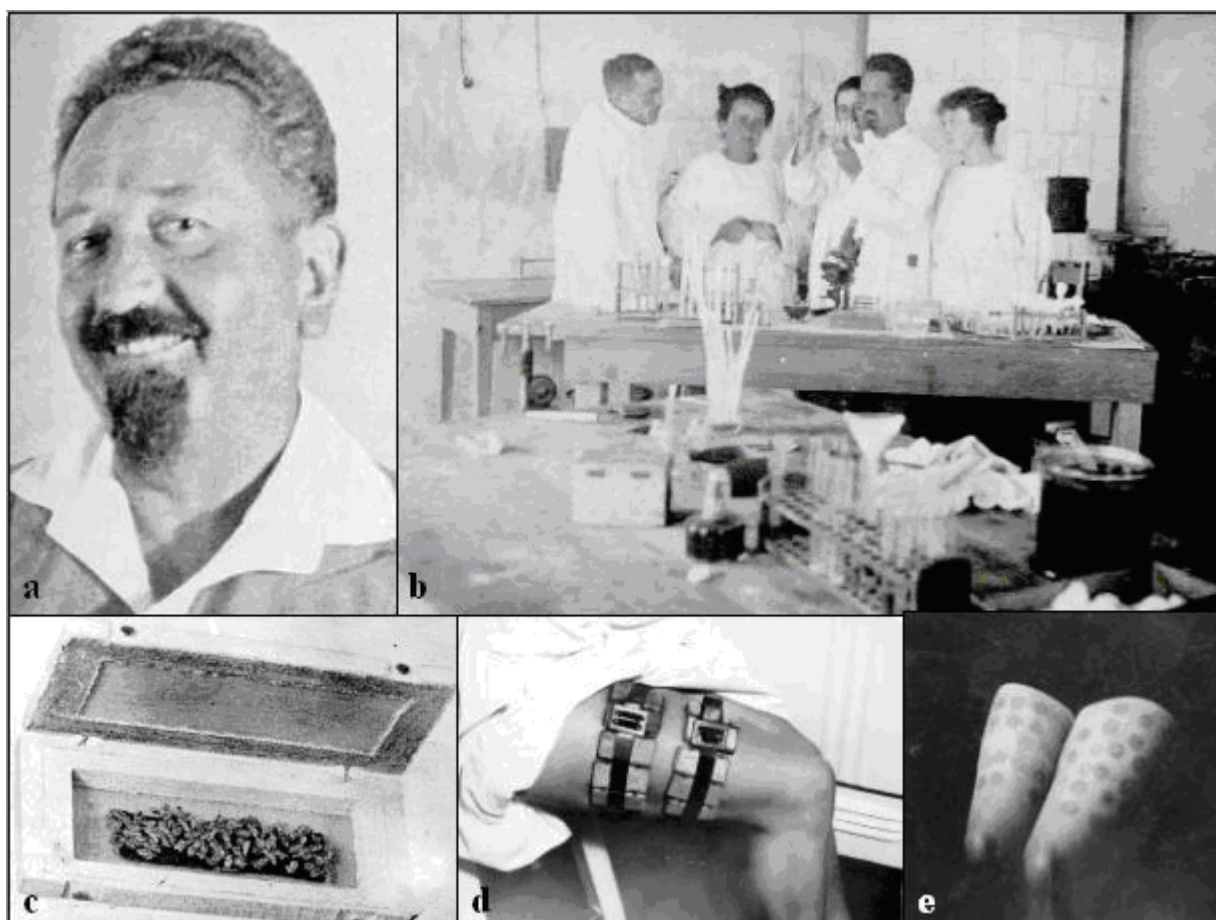
Przygoda z tyfusem plamistym rozpoczęła się podczas pierwszej wojny światowej, kiedy R.S. Weigl pracował dla wojska jako parazytolog badając tyfus plamisty na uniwersytecie we Lwowie [5]. W tym czasie brazylijski mikrobiolog, Henrique Rocha-Lima odkrył drobnoustrój wywołujący tę chorobę, i na cześć dwóch mikrobiologów: Amerykanina Rickettsa i Czecha Proszka, którzy zginęli badając czynnik etiologiczny duru plamistego nazwał go *Rickettsia prowazekii*. Od 1910 roku dzięki Charles Nicolle wiadomo było, że za szerzenie tyfusu odpowiedzialne są wszy [4, 6, 8, 9]. Z powodu braku możliwości hodowli tego drobnoustroju w warunkach laboratoryjnych naukowcy Ci nie byli pewni swego odkrycia.

Bakterie *R. prowazekii* mnożą się wyłącznie wewnątrz organizmu żywego. I tu przełomową technikę wprowadził R.S. Weigl: sztuczne doodbytnicze (więc nie fizjologiczne) zakażenie wszy drobnoustrojami, co ostatecznie pozwoliło udowodnić etiologiczną rolę owadów w tyfusie plamistym. Zakażenia wszy dokonywano z pomocą szklanej kapilary o grubości włosa ściętej skośnie i z oblepionymi brzegami aby nie skaleczyć owada. Z zakażonych jelit, zmiażdżonych i odpowiednio oczyszczonych, robiono szczepionkę [2, 6, 8].

Dlaczego tyfus plamisty? Tyfus zwany inaczej durrem plamistym to choroba powodowana przez *Rickettsia prowazekii*. Wyróżnia się tyfus szkurzy przenoszony przez pchły mający charakter endemiczny oraz tyfus europejski przenoszony przez wszy. Tą właśnie chorobą zainteresował się Rudolf Weigl. Na początku XX wieku – w czasach wojen i konfliktów to właśnie tyfus plamisty zbierał największe żniwo wśród ludzi na froncie i w domach. Panowała epidemia paniki ze względu na niemoc lekarzy, którzy nie umieli skutecznie leczyć choroby, a w dodatku sami umierali z powodu zakażeń [2, 3, 6, 8].

W czasie pierwszej wojny światowej R.S. Weigl pracował jako parazytolog dla Armii Austriackiej [2]. Po wojnie zaś został mianowany kierownikiem Wojskowego Laboratorium Bakteriologicznego w Przemyśle [5]. Kontynuował badania nad tyfusem plamistym zdobywając uznanie świata nauki i tytuł zwyczajnego profesora Biologii Ogólnej Wydziału Lekarskiego na Uniwersytecie Jana Kazimierza we Lwowie [2].

\* Autor korespondencyjny: Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej UŁ, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź, tel. (42) 635 44 72



Rys. 1. a – Rudolf Stefan Weigl; b – Profesor i współpracownicy w laboratorium; c – klateczka zaprojektowana przez profesora Weigla, w której hodowano wszy; d – karmiciel z klateczkami zawierającymi wszy; e – ślady po zdjęciu klateczek [7]

Profesor poświęcił się całkowicie badaniom duru plamistego, ale w Jego dorobku znaleźć można również liczne prace z dziedziny cytologii (zajmował się strukturą aparatu Golgiego i mitochondriów) oraz transplantologii [5].

W 1939 r. Profesor wyjechał do Abisynii, gdzie pomagał w opanowaniu epidemii duru plamistego tworząc zakład produkujący szczepionkę [4]. Z powodu widma wojny wrócił jednak do kraju wiedząc, że będzie potrzebny w ojczyźnie. W latach 1939–1941, podczas okupacji sowieckiej Lwowa, profesor Weigl prowadził prace w Instytucie Badań nad Durem Plamistym i Wirusami [9]. Po wkroczeniu do miasta Niemców w 1941 roku Profesor odrzucił złożoną mu propozycję podpisania Reichslisty i objęcia katedry w Berlinie. Gest ten był jednoznaczny z utratą poparcia władz niemieckich dla Jego kandydatury do Nagrody Nobla. Musiał też zgodzić się na przejście Instytutu pod zarząd Wehrmachtu i produkowanie szczepionki dla Niemców, co niejednokrotnie było Mu po wojnie wspomniane. Wymógł jednak na Niemcach, że to On decyduje kogo zatrudnia do pracy w Instytucie Produkcji Szczepionki [5, 9]. Był to krok wymagający ogromnej odwagi, bo ludzie którzy tam pracowali często nie po-

siadali odpowiednich kwalifikacji (miało to wpływ na jakość szczepionki oraz na bezpieczeństwo pracy). W ten sposób Profesor uratował życie kilku tysiącom przedstawicieli polskiej inteligencji, konspiracyjnej młodzieży oraz bojownikom ruchu oporu. Ludzie ci pracowali jako: hodowcy – hodowali z jajeczek wszy i dbali o klatki, karmiciele – oddający codziennie krew kilku tysiącom wszy, zdrowymi zakażonym, strzykacze – wstrzykiwali wszom zarazki, preparatorzy – wyjmowali jelita i preparowali z nich szczepionkę (rys. 1) [2, 8, 9].

Pracownicy R.S. Weigla dostawali od Niemców białe tekturki mocowane na drzwiach mieszkania „Tu mieszka pracownik Instytutu Weigla”. W kieszeniach nosili żółtą kartkę z orłem, swastyką i napisem „Institut für Fleckfieber und Virusforschung”. Praca w Instytucie chroniła ich przed łapankami, wywózką do Niemiec i zapewniała przydział żywności. Bycie „weiglowncem” oznaczało praktycznie nietykalność [4].

Profesor przekonał również Niemców, że aby szczepionka była skuteczna potrzebne mu są wszy z getta (jak mówił – po to aby odnawiać szczepy). Oficjalnie jeżdżono do warszawskiego getta po owady, nieoficjalnie – z buteleczkami ze szczepionką, która uratowała

życie wielu przebywającym tam Żydom. Z polecenia R.S. Weigla szczepionka docierała też do getta lwowskiego i do obozu w Oświęcimiu. Jednym z wielu ocalonych był profesor Ludwik Hirsfeld (przebywający w warszawskim getcie), któremu jeden z pracowników Weigla dostarczył szczepionkę [6, 9].

Hitlerowcy bali się tyfusu więc zgodzili się na masowe szczepienia. W ten sposób Weigl zaszczerpił tysiące osób, m.in. członków Armii Krajowej, tajnych wykładowców, ludzi z ruchu oporu. Profesor nie tylko ratował życia – uratował też polską naukę. Mimo okupacji w Instytucie panowała atmosfera sprzyjająca działalności naukowej. Powstawały znakomite prace, które przyczyniły się do rozwoju biologii i medycyny. Stefania Pokorny, Zbigniew Stuchły i Ewa Łomnicka-Broszkiewicz zajmowali się biologią wszy; Stanisława Woyciechowska badała zagadnienia z zakresu cytologii, kontynuując prace Rudolfa Weigla; Tadeusz Korzybski i Stefan Kryński opisali toksyczne działanie *R. prowazekii*, a razem ze Stanisławą Woyciechowską udowodnili rolę hemoglobiny w cyklu życiowym wszy [4, 9].

Wiosną 1944 roku, gdy do Lwowa ponownie miały wkroczyć wojska sowieckie, Profesor nie przyjął propozycji Niemców aby ewakuować się do Niemiec, lecz wyjechał do Krościenka. Ponownie nie opuścił Ojczyzny. Po wojnie pracował w Katedrze Biologii Ogólnej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, a następnie w Katedrze Biologii Ogólnej Uniwersytetu Poznańskiego. Zmarł 11 sierpnia 1957 roku w Zakopanem i został pochowany na cmentarzu Rakowickim w Krakowie [1, 4, 8, 9].

Rudolf Weigl jako pierwszy wprowadził badania na żywych owadach. Wielu uczonych, za jego przykładem posłużyło się owadami w opisanu licznych gatunków drobnoustrojów. Dzięki niemu owady i roztocza zaczęto traktować jako rodzaj zwierząt doświadczalnych. Stosując technikę profesora Weigla badano m.in.: krętki, pałeczki jelitowe gronkowce. Jak się później okazało technika ta stała się niezbędna w takich dziedzinach jak na przykład wirusologia [3–5].

Choć tak wiele wniósł do nauki, nauka nie stanowiła dla niego drogi do kariery. Była jego największą, o ile nie jedyną miłością. Weigl był bardzo zaangażowany w to co robił, był zawsze chętny do pomocy. Ten precyzyjny eksperymentator, szukający potwierdzenia swoich tez w wielu badaniach i setkach powtórzeń, był też mężem i ojcem. Był zapalonym wędkarzem oraz łuczniakiem, który sam lutował groty [5].

Za zasługi dla nauki oraz pomoc ludziom w okresie okupacji hitlerowskiej został odznaczony m.in.: Państwowym Odznaczeniem od króla belgijskiego Leopolda za uratowanie życia belgijskim misjonarzom w Chinach (1937 r.), Orderem św. Grzegorza od papieża Piusa XI za ratowanie tysięcy ludzi na różnych

kontynentach (1938 r.), orderem Polonia Restituta, Krzyżem Komandorskim z Gwiazdą (1937 r.) członkostwem wielu naukowych instytucji, tytułem Sprawiedliwego Wśród Narodów Świata (pośmiertnie odznaczony przez izraelski Instytut Yad Vashem w roku 2003), kandydował również do Nagrody Nobla, której niestety nie otrzymał [2, 3, 8, 9].

Osoba profesora Rudolfa Stefana Weigla to wciąż postać zbyt mało znana dla wielu ludzi. Smutny jest fakt, że wielu młodych mikrobiologów nie zna tego nazwiska. Z czego to wynika? Może to czasy, w których żył Profesor sprawiły, iż nie osiągnął On wielkiej popularności wśród społeczeństwa (nienaukowego), a może charakter Weigla, który przedkładał badania i obserwacje nad publikowanie uzyskanych wyników. Cokolwiek to spowodowało, Profesor był niewątpliwym autorytetem, a pamięć o nim należy pielęgnować i szerzyć. Jego postawa – odwaga i upór zasługują na podziw. Swoim życiem udowodnił, że mimo przeciwności losu, nieprzychylności i złośliwości wielu ludzi można osiągnąć naprawdę wiele. I nie chodzi tu o rozgłos czy pieniądze, ale o rozwój nauki i czerpanie z tego satysfakcji.

#### Podziękowania

Autorki serdecznie dziękują profesorowi Waławowi Szybalskiemu za wszelkie sugestie i komentarze oraz Panu Stanisławowi Kosiedowskiemu, autorowi strony [www.lwow.home.pl](http://www.lwow.home.pl), za możliwość wykorzystania zamieszczonych tam zdjęć. Szczególne podziękowania kierowane są do profesor Wiesławy Rudnickiej za ogromne wsparcie i nieocenioną pomoc.

#### Piśmiennictwo

1. Bubnicki R.: Polak z krwi i kości. Wynalazca szczepionki przeciw tyfusowi, 31 X/1 XI, *Rzeczpospolita*, (1994)
2. Chmielowski J.: Rudolf Weigl – twórca szczepionki przeciw tyfusowi plamistemu, (online), <http://www.lwow.home.pl>, 5 lutego 2008 (data potwierdzenia ważności adresu)
3. Kryński S.: W nauce był artystą, *Polityka*, **24**, 14, (1978).
4. Kryński S.: 1967. Rudolf Weigl (1883–1957), *Med. Dośw. Mikrobiol.* **19**, 213–218 (1968)
5. Mosing H.: Rudolf Weigl uczony i człowiek na 50-lecie jego badań nad tyfusem plamistym, „Zwyciężyć tyfus – Instytut Rudolfa Weigla we Lwowie. Dokumenty i wspomnienia”, red. Stuchły Z., Wyd. Sudety, Wrocław, 2001
6. Mosing H.: Wspomnienie o profesorze Weiglu, Wykład przygotowany na zebranie Uniwersytetu Trzeciego Wieku we Lwowie, nagranie magnetofonowe dokonane przez Halinę Owczarek z Radio Lwów, (1994)
7. Mój Lwów WEBSITE, 6 styczeń 2008 (online). Kosiedowski S., <http://lwow.home.pl>, (5 lutego 2008, data ostatniego sprawdzenia adresu)
8. Szybalski W.: Wykorzystanie wszy laboratoryjnych karmionych przez ludzi dla produkcji szczepionki Weigla przeciw tyfusowi plamistemu, *Science Publishers, Inc.* s. 161–180, (1999)
9. Złotorzycka J.: Profesor Rudolf Weigl (1883–1957) i jego instytut, *Analecta*, **1**, (1998)



## Recenzje książek

---

Autor: praca zbiorowa pod redakcją naukową  
**Zdzisławy Libudzisz**  
**Krystyny Kowal**  
**i Zofii Żakowskiej**

Tytuł: **Mikrobiologia techniczna, tom 1**  
**Mikroorganizmy i środowiska ich występowania.**

Redaktor PWN: **Krystyna Mostowik**

Projektant okładki: **Edwin Radzikowski**

Wydawnictwo naukowe PWN S.A.

Warszawa 2007

ISBN 978-03-01-15221 – t. 1

ISBN 978-03-01-15222 – t. 2

---

Recenzowana książka (tom 1-szy) jest podręcznikiem akademickim mikrobiologii technicznej, przeznaczonym głównie dla studentów uczelni politechnicznych. Autorzy – w sumie 26-ciu – zachęcają również do korzystania z niej studentów i młodych pracowników innych specjalności. Dzieło to – poza kilkoma wyjątkami – IBB PAN, Agropharmu S.A. i Inst. Med. Pracy – napisali pracownicy Politechniki Łódzkiej. Warto w tym miejscu zaznaczyć iż, uczelnia ta ma duże zasługi dla rozwoju mikrobiologii technicznej w Polsce. Tutaj bowiem od 1952 roku działa Katedra Mikrobiologii Technicznej oraz od 1975 r. Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, obie te struktury utworzone zostały m.in. przez niedawno zmarłą prof. dr hab. Jadwigę Jakubowską. Prawie wszyscy Autorzy podręcznika są pracownikami tej placówki oraz jak sądzę kontynuują Jej dzieło – choć o tym nie wspominają w przedmowie.

Celem książki było jak sądzę, napisanie podręcznika akademickiego mikrobiologii przemysłowej/technicznej spełniającego wcześniej obowiązujące minima programowe dla specjalności Biotechnologia. Cel ten w pełni osiągnięto. Sądzę również, iż drugim być może nie uświadomianym celem jej napisania była chęć „zakonserwowania” w świadomości biologów nazwy mikrobiologia techniczna.

W Przedmowie Autorzy definiują pojęcie mikrobiologia techniczna/przemysłowa jako przedmiot, który zajmuje się *opisem zjawisk wywołanych przez mikroorganizmy podczas prowadzenia procesów przemysłowych zarówno tradycyjnych procesów fermentacyjnych, jak i procesów biosyntezy czy biotransformacji mikrobiologicznej stosowanych w produkcji leków czy biopreparatów wykorzystywanych przez człowieka w gospodarce*. I dalej – Autorzy podkreślają, iż zadaniem mikrobiologii technicznej jest badanie i gromadzenie informacji o drobnoustrojach istotnych w tych procesach. Rozumiem z tej wypowiedzi, iż zadania tej dyscypliny mają charakter fenomenologiczny. Autorzy nie zajmują się tutaj konkretnymi przykładami technologii biologicznych w których zastosowano drobnoustroje. Zamiast tego, dość ogólne informacje o biologii drobnoustrojów plus opisy kilku technik laboratoryjnych, przeważają w problematyce podręcznika. Dochodzi nawet do paradoksu, w książce pt. *Mikrobiologia techniczna*, znajduje się osobny rozdział pt. *Mikroflora człowieka*, natomiast niema nawet wzmianki o całej dyscyplinie zwanej obecnie inżynierią bioprosesową. Wiadomo, że postęp w intensyfikacji *procesów biosyntezy czy biotransformacji*, który jest również ostatecznym celem badań podstawowych, uzyskuje się w dwu równoległych typach manipulacji tj. ulepszaniu szczepów

(o tym Autorzy piszą) oraz optymalizacji samego procesu (projektowanie aparatury np. do hodowli drobnoustrojów z uwzględnieniem takich problemów jak choćby, mieszanie, napowietrzanie, stress wywołany działaniem naprężenia stycznego ścinającego itp.) Sądzę, iż brak omówienia choćby tylko w zarysie tej problematyki zuboża podręcznik, który w obecnej formie można określić jako Mikrobiologii technicznej, bez techniki.

Bliższa jest mi koncepcja książki przedstawiającej te same treści zawarte w klasycznym już podręczniku prof. Aleksandra Chmiela pt. *Biotechnologia. Podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne* (PWN Wa-wa 1998).

A. Chmiel pisze w nim, iż” *Biotechnologia jest interdyscyplinarną dziedziną nauki, obejmującej różne kierunki technicznego wykorzystania materiałów i procesów mikrobiologicznych. W szczególności obejmuje ona procesy biosyntezy i biotransformacji, przebiegają one przy udziale drobnoustrojów, kultur komórkowych – roślinnych i zwierzęcych – in vitro – oraz enzymów a także obejmuje izolację tak otrzymanych biopreparatów.*

Jeśli chodzi o układ treści oraz poziom ogólności prezentowanej problematyki oba podręczniki (Chmiela i Libudzisz i wsp.) są podobne. Jednakże A. Chmiel traktuje zagadnienia optymalizacji procesów jak i biologii drobnoustrojów jako równie ważne. Jest dla mnie sprawą oczywistą, iż to co dawniej nazywano mikrobiologią techniczną czy przemysłową jest częścią ogólnej biotechnologii. W zależności od rodzaju uzyskiwanych produktów można ją podzielić na trzy działy tj. biotechnologię białą, zieloną i czerwoną. W każdym z tych działów udział drobnoustrojów jest nie do przecenienia.

Recenzowana książka składa się z pięciu części zatytułowanych: I. Charakterystyka mikroorganizmów, II. Mikroorganizmy a czynniki środowiskowe, III. Mikroorganizmy w środowiskach naturalnych, IV. Laboratorium mikrobiologiczne, V. Ulepszanie i przechowywanie mikroorganizmów. Całość kończy zestawienie literatury uzupełniającej oraz skorowidz. Tytuły części II i III sugerują, iż Autorzy są szczególnie zainteresowani problematyką środowiska. W zapowiedziach 2-gi tom podręcznika zatytułowany *Mikroorganizmy w biotechnologii, ochronie środowiska i produkcji żywności* wraca znowu do tej problematyki. Mój niepokój budzi fakt, iż Autorzy chcą pisać w nim o biotechnologiach białej (produkcja żywności), biotechnologii zielonej (ochrona środowiska, produkcja żywności) a nie przewidziano tam miejsca dla omówienia niezwykle ważnej grupy tj. biotechnologii stosującej drobnoustroje w medycynie (biotechnologia czerwona).

Za bardzo oryginalne uważam natomiast dwa rozdziały podręcznika tj. rozdział traktujący o zasadach bezpiecznej pracy w laboratoriach mikrobiologicznych a szczególnie opis regulacji prawnych zapewniających takie warunki. Myślę jednak, że ze względu na duże zainteresowanie polskiego społeczeństwa oraz obawy związane z użyciem GMO, może warto by było w przyszłym wydaniu podręcznika przedstawić również zasady bezpiecznej pracy z tą grupą drobnoustrojów.

Wreszcie za cenny uważam pomysł wzbogacenia rozdziału o sposobach przechowywania szczepów bakteryjnych zestawieniem znanych międzynarodowych kolekcji szczepów wirusów bakterii i grzybów.

Jerzy Hrebenda  
Instytut Mikrobiologii  
Uniwersytet Warszawski

Autor: **Mieczysław K. Błaszczyk**  
 Tytuł: **Mikroorganizmy w ochronie środowiska**  
 Redaktor PWN: **Krystyna Mostowik**  
 Projektant okładki: **Edwin Radzikowski**  
 Wydawnictwo naukowe PWN S.A.  
 Warszawa 2007  
 ISBN 978-03-01-15149-2

Zacznę od subiektywnej oceny, otóż uważam, iż książka M.K. Błaszczyka pt. *Mikroorganizmy w ochronie środowiska* jest jednym z lepiej napisanych polskich podręczników akademickich traktujących o środowisku. Wystarczy przeczytać kilka rozdziałów – aby nie będąc nawet specjalistą – ocenić, iż dzieło to przygotował fachowiec. Świadczą o tym zarówno wybór tematyki, język, sposób dokumentowania, jak również fakt, włączenia do książki wyników własnych prac eksperymentalnych, które dobrze ilustrują omawiane w podręczniku problemy oraz „czynią wrażenie” autentyczności prezentowanych przez Autora treści.

Książka składa się z 12-tu rozdziałów o dość ogólnie sformułowanych tytułach, każdy z nich rozbity jest na podrozdziały (od kilku do kilkunastu), każdy też kończy się spisem literatury przedmiotu (przeważają najświeższe publikacje). Prócz tego całość poprzedza krótki wstęp oraz zestawienie skrótów używanych w tekście. Poszczególne rozdziały zatytułowano: Co to są prokarioty? (1), Mikrobiologiczne metody uzdatniania wody do picia (2), Oczyszczanie ścieków metodami konwencjonalnymi (3), Biologiczne usuwanie azotu mineralnego ze ścieków (4), Oczyszczanie ścieków w warunkach beztlenowych (5), Kompostowanie odpadów organicznych (6), Bioługowanie metali z rud i odpadów (7), Biodesulfuryzacja węgla kamiennego i ropy naftowej (8), Mikrobiologiczna deodoryzacja emisji bioprzemysłowych i przemysłowych (9), Bioremediacja (10), Biosensory mikrobiologiczne (11), Skorowidz rzeczowy (12).

Ilość informacji zawartej w każdym z poszczególnych rozdziałów jest porównywalna w całym podręczniku. Oznacza to, iż Autor pracujący wiele lat w Zakładzie Mikrobiologii Środowisk Instytutu Mikrobiologii UW oraz na co dzień zajmujący się różnymi metodami oczyszczania ścieków, traktuje poważnie zarówno bliską sobie tematykę „ściekowca” jak i mniej atrakcyjną dla Niego tematykę w rodzaju mikrobiologicznej deodoryzacji bioemisji, emisji przemysłowych czy biosulfuryzacji węgla kamiennego. Z podręcznika można się dowiedzieć na czym polega uzdatnianie wody, kompostowanie materii organicznej czy też bioremediacja. Autor nie ucieka również od omówienia problemów bardzo obecnie modnych – mam tutaj na myśli rozdział poświęcony biologicznym biosensorom.

*Mikroorganizmy w ochronie środowiska* zostały wydane przez PWN cztery lata później po ukazaniu się książki pań Ewy Klimiuk i Marii Łebkowskiej pt. *Biotechnologia w ochronie środowiska*. Obie książki są podręcznikami, których z definicji aktualność nie ulega zmianie w okresie przynajmniej kilku lat. Stąd wydanie drugiego podręcznika o tej samej tematyce (M. Błaszczyka), wydaje się być nieuzasadnione. Myślę, że powodów dla takiego postępowania Wydawcy można znaleźć wiele, nie będąc starał się ich tutaj rozszyfrowywać. Natomiast dla mnie fascynującą była możliwość prześledzenia interpretacji i opisu tych samych zjawisk, przez dwu różnych specjalistów o wykształceniu uniwersyteckim oraz wykształceniu politechnicznym.

Jerzy Hrebenda  
 Instytut Mikrobiologii  
 Uniwersytet Warszawski

Autor: praca zbiorowa pod redakcją naukową  
**Jakuba Gołąba**  
**Marka Jakóbiśiaka**  
**Witolda Laska**  
**Tomasza Stokłosa**

Tytuł: **Immunologia**  
 Redaktor PWN: **Krystyna Kruczyńska**  
 Projektant okładki: **Edwin Radzikowski**  
 Wydawnictwo naukowe PWN S.A.  
 Warszawa 2007  
 ISBN 978-03-01-15154

Recenzowany podręcznik jest kolejną, najnowszą ofertą PWN w zakresie immunologii. Wydana książka jest podręcznikiem akademickim przeznaczonym głównie dla studentów wydziałów biologicznych i biotechnologicznych Uniwersytetów, studentów wydziałów weterynaryjnych i zootechnicznych Uniwersytetów Przyrodniczych i Akademii Rolniczych oraz oczywiście studentów Uniwersytetów Medycznych. Prezentowany podręcznik jest najnowszym, uzupełnionym źródłem podstaw immunologii. Został on napisany przez 16 autorów specjalizujących się w różnych dziedzinach współczesnej immunologii. Autorzy są przedstawicielami takich instytucji jak Akademia Medyczna czy Narodowy Instytut Zdrowia. Immunologia jest obecnie jedną z najszybciej rozwijających się dziedzin biologii współczesnej, stąd bardzo celowe jest ciągle i częste uzupełnianie zawartej w podręcznikach wiedzy. Dlatego też intencja autorów, tj. uzupełnienie dotychczasowej oraz zebranie najnowszej wiedzy z zakresu immunologii, była jak najbardziej wskazana i oczekiwana na rynku wydawniczym od kilku lat.

Treści zawarte w podręczniku zostały podzielone na 24 rozdziały. Sekwencja rozdziałów jest logiczna i zgodna z przyjętymi normami. Każdy z nich opisuje kolejno elementy układu immunologicznego człowieka, aby zakończyć dzieło zjawiskami związanymi z odpornością, autoimmunizacją oraz podstawami immunomodulacji i immunologii nowotworów. Szczególnie ten ostatni rozdział jest napisany na podstawie najnowszych osiągnięć z zakresu immunologii nowotworów i podejmowanych prób walki z nimi. Aż szkoda, że ostatni rozdział dotyczący terapii nowotworów nie zawiera najnowszych danych z roku bieżącego, albowiem obecnie obserwuje się gwałtowny rozwój prowadzonych badań w tym zakresie. Niestety przez dość długi proces wydawniczy nie ma możliwości zawarcia w podręczniku tych najnowszych informacji z ostatnich dni. Oczywiście powyższa uwaga w niczym nie umniejsza wielkiej wartości naukowej podręcznika, który za pośrednictwem PWN od wielu lat stoi na czele listy podręczników akademickich pod względem poziomu naukowego.

Podręcznik na pewno zapewni poznanie podstawowych pojęć i zdobycie obszernej wiedzy z dziedziny immunologii w zakresie umożliwiającym studiowanie. Podręcznik wyróżnia się świetną szatą graficzną. Układ oraz dobór rycin i zdjęć są prawidłowe, a opisy do ilustracji tak dobrane, aby naturalnie rozwijać treści zawarte w tekście. Schematy i rysunki często po raz pierwszy powstały dla potrzeb tego podręcznika. Oceniany podręcznik zawiera dobrej jakości zdjęcia i pomysłowe schematy, odpowiednio dobrane do prezentowanych treści naukowych. Podkreślenie ważnych treści i definicji sprawia, że podręcznik może też pełnić funkcje encyklopedyczne w zakresie immunologii dla szerokiej rzeszy czytelników mniej zainteresowanych tą dziedziną wiedzy.

Jacek Bielecki  
 Instytut Mikrobiologii  
 Uniwersytet Warszawski



Autor: **Andrzej Jędrzejak**  
 Tytuł: **Biologiczne przetwarzanie odpadów**  
 Redaktor PWN: **Barbara Kobylńska**  
 Projektant okładki: **Joanna Sobieraj**  
 Wydawnictwo Naukowe PWN S.A.  
 Warszawa 2007  
 ISBN 978-03-01-15166-9

Gospodarka odpadami to ważna dziedzina gospodarki każdego nowoczesnego kraju. Dlatego prezentowana pozycja PWN jest obecnie jak najbardziej na miejscu. Szczególnie ważny jest fakt, że coraz częściej obserwowana ewolucja rynku paliwowego w kierunku surowców naturalnych pochodzenia roślinnego nabiera ostatnio dużego tempa. Jest oczywiste, że gospodarka odpadami w takiej sytuacji ma szczególne znaczenie. Poza tym przystąpienie Polski do Unii Europejskiej obliguje nasz kraj do znacznego ograniczenia składowanych odpadów komunalnych i ich przetwarzania.

Prezentowany podręcznik zawiera wszystkie możliwe informacje o problemach związanych z produkcją odpadów i ich racjonalną utylizacją. Można uznać, że jest to dobre uzupełnienie wiedzy z zakresu mikrobiologii przemysłowej czy biotechnologii, dotyczące problemów związanych z utylizacją odpadów. Bardzo dobrze stało się, że taki podręcznik powstał, a przede wszystkim ze względu na to, że stanowi źródło wiedzy m.in. dla biotechnologa na temat obowiązujących przepisów prawnych oraz zasad postępowania z odpadami.

Książka zawiera 14 rozdziałów, rozdzielonych na podrozdziały, które sensownie opisują przedstawione zagadnienia. Po wprowadzeniu, w którym autor zawarł cały sens stworzenia podręcznika, kolejne rozdziały zajmują się w logicznej sekwencji zagadnieniami związanymi biodegradacją. Na początku znajduje się przegląd obowiązujących przepisów i aktów prawnych. Następnie zawarto opis technologii opartych na bazie fermentacji. Dużo miejsca w podręczniku zajmują procesy związane z kompostowaniem odpadów i wynikające z tego technologie. Nie zabrakło też rozdziału oceniającego zagrożenia omawianych procesów dla środowiska, aczkolwiek rozdział ten należy uznać za zbyt lakoniczny.

Podręcznik zakończono przedstawieniem oryginalnych rozwiązań technicznych w zakresie fermentacji i kompostowania stosowanych przez konkretne firmy biotechnologiczne, działające aktualnie na rynku światowym. Każdy z rozdziałów kończy się spisem literatury wykorzystanej przy powstawaniu tekstu. Spis ten zawiera najczęściej prace publikowane po 2000 roku. Ciekawe zestawienie metodyki stosowanej podczas utylizacji odpadów na pewno wchodzi w zakres treści nauczania na kierunku biotechnologia w ramach przedmiotu biotechnologia w ochronie środowiska. Wiedza zawarta w podręczniku będzie także przydatna studentom z kierunku ochrona środowiska realizowanego na wszystkich typach szkół wyższych w kraju.

Jestem przekonany, że informacje zawarte w przedstawionym podręczniku na pewno przyczynią się do zrozumienia problemów istotnych dla współczesnego społeczeństwa w zakresie gromadzenia odpadów, pozwolą także na wybór optymalnej drogi prowadzącej do ich usuwania ze środowiska naturalnego.

Jacek Bielecki  
 Instytut Mikrobiologii  
 Uniwersytet Warszawski

Tytuł: **Chemia Środowiska**  
 Autorzy: **G.W. van Loon, S.J. Duffy**  
 Wydawnictwo: **Wydawnictwo Naukowe PWN S.A.**  
 Redaktor PWN: Małgorzata Galus  
 Projektant okładki: Stefan Szczypka  
 Warszawa 2007  
 ISBN 978-83-01-15324-3

Do rąk studentów, pracowników służb ochrony środowiska, nauczycieli trafia bardzo solidny i nowoczesny podręcznik dotyczący chemii środowiska. W pierwszym rozdziale Autorzy wprowadzają czytelników w podstawowe zagadnienia nowoczesnej chemii środowiska, w sposób bardzo skondensowany. W dalszych rozdziałach kolejno omawiają procesy chemiczne zachodzące w atmosferze, hydrosferze i środowisku lądowym. W części dotyczącej hydrosfery (część B) w rozdziale 15-tym omówione zostały procesy mikrobiologiczne i ich rola w cyklach biogeochemicznych węgla, azotu i siarki. W następnym rozdziale tej części jeden z podrozdziałów poświęcono procesom mikrobiologicznym przydatnym w oczyszczaniu ścieków. Część C poświęcona została środowisku lądowemu. W tej części Autorzy także nie ograniczają się do omówienia tylko procesów chemicznych. Bardzo sprawnie i w przystępny sposób potrafią wykaazać powiązania pomiędzy procesami biotycznymi i abiotycznymi.

W podręczniku znajdziemy również elementy toksykologii środowiskowej. Procesy chemiczne i biochemiczne zachodzące w środowisku są dobrze ilustrowane przykładami zjawisk/zdarzeń zachodzących w różnych rejonach świata, choć trudno oprzeć się wrażeniu, że niektóre przykłady są dobrane dość przypadkowo. Wyraźnie wskazano procesy zachodzące w sposób naturalny i te, które mają antropogeniczne korzenie.

W każdym rozdziale znajdziemy pytania w tekście oraz zestaw zadań na końcu, które pozwalają na skontrolowanie stopnia opanowania i zrozumienia zawartej w nim wiedzy.

Opanowanie materiału zawartego w podręczniku wymaga jednak podstawowej wiedzy z zakresu chemii ogólnej i organicznej oraz podstawowej znajomości biochemii. Na pewno nie jest to podręcznik dla studentów pierwszych lat studiów nawet na takim kierunku jak chemia.

Aleksandra Skłodowska  
 Pracownia Analizy Skażeń Środowiskowych  
 Uniwersytet Warszawski

Autor: **Ewa U. Kurczyńska i Dorota Borowska-Wykręt**  
 Tytuł: **Mikroskopia świetlna w badaniach komórki roślinnej. Ćwiczenia**  
 Redaktor PWN: **Irena Zienkiewicz**  
 Projekt okładki i stron tytułowych: **Edwin Radzikowski**  
 Wydawnictwo Naukowe PWN S.A.  
 Warszawa 2007  
 ISBN 978-83-01-15223-9

Z przyjemnością informuję o ukazaniu się wydanej przez Wydawnictwo Naukowe PWN książki Ewy U. Kurczyńskiej i Doroty Borowskiej-Wykręt zatytułowanej „Mikroskopia świetlna w badaniach komórki roślinnej. Ćwiczenia”.

Zaprezentowany w podręczniku program ćwiczeń z biologii komórki był przez wiele lat realizowany przez Autorki w Katedrze Biofizyki i Biologii Komórki Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego.

W recenzjonowanej pracy przedstawiono w prosty i zrozumiały sposób podstawy optyki, budowę i zasady działania i pracy z różnego typu mikroskopami optycznymi. W kolejnych rozdziałach Autorki omawiają techniki stosowane w mikroskopii klasycznej, kontrastowo-fazowej, fluorescencyjnej, polaryzacyjnej i polaryzacyjno-interferencyjnej. Każdy z rozdziałów kończy klarowny opis przykładowych technik wykorzystywanych w barwieniach stosowanych w danym dziale mikroskopii. W siódmym rozdziale zostały umieszczone dodatkowe informacje pozwalające na zapoznanie się czytelników z techniką laserowej mikroskopii konfokalnej, zasadami interpretacji oraz z podstawami obróbki zarejestrowanego obrazu mikroskopowego w prostych programach graficznych. Rozdział ten kończy opis podstawowych technik laboratoryjnych wykorzystywanych na ćwiczeniach. Pomocny jest również zawarty w rozdziale ósmym spis literatury umożliwiający dalsze samodzielne pogłębianie wiedzy przez czytelnika.

Teraz zaś czas na łyżkę dziegciu – niewypałem okazał się umieszczony na końcu rozdziału ósmego spis adresów internetowych. Internet jest szybko zmieniającym się medium i umieszczanie w drukowanej publikacji adresów często może się kończyć brakiem możliwości połączenia się z nieistniejącą już stroną. Ważne jest również umieszczanie prawidłowych bezbłędnych adresów, a budzącym uśmiech na twarzy przeoczeniem czujnej redakcji PWN jest obecność w omawianym spisie nawet łącza do pliku znajdującego się bezpośrednio na komputerze jednej z autorek.

Ta mała wpadka redakcyjna nie pomniejsza jednak wartości merytorycznej publikacji. Książka napisana jest w sposób przystępny. Każdy rozdział zawiera wprowadzenie definiujące opisaną technikę, a następnie przykłady jej zastosowania w postaci prostych dobrze opisanych przepisów umożliwiających samodzielne wykonanie doświadczenia. Tekst jest bogato ilustrowany, co znakomicie ułatwia zarówno wykonanie jak i interpretację wyników opisanej procedury barwień komórki. Poszczególne rozdziały mogą stanowić pełną treść ćwiczeń, które można wykonywać na zajęciach ze studentami.

Recenzowany podręcznik będzie bardzo przydatny dla studentów kierunków o profilu biologicznym do zajęć z budowy i biologii komórki roślinnej. Pomimo tego, że książka jest skierowana głównie dla botaników zapoznanie się z opisanymi w niej technikami i procedurami oraz ich zrozumienie pomoże badaczom innych specjalności w wykonaniu barwionych preparatów mikroskopowych.

Podsumowując otrzymaliśmy podręcznik do ćwiczeń, który można polecać jako pomoc w nauczaniu technik mikroskopii na zajęciach ze studentami oraz do wykorzystania w pracy samodzielnej.

Jarosław Wiśniewski  
Instytut Mikrobiologii  
Uniwersytet Warszawski

Uprzejmie informujemy PT Czytelników, że od września 2008 roku na stronie internetowej *Postępów Mikrobiologii* działa wyszukiwarka. Umożliwia ona odnajdywanie informacji zarówno w bieżących jak i archiwalnych zeszytach naszego pisma.

Redakcja i Administrator Strony Internetowej

---

## INFORMACJA

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów uprzejmie informuje, iż zgodnie z Uchwałą Walnego Zgromadzenia Delegatów z dnia 4.09.2008 r. **od dnia 01.01.2009 r.** ulega zmianie wysokość składki członkowskiej.

- Wysokość składki członkowskiej od 2009 roku wynosi **80 zł/rok**,
- Wysokość składki dla członków **Emerytów – 40 zł/rok**

Z opłacania składki członkowskiej zwolnieni są Członkowie Honorowi Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów.

### **SKŁADKI PROSIMY OPŁACAĆ DO KOŃCA I KWARTAŁU KAŻDEGO ROKU KALENDARZOWEGO**

#### **CZASOPISMA**

- W ramach składki otrzymają Państwo kwartalnik *Postępy Mikrobiologii* lub *Polish Journal of Microbiology* (prosimy o podanie wybranego czasopisma przy opłacaniu składki członkowskiej)
- Istnieje możliwość rocznej prenumeraty drugiego kwartalnika koszt 40 zł/rok (dla członków PTM).

Informujemy, iż od dnia 01.01.2009 roku ulega zmianie numer konta PTM.

#### **Od 01.01.2009 r. składki członkowskie należy wpłacać na konto:**

Nazwa posiadacza rachunku:

Polskie Towarzystwo Mikrobiologów, 00-725 Warszawa, ul. Chełmska 30/34

#### **Bank i numer konta:**

Bank Pekao S.A. **18 1240 5992 1111 0000 4774 7434**

---

## INSTRUKCJA DLA AUTORÓW PRAC PUBLIKOWANYCH W SUPLEMENTACH DO KWARTALNIKA POSTĘPY MIKROBIOLOGII

W celu ułatwienia publikowania w jednym miejscu artykułów o podobnej problematyce, *Postępy Mikrobiologii* wydawać będą w formie suplementów, następujące prace naukowe:

1. Referaty z sesji plenarnych Zjazdów naukowych, Konferencji naukowych oraz Sympozjów organizowanych staraniem Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów oraz Komitetu Mikrobiologii Polskiej Akademii Nauk. Manuskrypt pojedynczego referatu nie powinien przekraczać 25-ciu stron i powinien być przygotowany wg Informacji dla Autorów *Postępów Mikrobiologii*. Całość materiałów przygotowanych do jednego suplementu nie może przekraczać 150 stron maszynopisu.
2. Streszczenia przyjętych przez organizatorów referatów oraz doniesień prezentowanych na ww. Zjazdach naukowych, Konferencjach oraz Sympozjach. Streszczenie nie powinno przekraczać jednej strony maszynopisu i kończyć się nie więcej jak trzema pozycjami cytowanego piśmiennictwa.

W suplemente nie będą publikowane oryginalne prace doświadczalne prezentowane na ww. Zjazdach naukowych. Prace te po odpowiednim przygotowaniu, zgodnie z instrukcją dla autorów, można przysyłać do Redakcji *Polish Journal of Microbiology (Acta Microbiologica Polonica)* lub innego czasopisma naukowego.

Autorzy lub zamawiający suplement ponoszą pełny koszt jego opracowania oraz wydania. Możliwy jest druk czterech suplementów rocznie. Ponieważ materiały przeznaczone do suplementu nie są opracowywane oraz nie podlegają ocenie Zespołu Redakcyjnego *Postępów Mikrobiologii*, zamawiający suplement, tj. osoba upoważniona przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów lub Komitet Mikrobiologii PAN, bierze całkowitą odpowiedzialność za redakcję oraz wartość merytoryczną suplementu. Wydanie suplementu powinno być poprzedzone jego akceptacją przez Zespół Redakcyjny *Postępów Mikrobiologii*.

---

**Redakcja nie ponosi odpowiedzialności za treść reklam i ogłoszeń**

---

### ***Oferta Reklamy***

*Postępy Mikrobiologii* udostępni w każdym numerze kilka stron (łącznie z wewnętrznymi stronami okładek) **reklamie**.

Pismo nasze dociera co kwartał do kilku tysięcy odbiorców. Są wśród nich specjaliści różnych dziedzin mikrobiologii, pracujący jako nauczyciele wyższych uczelni, szkół średnich oraz pracownicy naukowcy instytutów badawczych, biotechnologii oraz lekarze. Dużą grupę naszego pisma stanowią studenci.

**Cena ogłoszenia czarno-białego wewnątrz numeru wynosi:**

**1/2 strony 250,- zł**

**cała strona 500,- zł**

**Proponujemy również ogłoszenia kolorowe – cena do uzgodnienia.**

Teksty opracowanych graficznie reklam proszę składać na adres Redakcji *Postępów Mikrobiologii*, 02-007 Warszawa, ul. Oczki 3, tel. 628 08 22.

---

## Spis treści

T. Gośliński, K. Konopka, J. Piskorz, M. Kryjewski, M. Wierzchowski, S. Sobiak – Perspektywy zastosowania fotodynamicznej terapii skierowanej przeciw mikroorganizmom – PACT .....	447
R. Wolinowska – Plazmidy <i>Archaea</i> .....	457
A. Sikora – Produkcja wodoru w procesach prowadzonych przez drobnoustroje ....	465
D. Wojnicz – Wpływ stężeń podprogowych (sub-MICs) antybiotyków na osłony powierzchniowe bakterii Gram-ujemnych .....	483
A. Krutkiewicz, D. Klimuszko – Mechanizmy oporności pałeczek <i>Campylobacter</i> spp. na chemioterapeutyki.....	489
K. Fijałkowski, D. Czernomysy-Furowicz, M. Ferlas – <i>Staphylococcus aureus</i> kontra układ immunologiczny .....	497
J. Wójkowska-Mach, J. Witalis, A.B. Macura, P.B. Heczko – Mikrobiologia lekarska na Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie – wczoraj i dziś....	505
A. Ciepierska, M. Czerska – Profesor Rudolf Stefan Weigl (1883–1957) .....	511
Informacje, komunikaty, recenzje .....	515

## Contents

T. Gośliński, K. Konopka, J. Piskorz, M. Kryjewski, M. Wierzchowski, S. Sobiak – Prospects for Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy – PACT .....	447
R. Wolinowska – Archaeal Plasmids .....	457
A. Sikora – Hydrogen production by microorganisms .....	465
D. Wojnicz – The effect of subinhibitory concentrations (sub-MICs) of antibiotics on the external surface of Gram-negative bacteria .....	483
A. Krutkiewicz, D. Klimuszko – Mechanisms of resistance of <i>Campylobacter</i> spp. to antimicrobial agents .....	489
K. Fijałkowski, D. Czernomysy-Furowicz, M. Ferlas – <i>Staphylococcus aureus</i> versus the immune system .....	497
J. Wójkowska-Mach, J. Witalis, A.B. Macura, P.B. Heczko – Medical microbiology at Jagiellonian University in – Kraków modern and historical perspective .....	505
A. Ciepierska, M. Czerska – Professor Rudolf Stefan Weigl (1883–1957) .....	511
Information, new reports, book reviews .....	515