

Kwartalnik

**Tom 48**

**Zeszyt 2 • 2009**

CODEN:

PMKMAV 48 (2)

2009

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 (Warszawski Uniwersytet Medyczny), 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

Punktacja za publikację naukową wg MNiSW  
4.0

Index Copernicus ICV = 3,16 (2008)

ISBN 978 - 83 - 923731 - 3 - 1

*Na okładce:* Konidiofor *Aspergillus* sp. (fot. Jarosław Wiśniewski, Instytut Mikrobiologii UW).

*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 arkuszy 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

### **Profesor Piotr Słonimski (9 XI 1922 – 25 IV 2009)**

Doktor honoris causa Uniwersytetu Wrocławskiego, uhonorowany Złotym Medalem uczelni. Emerytowany profesor paryskiego Uniwersytetu Pierre et Marie Curie. Światowej sławy biolog, wybitny genetyk, twórca genetyki mitochondrialnej. Absolwent Gimnazjum Stefana Batorego, student medycyny na tajnych kompletach. Żołnierz Armii Krajowej i uczestnik powstania warszawskiego. Doktorat z medycyny uzyskał w 1947 r. na UJ, a doktorat z nauk przyrodniczych na Sorbonie w 1952 r. Pracował naukowo we Francji od 1947 r. Kierownikiem Zakładu w CNRS został w 1954 r. Stworzył w 1971 r. Centrum Genetyki Molekularnej CNRS w Gif-sur-yvette pod Paryżem, którym kierował ponad 20 lat, a od 1992 r. był jego dyrektorem honorowym. Dyrektor francuskich zespołów badań nad genomami. Pasjonował się mitochondriami, w tej dziedzinie był wielkim autorytetem. Jego zespół odkrył niezależny od jądra zestaw genów mitochondrialnych i zasady rządzące ich dziedziczeniem. W ostatnich latach poświęcił się genomice teoretycznej i formalnej analizie języka genomów, publikując nowatorskie prace z matematykami UW. Był członkiem Francuskiej Akademii Nauk i Académie Européenne, członkiem zagranicznym Królewskiej Belgijskiej Akademii Nauk, Niemieckiej Akademii Nauk, Polskiej Akademii Nauk oraz Amerykańskiej Akademii Sztuk i Nauk, a i innych. Uhonorowany doktoratem także przez Uniwersytet Warszawski i w Bratysławie oraz Uniwersytet w Louvain. W 1984 r. otrzymał Legię Honorową, rok później najwyższe odznaczenie naukowe we Fran-



cji – Złoty Medal CNRS. W czasie stanu wojennego w Polsce wspomagał opozycję. Współzałożyciel stowarzyszenia Solidarność Francja Polska. W latach 90. był współorganizatorem i patronem polsko-francuskiego programu studiów doktoranckich w biologii molekularnej. Pogrzeb Profesora odbył się 5 maja na cmentarzu w Gif-sur-yvette pod Paryżem.

### **WSPOMNIENIE**

**25 kwietnia 2009 roku o godzinie 17:00 zmarł Profesor paryskiej Sorbony Piotr P. SŁONIMSKI, wielki przyjaciel Instytutu Genetyki i Mikrobiologii i Uniwersytetu Wrocławskiego.**

Profesor Piotr P. Słonimski urodził się 9 listopada 1922 roku w Warszawie w rodzinie o tradycjach patriotycznych i legionowych. W czasie okupacji niemieckiej – początkowo jako żołnierz Szarych Szeregów a następnie jako podchorąży związany z „Agrykolą” – należał do grup specjalnych Kedywu Okręgu Warszawskiego Armii Krajowej. Brał udział w Po-

wstaniu Warszawskim w „Zgrupowaniu Baszta” na Mokotowie. Odznaczony został Krzyżem Walecznych. W latach 1945–1947 pracował jako asystent w Zakładzie Embriologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, gdzie ukończył studia i otrzymał dyplom doktora nauk medycznych. W tym okresie był też w Krakowie więźniem politycznym sowieckich służb specjalnych.

W roku 1947 dzięki pomocy stryja, poety Antoniego Słonimskiego, wyjechał na stałe do Francji i rozpoczął pracę naukową, początkowo w Instytucie Biologii Fizyko-Chemicznej w Paryżu, a potem w Laboratorium Genetyki Fizjologicznej CNRS w Gif-sur-Yvette pod Paryżem i na Uniwersytecie Piotra i Marii Curie w Paryżu. W ośrodkach tych przeszedł wszystkie szczeble kariery naukowej i w roku 1952 otrzymał stopień doktora nauk przyrodniczych, a w 1966 tytuł profesora Sorbony. W 1971 roku został dyrektorem Centrum Genetyki Molekularnej CNRS w Gif-sur-Yvette, a od 1992 roku pełnił funkcję honorowego dyrektora tego Instytutu. Od 1972 roku był wiceprezydentem, a od 1984 roku pełnił funkcję prezydenta Międzynarodowych Konferencji Genetyki i Biologii Molekularnej Drożdży. W latach 1992–1997 pełnił funkcje prezydenta i dyrektora generalnego Komitetu Naukowego Badań Genomów Ministerstwa Nauki i Przestrzeni we Francji. Od 1983 roku był korespondentem, a od 1985 roku członkiem Francuskiej Akademii Nauk. Ponadto Piotr Słonimski był również członkiem zagranicznym Belgijskiej Królewskiej Akademii Nauk i Sztuk Pięknych, członkiem Niemieckiej Akademii Nauk, członkiem zagranicznym Polskiej Akademii Nauk, członkiem Polskiej Akademii Umiejętności, członkiem zagranicznym Amerykańskiej Akademii Nauk i Umiejętności, członkiem Akademii Europejskiej, a także członkiem licznych rad i komitetów, takich jak Rada EMBO, Komitet Biologii Molekularnej i Delegatury Generalnej Badań Naukowych i Techniki, Rada Naukowa Instytutu Narodowego Zdrowia i Badań Medycznych, Rada Naukowa Ligi Narodowej Przeciwno Rakowi, Rada Naukowa Uniwersytetu Piotra i Marii Curie, Rada Naukowa Instytutu Pasteura, Rada Naukowa Centrum Narodowego Badań Naukowych CNRS, Międzynarodowa Rada Baz Danych Sekwencji Genomów. Pełnił również etatową funkcję eksperta naukowego Komitetu Biotechnologicznego przy Unii Europejskiej w Brukseli.

Swoje zainteresowania naukowe Piotr Słonimski wiązał ściśle z genetyką mitochondrialną i biochemią drożdży. W dorobku naukowym miał ponad 300 publikacji w renomowanych czasopismach naukowych, takich jak *Cell*, *Nature* i *EMBO Journal*. Jako jeden z głównych naukowych ekspertów Unii Europejskiej kierował programami badawczymi finansowanymi przez UE. Obok profesora A. Goffeau z Belgii był jednym z głównych organizatorów Projektu Systematycznego Sekwencjonowania Genomu Drożdży. Był też koordynatorem Międzynarodowego Programu Unii Europejskiej EUROFAN dotyczącego analizy funkcjonalnej genomu komórki drożdżowej. Profesor Piotr Słonimski pracował w komitetach redakcyjnych kilku czasopism naukowych: *Molecular and General Genetics*, *Methods in Molecular and Cellular Biology*,

*European Journal of Biochemistry*, *Biology of the Cell*, *Biochimie* oraz *Current Genetics*. Był organizatorem licznych Międzynarodowych Konferencji i Kongresów Naukowych. Od 1962 do 2008 roku przeprowadził ponad 200 wykładów i seminariów w ośrodkach naukowych na całym świecie. Za swoje wybitne osiągnięcia naukowe kilkakrotnie był nominowany do nagrody Nobla. Za zasługi dla Francji w 1984 roku został kawalerem Francuskiej Legii Honorowej, w 1992 roku oficerem Francuskiego Orderu Zasługi, a w 1993 roku odznaczono Go Krzyżem Komandorskim z Gwiazdą Orderu Zasługi Rzeczypospolitej Polskiej. Otrzymał też medal złoty CNRS-u oraz medal złoty i prestiżową nagrodę Hansena Duńskiej Akademii Nauk, nagrodę Charlesa Leopolda Mayera Akademii Nauk, nagrodę Marie Guido Triossi Akademii Nauk, nagrodę Fundacji Luis Rapkine, medal Grzegorza Mendla Towarzystwa Genetycznego Wielkiej Brytanii, nagrodę „Jurzykowskich Fundation”. Ponadto, był laureatem nagród im. Andrzeja Drawicza i Premiera Rzeczypospolitej Polskiej. Otrzymał tytuł doktora honoris causa Uniwersytetu Louvain-la-Neuve w Belgii, Uniwersytetu Bratysławskiego i Uniwersytetu Warszawskiego (w 1992 roku). Pośmiertnie odznaczony został Krzyżem Komandorskim z Gwiazdą *Polonia Restituta* przez Prezydenta Rzeczypospolitej Polskiej Lecha Kaczyńskiego.

Należy podkreślić fakt, że na wniosek prof. T.M. Lachowicza, pierwszego Dyrektora Instytutu Mikrobiologii Wydziału Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Wrocławski jako pierwszy nadał Piotrowi Słonimskiemu, Profesorowi Sorbony, godność doktora honoris causa za jego zasługi na polu genetyki i współpracy naukowej pomiędzy Francją i Polską. Niestety, z przyczyn politycznych związanych z działalnością Jego stryja Antoniego Słonimskiego, który w tym czasie protestował przeciwko zmianom w konstytucji PRL, cała uroczystość wręczenia tego zaszczytnego tytułu naszego Uniwersytetu została wyciszona i odbyła się 28 lutego 1976 roku bardzo skromnie, za zamkniętymi drzwiami w Instytucie Antropologii (zdjęcie z Archiwum Uniwersytetu w załączeniu). Na wniosek młodszego już pokolenia pracowników Instytutu Genetyki i Mikrobiologii, tych którzy przebywali na stażach naukowych w Gif-sur-Yvette we Francji lub współpracowali z Profesorem, podjęto starania, aby nagłośnić ten honorowy doktorat i okazać szacunek oraz wdzięczność Profesorowi. 1 października 1998 roku w Auli Leopoldyńskiej Uniwersytetu Wrocławskiego, podczas uroczystego *Gaudeamus* 1998/1999 z udziałem Premiera RP Jerzego Buzka, Profesor Piotr Słonimski został uhonorowany Złotym Medalem za Zasługi dla Uniwersytetu Wrocławskiego.

Współpraca Profesora Piotra Słonimskiego z Katedrą Mikrobiologii, a później z Instytutem Genetyki

i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego, datuje się od 1960 roku. Dzięki niej Profesor wprowadził 3 pokolenia pracowników naszego Instytutu w tematykę badań *in vitro* i *in silico* w zakresie genetyki drożdży. Wielokrotnie zapraszał do swojego ośrodka naukowego w Gif-sur-Yvette pracowników naukowych i doktorantów Instytutu Mikrobiologii na krótkie i długoterminowe staże naukowe. Ponadto, aktywnie popierał uczestnictwo naszych pracowników i doktorantów w międzynarodowych kursach, szkoleniach i konferencjach naukowych. Ta bezpośrednia i bardzo owocna współpraca pomiędzy obydwoimi ośrodkami naukowymi trwała bardzo długo, czego dowodem są liczne wspólne publikacje.

Na szczególną uwagę zasługuje Jego światowy autorytet naukowy, głęboka wiedza i chęć niesienia pomocy innym. Po ogłoszeniu w Polsce stanu wojennego, Profesor Słonimski był organizatorem i przewodniczącym francuskiego towarzystwa *Solidarite France – Pologne* wspomagającego naukę polską i niepodległościowy ruch związkowy w Polsce. W czasie stanu wojennego i trudnych finansowo dla kraju latach, Profesor za pośrednictwem Komitetu Stypendialnego fundował liczne stypendia naukowe dla młodych pracowników naukowych, przeważnie doktorantów. Przekazywał aparaturę i finansował zakup literatury naukowej oraz odczynników chemicznych, zarówno do badań, jak i do celów dydaktycznych.

Profesor Piotr Słonimski był gorącym patriotą. Zawsze wykazywał bardzo żywe zainteresowanie sprawami naszego kraju, Uniwersytetu, Instytutu, pracowników i studentów. W minionych latach kilkakrotnie przyjeżdżał do Wrocławia, wygłaszał wykłady i brał udział w seminariach oraz w konferencjach naukowych organizowanych przez Instytut Mikrobiologii i Polskie Towarzystwo Genetyczne. Dzięki Niemu, Zakład Genetyki Instytutu Mikrobiologii, obok Instytu-

tu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, brał czynny udział w międzynarodowym programie EUROFAN, związanym z analizą funkcjonalną genów komórki drożdżowej. Obok wymiernych korzyści materialnych wynikających z tej współpracy, pracownicy Instytutu Genetyki i Mikrobiologii osiągnęli również niewymierne korzyści nawiązując nowe kontakty międzynarodowe i zdobywając cenne doświadczenie w pracy naukowej. Jego osoba przyczyniła się również do nawiązania trwającej po dzień dzisiejszy ścisłej oraz owocnej współpracy naukowej pomiędzy IBB PAN w Warszawie a naszym Instytutem. Profesor, pomimo licznych obowiązków i bardzo napiętego programu, podczas każdej wizyty zawsze znajdował czas na bezpośrednie dyskusje i omówienie wyników naszych badań. Na moje zaproszenie i propozycję przyjazdu do Wrocławia w styczniu lub w lutym bieżącego roku odpowiedział, że ze względu na wiek nie lubi podróżować w zimie. Niestety, zaplanowana wstępnie na czerwiec Jego wizyta w naszym Instytucie i wykład w zakresie genomiki teoretycznej już się nie odbędą. Ale przecież mieliśmy ogromne szczęście i zaszczyt, że dane nam było spotkać Go na swojej drodze życia.

**Drogi Profesorze, smutny to obowiązek pisać o Tobie w czasie przeszłym, ale zapewniam, że będzie nam bardzo brakowało Twojej życzliwości, znakomitego humoru, cennych rad i wspólnych dyskusji na różnorodne tematy oraz zainteresowania naszymi sprawami. Dziękuję, że przekazałeś nam pasję naukową odkrywania tajemnicy życia prostej komórki eukariotycznej.**

**Będziemy o Tobie pamiętać.**

*Stanisław Ułaszewski*

*Za zgodą Przeglądu Uniwersyteckiego (Uniwersytet Wrocławski) Nr 5, 31–39, maj 2009.*



**Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka\*, Jakub Rybacki, Anna Maria Łasica**

Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii Uniwersytetu Warszawskiego  
02-096 Warszawa, ul. Miecznikowa 1

Wpłynęło w lutym 2009 r.

1. Wstęp. 2. *Bacillus anthracis*. 2.1. Charakterystyka patogenu. 2.2. Toksyna węglিকা – budowa oraz mechanizm działania. 2.3. Terapie przeciw-toksynowe dla toksyn węglিকা. 2.3.1. Terapie blokujące wnikanie toksyny 2.3.1.1. Bierna immunizacja. 2.3.1.2. Zastosowanie „wabików” (Decoy Based Technology). 2.3.1.3. Cisplastyna – terapia blokująca proces endocytozy. 2.3.2. Terapie hamujące zdarzenia wewnątrzkomórkowe. 2.3.2.1  $\beta$ -cyklodekstryny i ich pochodne – strategia zablokowania procesu translokacji czynników LF i EF do cytozolu. 2.3.2.2. Inhibitory aktywności enzymatycznej podjednostki LF. 2.3.2.3. Celasterol – zahamowanie lizy komórek. 3. *Clostridium botulinum*. 3.1. Charakterystyka patogenu. 3.2. Budowa i mechanizm działania toksyny. 3.3. Terapie. 3.3.1. Immunoterapia. 3.3.2. Nowe leki przeciw-botulinowe. 3.3.2.1. Potencjalne strategie blokujące wiązanie toksyny BoNT do komórek docelowych. 3.3.2.2. Blokowanie aktywności metaloproteazowej. 4. Podsumowanie

#### **Novel strategies for antibacterial drug discovery – antitoxin drugs**

**Abstract:** Botulinum toxin and *B. anthracis* are classified by CDC and NIAD as “Category A selected agents and toxin”. So far, the only used medical treatment against botulism and anthrax are antibiotics and immunotherapy. The development of effective BoNT and anthrax toxin inhibitors must be based on the understanding of their action: interaction between specific receptors and toxins, protein translocation into eukaryotic cytosol, substrate binding and enzymatic specificities. This article presents data about anthrax toxin and botulinum neurotoxin structure and mechanisms of their action. Moreover recent accomplishments in antitoxin drugs design, focusing mainly on drugs inhibiting toxin binding to target cells and drugs inhibiting toxin enzymatic activities are reviewed.

1. Introduction. 2. *Bacillus anthracis*. 2.1 Pathogen description. 2.2. Anthrax toxin – structure and mechanism of action. 2.3. Antitoxin therapies. 2.3.1. Antagonists of toxin binding to target cells. 2.3.1.1. Passive immunization. 2.3.1.2. Decoy Based Technology. 2.3.1.3. Cisplatin – inhibition of endocytosis. 2.3.2. Inhibition of intracellular action of the anthrax toxin. 2.3.2.1  $\beta$ -cyclodekstrins and their derivatives – inhibition of LE and EF translocation process. 2.3.2.2. Inhibition of the LF anthrax toxin enzymatic activity. 2.3.2.3. Celasterol – inhibition of intoxicated cell lysis. 3. *Clostridium botulinum*. 3.1. Pathogen description. 3.2. Botulinum neurotoxin-structure and mechanism of action. 3.3 Therapies. 3.3.1 Immunotherapy. 3.3.2. Novel anti-botulinum neurotoxin drugs. 3.3.2.1. Potential antagonists of BoNT in the process of binding to target cells. 3.3.2.2. Inhibition of the BoNT metalloprotease activity. 4. Summary

**Słowa kluczowe:** *Bacillus anthracis*, *Clostridium botulinum*, inhibitory, toksyna botulinowa, toksyna węglikowa

**Key words:** anthrax toxin, *Bacillus anthracis*, botulinum neurotoxin, *Clostridium botulinum*, inhibitors

## **1. Wstęp**

Egzotoksyny są wytwarzane przez wiele drobno-ustrojów patogennych, zarówno bakterie Gram-dodatnie jak i Gram-ujemne i stanowią istotne czynniki wirulencji. Zarówno nomenklatura jak i klasyfikacja egzotoksyn jest bardzo zagmatwana i często niejednoznaczna.

Ogólnie akceptowalny podział toksyn klasyfikuje je do trzech grup przyjmując jako kryterium mechanizm ich działania. Typ I to toksyny wiążące się do powierzchni komórek układu immunologicznego. Nie są one internalizowane i wywołują nadmierną aktywność produkcji cytokin. Do tego typu toksyn zaliczamy białka o charakterze superantigenów. Typ II to toksyny modyfikujące strukturę osłon komórek eukariotycznych (fosfolipazy, toksyny wbudowujące się w osłony

komórek), co powoduje ich destabilizację. Typ III to toksyny AB składające się z podjednostki wiążącej się z receptorem komórkowym (B) oraz podjednostki o aktywności enzymatycznej (A) wnikające do komórek eukariotycznych (głównie na drodze endocytozy) i wpływające na wiele szlaków sygnalizacyjnych.

Lawinowo narastająca liczba szczepów bakteryjnych opornych na antybiotyki stosowane aktualnie w leczeniu ludzkich chorób zakaźnych wymusza poszukiwania nowych strategii terapeutycznych. Stało się to możliwe dzięki poznaniu szczegółów mechanizmu działania wielu toksyn, rozpoznawanych przez nie receptorów i ich celów działania oraz wyznaczeniu struktur trzeciorzędowych wielu toksyn. Prezentowana praca przedstawia nowe opracowywane strategie terapeutyczne, które prawdopodobnie w niedługim czasie

\* Autor korespondencyjny: e-mail: [kjkryn@biol.uw.edu.pl](mailto:kjkryn@biol.uw.edu.pl); tel.

znajdą zastosowanie w leczeniu węglik i zatruc toksyną botulinową wydzielaną przez *Clostridium botulinum*. Zainteresowanie tymi toksynami wynika z faktu możliwości ich użycia w terapiach wielu chorób, w tym chorób nowotworowych. Jednocześnie istnieje potencjalna możliwość użycia przetrwalników *Bacillus anthracis* oraz toksyny botulinowej w atakach bioterorystycznych. *B. anthracis* oraz toksyna botulinowa zostały zaliczone do kategorii A czynników broni biologicznej – dane CDC (Center for Disease Control and Prevention) and NIAD (National Institute of Allergy and Infectious Diseases).

## 2. *Bacillus anthracis*

### 2.1. Charakterystyka patogenu

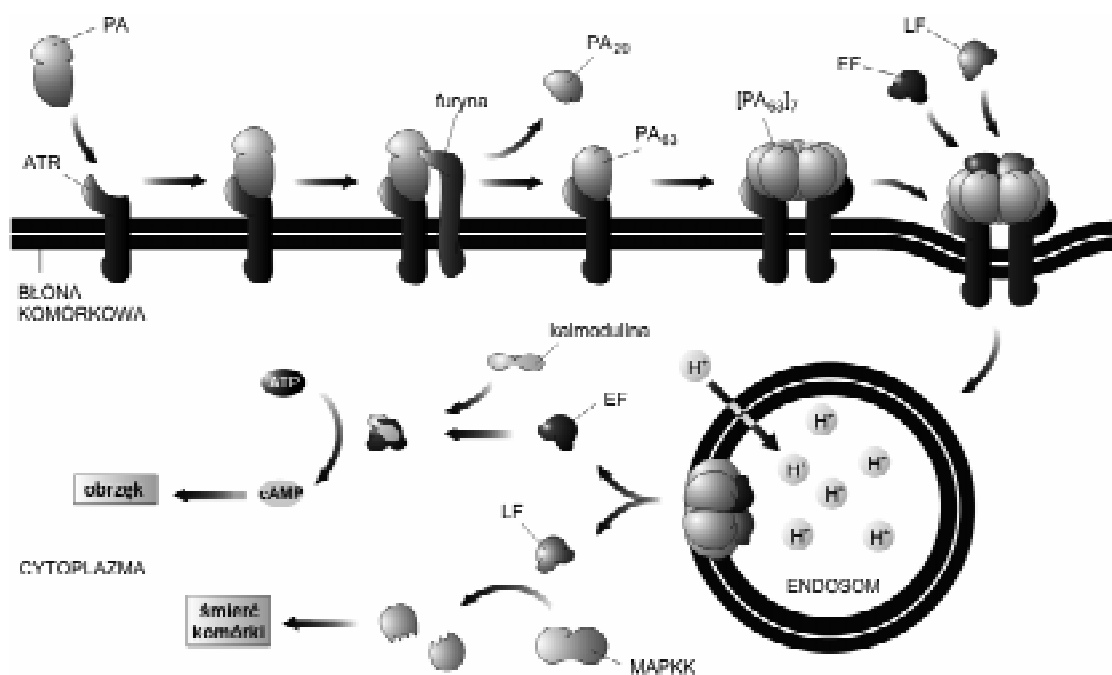
*Bacillus anthracis* jest Gram-dodatnią, wytwarzającą przetrwalniki względnie tlenową bakterią występującą w środowisku naturalnym dość powszechnie. Spory są bardzo odporne na działanie czynników środowiska a także upływ czasu. Mogą w glebie przetrwać przez lata. *B. anthracis* jest przede wszystkim patogenem zwierząt, głównie bydła i owiec. Do naturalnych infekcji ludzi dochodzi stosunkowo rzadko. Na zakażenie narażeni są głównie ludzie z grup podwyższonego ryzyka, w tym wypadku weterynarze oraz rolnicy. Dosyć często do zakażeń dochodzi np. u osób strzygących owce, ponieważ spory węglik utrzymują się długo w sierści zwierząt. U ludzi *B. anthracis* wywołuje trzy rodzaje objawów chorobowych w zależności od drogi zakażenia: postać skórą, płucną i gastryczną. W każdym przypadku do zakażenia dochodzi poprzez wniknięcie przetrwalników do ludzkiego organizmu, infekcja formami wegetatywnymi patogenu nie wywołuje objawów chorobowych [35]. Ponad 90% odnotowywanych naturalnie wywołanych przypadków chorobowych to postaci skórne węglik, które są uleczalne w wypadku szybkiego rozpoznania i zastosowania terapii antybiotykowej. Postać płucna charakteryzuje się wysoką śmiertelnością. Po inhalacji przetrwalniki wnikają do makrofagów komórek płucnych, które stanowią „wehikuł” roznoszący je po organizmie. Spory przeżywają proces fagocytozy. Wewnątrz makrofagów, głównie w węzłach chłonnych, dochodzi do kiełkowania przetrwalników, wytwarzania dużej liczby wegetatywnych komórek, produkujących czynniki wirulencji. Pierwsze objawy zakażenia, podobne do objawów grypy, nie są łatwo rozpoznawalne, co utrudnia szybkie postawienie właściwej diagnozy. W stosunkowo niedługim czasie od zakażenia dochodzi do wystąpienia objawów posocznicy, uszkodzenia wielu organów i śmierci. Nawet przy zastosowaniu intensywnej opieki lekarskiej i terapii antybiotykowej

śmiertelność w wypadku formy inhalacyjnej węglik sięga ponad 50%. *B. anthracis* jest uznawany za najgroźniejszą aktualnie broń biologiczną z możliwością użycia w ataku bioterorystycznym. Bakteria ta została zaklasyfikowana przez CDC i NIAD do kategorii A broni biologicznej, do której zaliczane są patogeny wywołujące śmiertelne, łatwo rozprzestrzeniające się choroby. Kryteria brane pod uwagę przy klasyfikacji drobnoustrojów i ich produktów jako broni biologicznej oraz ocenie ich potencjalnego zastosowania są różnorodne np. niska dawka infekcyjna, możliwość produkcji w formie aerozolu, niskie koszty produkcji i magazynowania, stabilność w środowisku, brak skutecznej szczepionki i/lub leku, brak przeszkolonego personelu medycznego. Po ataku terrorystycznym z 11 września 2001 roku odnotowano w USA 11 przypadków zachorowań (5 śmiertelnych) [36].

### 2.2. Toksyna węglik – budowa oraz mechanizm działania

*Bacillus anthracis* zawiera dwa plazmidy pOX1 oraz pOX2 o wielkości odpowiednio 182 oraz 96 kbp. Pierwszy z nich zawiera wyspę patogenności, która niesie informację genetyczną dotyczącą syntezy toksyny, drugi koduje białka warunkujące syntezę otoczki zbudowanej z poly- $\gamma$ -D-glutaminianu. Otoczka chroni patogen przed działaniem czynników komplementu surowicy krwi oraz przed fagocytozą. W testach laboratoryjnych wykazano, że szczepy węglik pozbawione obu plazmidów, pOX1 oraz pOX2, tracą wirulencję. Najważniejszym czynnikiem wirulencji węglik są toksyny należące do grupy toksyn AB. *B. anthracis* wytwarza dwie toksyny zawierające tą samą podjednostkę odpowiedzialną za rozpoznanie receptorów (podjednostka B), ale różne podjednostki A. Są to: toksyna letalna LeTx (zawierająca czynnik LF – Lethal Factor) oraz toksyna obrzęku EdTx (zawierająca czynnik EF – Edema Factor) [35]. Podjednostką B, która ma za zadanie rozpoznać receptor na powierzchni komórki, jest polipeptyd PA zwany antygenem protekcyjnym PA (Protective Antigen) [35]. Trzy podjednostki toksyn, zaopatrzone w sekwencje sygnałowe są niezależnie transportowane przez osłony komórki bakteryjnej do środowiska a proces składania dojrzałej toksyny węglik ma miejsce na powierzchni komórki eukariotycznej (Rys. 1). Podjednostka PA ma masę cząsteczkową 83 kDa i w tej nieaktywnej formie łączy się z receptorami komórkowymi: TEM8 (Tumor Endothelial Marker 8) inaczej określanym jako ANTRAX1 oraz CMG2 (Capillary Morphogenesis Protein 2) nazywany też ANTRAX2. Obydwa eksprymowane są na powierzchni wielu typów komórek w tym komórek układu odpornościowego [23]. Choć obydwie receptory wiążą PA poprzez 200 aminokwasowy, zewnątrz-





Rys. 1. Mechanizm procesowania i działania toksyny *Bacillus anthracis* (szczegółowe objaśnienia w tekście).

MAPKK – kinaza kinaz aktywowanych przez miogeny, ATR – receptor dla antygeny ochronny (anthrax toxin receptor),

EF – czynnik obrzęku (edema factor), LF – czynnik letalny (lethal factor), PA – antygeny ochronny (protective antigen).

Za zgodą Wydawnictwa Naukowego PWN na wykorzystanie rysunku

komórkowy odcinek białka – domenę VWA (van Wil-lebrand factor A) to domena VWA ANTRAX2 wykazuje 1000-krotnie wyższe powinowactwo do PA niż domena ANTRAX1. Prawdopodobnie receptor ten pełni główną rolę *in vivo* [48]. PA (83 kDa) połączony z receptorem podlega modyfikacji przez komórkową proteazę o aktywności furyny do cząsteczki o masie 63 kDa, poprzez odcięcie 20 kDa N-końcowego fragmentu białka [37]. Tak zaktywowana forma PA<sub>63</sub> pozostająca związana z receptorem jest zdolna do oligomeryzacji. Asocjacja monomerów PA<sub>63</sub> przebiega spontanicznie. Podczas tego procesu dochodzi do oddziaływań pomiędzy domenami 1 i 2 jednego monomeru a domenami 2 i 3 przylegającego monomeru. Na powierzchni komórki docelowej tworzone są heptamery PA (PA<sub>7mer</sub>) tzw. preporę. Struktura utworzonej przez heptamer preporę przypomina struktury budowane w osłonach bakterii gramujemnych przez białka należące do rodziny autotransporterów [22]. Do tej struktury przyłączają się podjednostki A – EF i/lub LF. EF i LF współzawodniczą o miejsca wiązania. PA<sub>7mer</sub> oddziałuje z N-końcowym (255 aminokwasów), homologicznym fragmentem obu białek. Każda podjednostka A łączy się z dimerem PA<sub>63</sub>, co w rezultacie daje 3 podjednostki toksyny na preporę [35]. Dojrzała toksyna podlega procesowi endocytozy w pęcherzykach okrytych klatryną. W procesie internalizacji toksyny biorą udział błonowe tratwy lipidowe błon komórkowych. W pęcherzyku endosomalnym pod wpływem niskiego pH następuje zmiana konformacji podjed-

nostek PA, które wbudowane w błonę endosomu, tworzą dojrzałą porę. Następnym etapem intoksykacji komórki to translokacja LF i/lub EF do cytozolu. Uwolnione podjednostki EF oraz LF przejawiają swoją aktywność enzymatyczną, co prowadzi do śmierci komórki. Czynnik EF (89 kDa), będący zależną od kalmoduliny cyklazą adenylanową, powoduje podniesienie poziomu cAMP w komórce, co doprowadza do rozregulowania gospodarki wodnej w komórce. Dodatkowo ma miejsce usunięcie kalmoduliny dostępnej w komórce, ważnego wtórnego przekaźnika informacji. Czynnik LF (90 kDa) jest zależną od cynku metaloproteazą, której celem działania są kinazy MAPK (MAPKK) odpowiedzialne za przekazywanie sygnałów w komórce (Rys. 1) [2].

### 2.3. Terapie przeciw-toksynowe dla toksyny węglikowej

Poznanie w ostatnich latach szczegółów dotyczących mechanizmu składania dojrzałej toksyny, mechanizmów działania podjednostek A, w szczególności ustalenie struktur trzeciorzędowych wszystkich trzech podjednostek [18, 38, 39] oraz zidentyfikowanie receptorów toksyny [9, 46] zintensyfikowało badania mające na celu opracowanie nowych metod zwalczania zakażeń węglikiem. Skuteczne metody leczenia będą z dużym prawdopodobieństwem strategiami blokującymi proces składania dojrzałej toksyny, proces wnikania toksyny do komórek eukariotycznych, proces translokacji podjednostek A do cytozolu lub blokującymi

ich aktywności enzymatyczne. Badania skuteczności nowych terapii prowadzone są z wykorzystaniem różnych linii komórkowych lub na modelach zwierzęcych. Stosowane do badań linie komórkowe to przede wszystkim makrofagopodobne linie mysie RAW 264.7 oraz J774A.1. Toksyna dodawana jest do podłoża hodowlanego. Często stosowanym białkiem jest zmodyfikowana toksyna LeTx, której N-koniec jest połączony z katalityczną domeną łańcucha A toksyny błoniczej (PA/LF<sub>N</sub>-DTA). Chimeryczne białko jest toksyczne dla komórek linii CHO-K1 (linia epitelialnych komórek jajnika chomika chińskiego) a jego mechanizm wnikania jest zależny od aktywności podjednostki PA toksyny węgla [47]. Przy analizie blokowania aktywności enzymatycznej czynnika LF często używaną strategią jest dodawanie do hodowli linii komórkowych rekombinowanych, oczyszczonych białek PA i LE w odpowiedniej proporcji. Najczęściej stosowane w badaniach *in vivo* zwierzęta to szczury F344, myszy BALB/c jak również króliki. W przypadku modeli zwierzęcych do badań *in vivo* toksyna lub endospory wstrzykiwane są podskórnie lub dożylnie.

Białko PA jest bardzo silnym immunogenem, przeciwciała przeciw-PA wykazują efekt ochronny. Jedyną dopuszczoną do użycia szczepionką przeciwko węglikowi jest szczepionka AVA (BioThrax), zawierająca antygen protekcyjny otrzymany z nadsączu hodowli. Jest to szczepionka bezpieczna i skuteczna, zarejestrowana w Stanach Zjednoczonych oraz niektórych krajach Unii Europejskiej. Jednak wymaga ona bardzo skomplikowanego kalendarza szczepień (sześć dawek w okresie 18 miesięcy).

### 2.3.1. Terapie blokujące wnikanie toksyny

#### 2.3.1.1. Bierna immunizacja

Bierna immunizacja polega głównie na podaniu surowicy (najczęściej zwierzęcej, w rzadszych przypadkach ludzkiej) zawierającej specyficzne skierowane przeciwko toksynie j immunoglobuliny głównie przeciwciała przeciw-PA. Najważniejszym efektem ubocznym tego typu terapii z zastosowaniem surowic zwierzęcych jest indukcja układu immunologicznego pacjenta rozpoznającego przeciwciała specyficzne wobec toksyny jako białka obcego organizmu. Tym reakcjom ubocznym można zapobiegać podając surowicę krwi osoby wcześniej zaszczepionej, bądź stosując monoklonalne ludzkie przeciwciała o zwiększonym powinowactwie wobec podjednostki LF oraz PA13. Głównym celem tego typu terapii jest odpowiedź na atak bioterrorystyczny, podczas którego dochodzi do zakażenia dużej liczby osób. Wobec ciągle niedoskonałych systemów wykrywania zagrożenia materiałem biologicznym, istnieje realna potrzeba doraźnej masowej terapii dla osób zakażonych węglikiem. W bada-

niach przeprowadzonych przez Albrecht i wsp. analizowano dwa klony limfocytów B wykazujące najsilniejsze właściwości neutralizujące podjednostki toksyny: jeden przeciw-PA nazwany IQNPA oraz drugi przeciw-LF nazwany IQNLF. Wstępne badania *in vitro* na linii komórkowej J774A.1 udokumentowały, że działają one niezależnie a ich właściwości neutralizacyjne sumują się. Eksperymenty *in vivo* wykonano na myszach A/J. Zwierzętom przed podaniem dawki 24 krotnie wyższej od LD<sub>50</sub> ( $4,8 \times 10^5$  CFU), aplikowano dootrzewnowo IQNPA lub IQNLF w dawce 180 µg. Wszystkie zwierzęta były w 100% chronione przed działaniem toksyny. W celu sprawdzenia jak długo przeciwciała utrzymują się w organizmie zwierzęcym, myszy zostały poddane kolejnej iniekcji przetrwalnikami węgla (dawka 41 krotnie wyższa od LD<sub>50</sub> –  $8,3 \times 10^5$  CFU), 20 dni po pierwszym eksperymencie bez ponownej aplikacji przeciwciał. Wyniki były identyczne jak w poprzednim eksperymencie. U zwierząt z grupy badanej zaobserwowano 100% przeżywalność a po zakończeniu eksperymentu, podczas autopsji nie wykryto spor *Bacillus anthracis* w ich organizmie (serce). W grupie kontrolnej średni czas do śmierci wynosił 69+/-18 godzin [4].

#### 2.3.1.2. Używanie „wabików”

##### (Decoy Based Technology)

Jednym ze skutecznych sposobów neutralizacji toksyny jest użycie „wabika” – związku usuwającego toksynę z krwioobiegu. Takim „wabikiem” okazała się rozpuszczalna domena receptora komórkowego dla PA – ANTHRAX2 [47]. W badaniach stosowana jest domena VWA receptora. Ta strategia wydaje się jedną z najskuteczniejszych metod walki z bioterrorystycznymi atakami z użyciem węgla, ponieważ aby zniwelować działanie sATR (soluble antrax toxin receptor) należałoby zmodyfikować toksynę węgla przy zachowaniu jej powinowactwa do receptora na komórkach, co jest raczej niemożliwe. Rozpuszczalne fragmenty receptorów – sATR otrzymywane są z supernatantu ssaczycy komórek linii FreeStyle 293. Badania przeprowadzone *in vitro* wykazały, że czynnik PA charakteryzuje się wyższym powinowactwem do receptora sCMG2 (soluble capillary morphogenesis protein 2) niż do TEM8 (tumor endothelial marker 8), co skłoniło do prowadzenia dalszych badań z użyciem sCMG2. Badania *in vivo* przeprowadzono na szczurach F344. Podawano im dożylnie LeTx razem z sCMG2 lub bez sCMG2 (kontrola) w różnych proporcjach. Podobny test przeprowadzono dla sATR/TEM8. Otrzymane wyniki udokumentowały, że do całkowitej ochrony przed letalnym działaniem toksyny konieczne jest użycie nadmiaru sCMG2 w stosunku do dawki toksyny (stosunek 2:1). Żaden ze szczurów w grupie traktowanej LeTx oraz sATR/TEM8 nie przeżył pomimo

wyższej proporcji „wabika” do toksyny niż w eksperymencie z użyciem sCMG2 [47].

Podobną strategię zastosowano w badaniach mających na celu spotęgowanie efektu sATR. W tym celu wykorzystano wirus owadzi i jego zdolność do prezentacji obcych polipeptydów na powierzchni kapsydu. Jako platforma do tych eksperymentów posłużył wirus FHV (Flock House Virus) należący do rodziny *Nodaviridae*. W jego kapsyd można wbudować domenę VWA CMG2 wiążącą PA, nie powodując przy tym znacznych zmian strukturalnych cząstek wirusowych. Zmodyfikowane białko powierzchniowe wirusa, z wbudowaną domeną VWA w pozycjach 207–208 lub 265–267, było nadprodukowane w komórkach owadzych z użyciem zmodyfikowanego wirusa FHV jako wektora. Utworzono w ten sposób chimeryczne cząstki wirusopodobne (VLP – Viruse-Like Particles) [31]. Testy *in vitro* wykonane z użyciem linii komórkowej CHO-K1 pozwoliły stwierdzić, że skuteczność działania VLP jest porównywalna do skuteczności rekombinowanych sCMG2. Postanowiono, zatem przejść do fazy badań *in vivo*. Jako modelu zwierzęcego użyto szczurów F344, którym podawano dożylnie 5-krotność minimalnej dawki letalnej LeTx, a następnie sCMG2, VLP lub wt FHV (niezmodyfikowany wirus) dla grupy kontrolnej. Wykazano, że podanie sCMG2 oraz VLP skutkuje 100% ochroną przed intoksykacją oraz brakiem objawów chorobowych, przy stężeniach w stosunku 2:1 (potencjalny lek:LeTx). Co więcej niższe o rząd wielkości dawki (0.2:1) znacznie wydłużały czas przeżycia zwierząt – był on dłuższy przy zastosowaniu VLP niż sCMG2. Oznacza to, że poliwalentne platformy prezentujące domeny receptora wiążące PA mogą mieć wyższą wartość terapeutyczną niż monomery sCMG2 [31]. Jedna cząsteczka VLP może przyłączać nawet do 120 jednostek/cząsteczek heptamerów czy monomerów PA.

### 2.3.1.3. Cisplastyna – terapia blokująca wiązanie do komórek docelowych

Inną eksperymentalną strategią zastosowaną w celu ochrony przed skutkami infekcji endosporami wąglika jest zablokowanie oligomeryzacji podjednostek PA<sup>63</sup>. Takie działanie wykazuje cisplastin, lek przeciwnowotworowy. Jest on związkiem alkilującym. Działa on na zasadzie niekowalencyjnej modyfikacji cząsteczek PA i powoduje głównie zablokowanie tworzenia heptameru PA<sup>7mer</sup>, co zapobiega przyłączaniu się cząsteczek LF [32]. Badania przeprowadzono na myszach BALB/c, na szczurach F344 a wcześniej na linii komórkowej RAW 264.7 (makrofagopodobna mysia linia (myszy BALB/c) wyprowadzona z komórek płynu wodobrzusza myszy zainfekowanych wirusem leukemii A-MuLV – Abselon leukemia wirus). W testach *in vitro* wykazano, że podanie cisplastinu chroni komórki przed

działaniem toksyny. W tych eksperymentach makrofagi traktowano różnymi stężeniami cisplastinu przez 10 minut a następnie poddawano je działaniu LF. Przy wyższych stężeniach cisplastin, choć zachowywał właściwości ochronne wobec toksyny węglik, to wywoływał efekt letalny w stosunku do komórek eukariotycznych. Testy *in vivo* na zwierzętach pokazały, że podskórna iniekcja cisplastinu 2 godziny przed oraz 2 godziny po podaniu toksyny są nieskuteczne. W grupie zwierząt, którym zaaplikowano toksynę po wcześniejszej jej preinkubacji z cisplastinem zaobserwowano 100% efekt ochronny. Autorzy sugerują, że obserwowane wyniki doświadczeń – brak efektu ochronnego *in vivo* – jest związane z właściwością cisplastinu, który silnie reaguje z grupami tiolowymi białek [32]. W rezultacie ilość leku jest zbyt mała, aby wywołać skuteczne blokowanie tworzenia heptameru PA.

### 2.3.2. Terapie hamujące zdarzenia wewnątrzkomórkowe

#### 2.3.2.1. $\beta$ -cyklodekstryny i ich pochodne – strategia zablokowania procesu translokacji czynników LF i EF do cytozolu

Jednym ze sposobów neutralizacji toksyny *Bacillus anthracis* jest zastosowanie  $\beta$ -cyklodekstryn – naturalnie występujących cyklicznych związków składających się z 7 jednostek glukozy połączonych wiązaniem  $\alpha$ -1,4-acetalowym. Pochodne tych związków swoją budową przestrzenną „pasują” do struktury przestrzennej tworzonego przez PA kanału. Metoda polega na zablokowaniu kanału jonowego tworzonego przez antygen ochronny i w rezultacie zablokowaniu wnikięcia podjednostek enzymatycznych toksyny do cytozolu poprzez dojrzałą porę uformowaną w błonie endosomu.

Pierwsze badania opierały się na wykorzystaniu aminoalkilowych pochodnych  $\beta$ -cyklodekstryn. Przeprowadzono eksperymenty najpierw na stworzonych sztucznie błonach lipidowych, następnie na linii komórkowej RAW 264.7 – mysich komórek makrofagopodobnych oraz ostatecznie na szczurach laboratoryjnych Fischer F344. Wyniki eksperymentu na dwuwarstwowych błonach lipidowych z odtworzonymi porami PA pokazały, że już przy stężeniach rzędu 80 nM – 1,8  $\mu$ M bardzo często następuje całkowite zablokowanie transportu podjednostek toksyny. Tak wysoka skuteczność działania badanych związków jest spowodowana najprawdopodobniej ścisłym oddziaływaniem pomiędzy dodatnio naładowanymi resztami aminowymi pochodnej  $\beta$ -cyklodekstryny oraz ujemnie naładowanymi grupami łańcuchów bocznych (wewnątrz kanału jonowego). Co więcej, eksperyment ten dowiódł również, że pochodna ta działa zarówno po dodaniu do komórki od strony wewnętrznej kanału jonowego (cis – do endosomu), po drugiej stronie błony (trans – do cytozolu)

jak i dodana jednocześnie do endosomu i cytozolu po obydwu stronach błony. Eksperyment przeprowadzony na linii komórkowej RAW 264.7 wykazał, iż przy stężeniu proporcjonalnym do stężenia PA aminoalkilowa pochodna  $\beta$ -cyklodekstryny (AmPr $\beta$ CD) jest skuteczną ochroną przeciwko toksycznemu efektowi LeTx *B. anthracis*. Ostatecznym dowodem był test na szczurach. W przypadku podania toksyny razem z badaną pochodną przeżywalność zwierząt wynosiła 100% oraz brak było objawów klinicznych zatrucia. Jednocześnie drugiej grupie szczurów pochodną cyklodekstryny podano na 30 minut przed podaniem toksyny. W tym przypadku jednak, pomimo 100% przeżywalności były zauważalne objawy intoksykacji [26].

Ta sama grupa badawcza rozpoczęła również pracę nad dopracowaniem struktury pochodnej  $\beta$ -cyklodekstryny. Wykorzystano szereg zmodyfikowanych aminoalkilowych  $\beta$ -cyklodekstryn różniących się długością łańcuchów bocznych oraz aminoalkilową  $\alpha$ -cyklodekstrynę, oraz guanidynoalkilowe jak i aryłowe oraz alkiloaryłowe pochodne by sprawdzić jak bardzo istotne jest „dopasowanie geometryczne” struktur leku i oligomeru PA. Oprócz zdolności do inhibicji przebadano także cytotoxycyzność tych związków. Podobnie jak w poprzednich doświadczeniach do badań *in vitro* użyto linii komórkowej RAW 264.7. Wyniki tych eksperymentów wykazały, że hamowanie translokacji podjednostek toksyny jest ściśle związane z dokładnym „dopasowaniem” leku do struktury pory – pochodne  $\alpha$ -dekstryny wykazały niewielką zdolność do blokowania omawianego procesu, natomiast bardzo dobrą zdolność do blokowania pory wykazała pochodna aminoalkilowa z trójwęglowym łańcuchem bocznym. Dodatkowo pochodna ta charakteryzowała się wysoką efektywnością oraz niską cytotoxycyznością. Sprawdzone również specyficzność zmodyfikowanych  $\beta$ -cyklodekstryn odnośnie LeTx oraz EdTx. Wyniki przeprowadzonych badań *in vitro* pokazały, że wybrana we wcześniejszych eksperymentach najskuteczniejsza pochodna  $\beta$ -cyklodekstryn, poprzez swoje działanie polegające na blokowaniu kanału tworzonego przez PA, chroni komórki przed letalnym działaniem obydwu tych toksyn, co rodzi nadzieje na wprowadzenie do użycia skutecznego leku neutralizującego toksynę węgla [27].

#### 2.3.2.2. Inhibitory aktywności enzymatycznej podjednostki LF

Jedną z najskuteczniejszych metod inaktywacji toksyny może okazać się zastosowanie inhibitora LF, leku zaplanowanego w oparciu o poznaną strukturę trzeciorzędową LF. Inhibitorem LF (LFI) jest (2R)-2-[(4-fluoro-3-metylofenylo)-sulfonyloamino]-N-hydroksy-2-(tetrahydro-2H-4-piranylo) acetamid. Skuteczność tego związku przebadano z użyciem linii makro-

fagów mysich J774A.1 i rekombinowanych białek LF oraz na modelach zwierzęcych (myszy i króliki), którym dożylnie podawano komórki szczepu *B. anthracis* (Sterne) nie wytwarzające otoczek oraz LFI. LFI wiąże się w miejscu centrum aktywnego enzymu blokując jego aktywność enzymatyczną, co wykazano w oparciu o analizy krystalograficzne [50]. Dodatkowo przeanalizowano skuteczność LFI w terapii łączonej z ciprofloksacyną. Badania dotyczące skuteczności działania LFI jako jedynego środka terapeutycznego składało się z dwóch typów eksperymentów. Pierwszy z nich miał na celu udokumentowanie skuteczności LFI przy jednoczesnym zainfekowaniu królików endosporami, drugi zanalizowanie czy LFI jest skuteczny po 24 godzinach po zainfekowaniu sporami. Pierwszy typ eksperymentów wykazał, że terapia LFI wydłużała niemal dwukrotnie czas życia królików oraz skutkowało 66% przeżywalnością zwierząt doświadczalnych (w porównaniu do 17% w grupie kontrolnej). Wyniki drugiego eksperymentu wykazały, że nawet po podaniu inhibitora 24 godzin po infekcji czas życia jest wydłużony dwukrotnie, jednakże przeżywalność zwierząt wyniosła tylko 20% (0% w grupie kontrolnej) [50].

Kolejnym krokiem było wykorzystanie terapii łączonej: antybiotyku (ciprofloksacyna) wraz z LFI. Zwierzęta podzielono na grupę kontrolną, grupę leczoną tylko antybiotykiem oraz grupę leczoną terapią LFI oraz ciprofloksacyną. Podanie antybiotyku 66 godzin po infekcji skutkowało 50% przeżywalnością królików. W grupie terapii łączonej stosowano taki sam schemat podawania antybiotyku jak w grupie monoterapii oraz dodatkowo podawano 4 razy dziennie podskórnie LFI. Zwierzęta nieleczone umierały po 96 godzinach od momentu infekcji, w grupie leczonej antybiotykiem zaobserwowano 50% przeżywalność, a zgon pozostałych miał miejsce średnio po 144 godzinach. Grupę poddaną terapii LFI oraz ciprofloksacyną cechowała 100% przeżywalność oraz niewielkie bądź brak objawów chorobowych [50]. Warto nadmienić, że w grupie leczonej tylko antybiotykiem, podobnie jak w grupie zwierząt poddanej terapii łączonej, po zakończeniu terapii nie wykryto spor *B. anthracis*, które były obecne w organizmach zwierząt z grupy kontrolnej. Badania te udokumentowały, że terapia antybiotykowa w połączeniu z inhibitorem LF pozwala na zapobiegnięcie śmiertelnym skutkom intoksykacji nawet w późnych stadiach zarażenia.

#### 2.3.2.3. Celasterol – zahamowanie lizy komórek

Celasterol, który we wcześniejszych badaniach wykazywał zdolność do blokowania aktywności proteasomu w linii komórek nowotworowych prostaty, został przebadany z wykorzystaniem linii komórkowej RAW 264.7 jako związek hamujący cytolizę komórek wywołowaną działaniem LF (komórki poddawano działaniu

rekombinowanych białek PA i LF). Celasterol dodany do hodowli komórek 5 godz. przed intoksykacją prawie całkowicie hamował ich lizę. Mechanizm działania tego związku nie został całkowicie wyjaśniony, choć prawdopodobnie działa na późnych etapach intoksykacji. Udokumentowano brak zahamowania aktywności enzymatycznej toksyny [12]. Podobnie jak w komórkach nowotworowych prostaty w komórkach makrofagów mysich lek ten blokuje aktywność proteasomu, doprowadzając do obniżenia jego aktywności degradacyjnej i interferując z procesem degradacji ubikwitynowanych białek. Jednocześnie jest on inhibitorem białka chaperonowego – HSP90. Dodatkowo celasterol hamuje procesowanie Il-1 $\beta$  przez inflammasomy (kompleks białkowy obecny w makrofagach i neutrofilach aktywujący prozapalną cytokinę Il-1 $\beta$ ). Il-1 $\beta$  jest białkiem syntetyzowanym w formie nieaktywnej a formę aktywną uzyskuje w wyniku cięcia proteolitycznego przez kaspazę-1 będącą składnikiem inflammasomów. Niestety lek ten pomimo możliwych zastosowań w terapii przeciw-nowotworowej lub chorób neurodegradacyjnych nie ma jak dotychczas realnego zastosowania w neutralizacji toksyny LeTx, gdyż mechanizm jego działania jest nie do końca poznany.

### 3. *Clostridium botulinum*

#### 3.1. Charakterystyka patogenu

*Clostridium botulinum* to beztlenowa, wytwarzająca przetrwalniki, gramodatnia laseczka występująca naturalnie w naszym otoczeniu, głównie w ziemi oraz w osadach zbiorników wodnych. Bakteria ta wytwarza siedem serotypów toksyn (Botulinum Neurotoxin – BoNT), oznaczonych literami od A do G różniących się immunogennością, rozpoznawanymi receptorami oraz celem działania. Przypadki zatruc ludzi są głównie wywoływane przez BoNT/A, B, E [1] i są stosunkowo rzadkie (w Polsce odnotowywanych jest rocznie kilkadziesiąt przypadków, w USA około 200). Botulizm nie jest związany w większości przypadków z wniknięciem patogenu do naszego organizmu. Do zatruc ludzi dochodzi najczęściej poprzez spożycie niewłaściwie przygotowanego jedzenia (konserwy mięsne lub warzywne) zawierającego BoNT. Objawy chorobowe występują 12–72 godz. od spożycia pożywienia zawierającego toksynę. Odnotowywane są też przypadki tzw. dziecięcego, gastrycznego botulizmu, gdy dochodzi do kolonizacji przewodu pokarmowego przez laseczki *C. botulinum*. U małych dzieci fizjologiczna flora bakteryjna nie jest jeszcze całkowicie wykształcona, co umożliwia kolonizację tej niszy ekologicznej przez patogenne drobnoustroje i wystąpienie objawów chorobowych. Źródłem przetrwalników

w wypadku botulizmu dziecięcego/niemowłego jest najczęściej miód. *C. botulinum* może także kolonizować tkanki w głębokich zranieniach, gdzie panują warunki beztlenowe (botulizm przyranny). Toksyny botulinowe są jednymi z najbardziej niebezpiecznych związków dla człowieka. Szacuje się, że wystarcza około 0,15  $\mu$ g czystej toksyny A podanej dożylnie mężczyźnie ważącemu 70 kg aby wywołać skutek śmiertelny. Dawka ta wzrasta, gdy toksyna podawana jest doustnie (70  $\mu$ g) czy też na drodze inhalacji, poprzez układ oddechowy (0,80–0,90  $\mu$ g).

Zainteresowanie mechanizmem działania toksyny botulinowej wynika głównie z faktu jej potencjalnego zastosowania w terapiach wielu chorób w celu atenuacji przekazywania sygnałów zarówno w centralnym jak i obwodowym układzie nerwowym [33] oraz możliwością użycia jako broni biologicznej w ataku bioterorystycznym. Jeden gram rozpylonej krystalicznej toksyny botulinowej (botulizm inhalacyjny) może spowodować śmierć ponad miliona osób.

#### 3.2. Budowa i mechanizm działania toksyny

Toksyny botulinowe (~150 kDa) są syntetyzowane w postaci jednołańcuchowego polipeptydu, który następnie ulega proteolitycznemu cięciu na dwa polipeptydy: łańcuch ciężki (HC – heavy chain) o masie cząsteczkowej około 100 kDa i łańcuch lekki (LC – light chain) o masie cząsteczkowej około 50 kDa. Oba łańcuchy połączone są wiązaniem disiarczkowym pomiędzy C-końcem łańcucha lekkiego i C-końcem łańcucha ciężkiego. W obrębie wszystkich serotypów BoNT wyróżniamy trzy domeny: domenę wiążącą odpowiedzialną za rozpoznanie receptorów, domenę translokacyjną warunkującą transport domeny o aktywności enzymatycznej przez błonę endosomu do cytozolu komórki eukariotycznej, oraz domenę o aktywności endopeptydazy, metaloproteazy cynko-zależnej. Domena wiążąca oraz translokacyjna zlokalizowane są w obrębie białkowego łańcucha ciężkiego, domena o aktywności enzymatycznej w obrębie łańcucha lekkiego. Struktury trzeciorzędowe BoNT/A i BoNT/B zostały opracowane metodą krystalografii już 10 lat temu [28, 52]. Proces intoksykacji komórek nerwowych przebiega w czterech etapach. W pierwszym etapie następuje rozpoznanie specyficznych receptorów na powierzchni komórek nerwów obwodowych, co skutkuje internalizacją toksyny na drodze endocytozy. Niskie pH w endosomie powoduje penetrację błony endosomu przez domenę translokacyjną oraz ustawienie domeny enzymatycznej na zewnątrz endosomu – w cytozolu. Oddzielenie łańcucha lekkiego o aktywności enzymatycznej od domeny translokacyjnej następuje w skutek redukcji mostka disiarczkowego. Na terenie cytozolu ujawnia się aktywność proteolityczna LC BoNT.

Dopiero stosunkowo niedawno zidentyfikowano receptory dla kilku serotypów BoNT. Proces wiązania toksyny do komórek nerwowych nie jest całkowicie wyjaśniony. Zgodnie z dostępnymi danymi eksperymentalnymi przebiega on w dwu etapach i wymaga obecności ko-receptora, którym są gangliozydy (glikofosfolipidy) GT1b. Gangliozydy obecne w dużej ilości na powierzchni komórek nerwowych i wykazujące stosunkowo niskie powinowactwo do BoNT służą raczej jako „pułapka” wylapująca cząsteczki toksyny i dostarczająca je do odpowiednich, charakterystycznych dla różnych serotypów receptorów białkowych. Wszystkie serotypy z wyjątkiem BoNT/D wymagają obecności GT1b dla zajścia procesu internalizacji, w wypadku zahamowania syntezy tych związków toksyna jest nieaktywna i pozostaje na zewnątrz komórek [42, 54]. Stenmark i wsp. otrzymali kryształy BoNT/A w powiązaniu z ko-receptorem, co pozwoliło na dokładne określenie oddziaływań pomiędzy tymi cząsteczkami [51]. Synaptotagminę I i II zidentyfikowano jako białkowy receptor dla BoNT/B i BoNT/G a białko SV2 jako receptor dla BoNT/A [11, 16, 17, 25]. Nie jest wykluczone, że następne białkowe receptory BoNT zostaną jeszcze zidentyfikowane. Szczegóły procesu translokacji LC przez błonę endosomu wymagają nadal wyjaśnienia. W świetle danych przedstawionych w tym roku przez Galloux i wsp. przebiega on odmiennie od procesów opisanych dla innych toksyn np. toksyny błoniczej [21].

BoNT powoduje znaczne upośledzenie przewodnictwa sygnałów nerwowych do komórek mięśniowych. Celem działania BoNT są specyficznie białka SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) – odpowiedzialne za wytwarzanie pęcherzyków synaptycznych, ich fuzję z błoną komórkową oraz wydzielanie neuroprzekazników. Toksyny B,D,F oraz G tną białko VAMP (vesicle-associated membrane protein – synaptobrewinę) jednakże każda z nich w innym miejscu łańcucha białkowego [43, 44]. Celem działania BoNT/A oraz BoNT/E jest białko SNAP-25 (25 kDa synaptosomal associated protein) [13]. Typ BoNT/C powoduje proteolizę zarówno SNAP-25 jak i syntoksyny [20].

### 3.3. Terapie

Skuteczną terapię przeciw-botulinową komplikuje fakt braku szybkiego testu diagnostycznego zdolnego do wykrycia toksyny w materiale pobranym od pacjenta. Jak dotąd diagnostyka botulizmu opiera się na obserwacji objawów chorobowych i potwierdzana jest testem na modelu zwierzęcym (myszy). Jednakże, w ostatnich latach opracowano kilka szybkich i wiarygodnych nowych testów diagnostycznych, które prawdopodobnie w niedługim czasie trafią do

klunik [7]. Omawianie tego zagadnienia wykracza poza ramy tego artykułu.

Aktualnie nie ma dostępnej na rynku szczepionki przeciw-botulinowej. Dopuszczalne są szczepienia osób z grup podwyższonego ryzyka pięcioważną szczepionką przeciw-*C. botulinum* (toksoid), będącą mieszaniną pięciu serotypów BoNT unieczynnionych przy użyciu 0,6% formaldehydu, zaadsorbowanej na solach aluminium [5]. Wykazano, że HCR BoNT (domena receptorowa łańcucha ciężkiego) charakteryzuje się silną immunogennością. Uodparnianie myszy rekombinowanymi białkami otrzymanymi w komórkach *E. coli* lub drożdży indukuje odpowiedź humoralną oraz wywiera efekt ochronny [8]. Inna eksperymentalna strategia polega na wykorzystaniu genetycznie zmodyfikowanej holotoksyny (mutageneza specyficzna co do miejsca) pozbawionej aktywności enzymatycznej [40].

#### 3.3.1. Immunoterapia

Bierna immunizacja jest jedyną aktualnie dostępną terapią przeciw-botulinową. Stosowane są dwa rodzaje surowic zawierające specyficzne immunoglobuliny neutralizujące toksynę: surowica końska oraz surowica ludzka BIG (botulism immune globulin intravenous). Pierwsza otrzymywana jest przez uodparnianie zwierząt przy użyciu toksoidu. Surowica BIG, stosowana jedynie w wypadkach dziecięcego botulizmu, otrzymana jest od ochotników – osób wcześniej zaszczepionych toksoidem (personel medyczny, żołnierze, oraz osoby pracujące z toksyną w laboratorium). Bardzo istotne jest szybkie zastosowanie tej terapii: w ciągu 24 godzin od wystąpienia objawów chorobowych. Po tym czasie toksyna, która uległa internalizacji staje się niedostępna dla antytoksyny. Wymaga to sprawnego działania służb medycznych i epidemiologicznych, co w wielu krajach jest niemożliwe do osiągnięcia. W USA pewne ilości antytoksyny przechowywane są w odpowiednich warunkach na kilku lotniskach tak, aby nie dłużej niż po 12 godz. po przekazaniu do CDC informacji o podejrzeniu botulizmu lek mógł być zaplikowany pacjentowi. Końska antytoksyna produkowana jest przez zaledwie kilka firm a cykl produkcji jest bardzo długi (2 lata) [49]. Podanie surowicy końskiej wywołuje u 15–25% leczonych osób poważne skutki uboczne jak np. choroba posurowicza (ogólnoustrojowy odczyn alergiczny – serum sickness).

Niewskazane jest stosowanie surowic zwierzęcych w przypadku intoksykacji dzieci, gdyż istnieje spore ryzyko zagrożenia życia małych pacjentów. Jak podano wyżej w terapiach dziecięcych przypadków botulizmu wykorzystuje się surowicę BIG. BIG to liofilizat surowicy, zawierający o co najmniej 5% ludzkich immunoglobulin w tym 15 UI przeciwciał specyficznych

wobec toksyny BoNT/A oraz 4 UI specyficznych wobec toksyny BoNT/B w 50 mg proszku. Antytoksyna jest podawana jednorazowo, dożylnie. Badania jej skuteczności były prowadzone przez 5 lat w USA na grupie dzieci z podejrzeniem zatrucia toksyną botulinową [6]. Grupa kontrolna otrzymywała placebo, surowicę niezawierającą przeciwciał przeciw-BoTN. Przydział pacjentów do grup był losowy. Wyniki badań wykazały wysoką skuteczność terapii. Średnia długość hospitalizacji została zmniejszona z 5.7 tygodnia do 2.6. Również czas pobytu pacjentów na oddziałach intensywnej terapii uległ skróceniu. Nie zaobserwowano żadnych poważnych skutków ubocznych (brak choroby posurowiczej). Badania te dowiodły skuteczności terapii z użyciem BIG, jej bezpieczeństwa dla pacjenta oraz z ekonomicznego punktu widzenia, jej opłacalności dla służby zdrowia.

### 3.3.2. Nowe leki przeciw-botulinowe

Teoretycznie nowe leki mogą hamować aktywność toksyny na każdym etapie jej działania: blokować wiązanie z receptorami, proces internalizacji, translokacji lub aktywność enzymatyczną. Ich opracowywanie stało się możliwe dzięki poznaniu sposobów działania toksyn oraz ich struktur trzeciorzędowych i kompleksów z odpowiednimi receptorami. Bezspornie o wiele łatwiejsze jest zaplanowanie strategii neutralizacji toksyny zewnątrzkomórkowej niż metod neutralizacji białka wewnątrz komórki eukariotycznej. W tym drugim przypadku konieczne jest także opracowanie i przetestowanie strategii dostarczania leku do cytozolu komórek, które uległy intoksykacji.

#### 3.3.2.1. Potencjalne strategie blokujące wiązanie toksyny BoNT do komórek docelowych

Badania koncentrują się na poszukiwaniu cząsteczek, które opłaszczająby cząsteczki toksyny blokując ich interakcję z receptorami lub na identyfikacji cząsteczek wysycających receptory współzawodnicząc z toksyną w procesie wiązania do docelowych komórek. Wykazano, że immunoterapia (surowica BIG) jest skuteczną metodą neutralizacji zewnątrzkomórkowej toksyny. Z drugiej strony dostępność tej surowicy jest ograniczona. Oba te fakty zainspirowały badania mające na celu opracowanie strategii produkcji ludzkich mAb (monoclonal antibodies) skutecznie neutralizujących toksynę. Najskuteczniejsza w neutralizacji BoNT okazała się mieszanina trzech rodzajów przeciwciał rozpoznających różne epitopy w obrębie łańcucha ciężkiego (HC). Prowadzone są też eksperymenty analizujące skuteczność mAb rozpoznających epitopy w obrębie łańcucha lekkiego BoNT. Potencjalnie po opracowaniu strategii dostarczania ich do wnętrza neuronów tego typu preparat może znaleźć zastosowanie

jako lek działający w późniejszych etapach intoksykacji komórek [3]. Kompetencyjnymi antagonistami wszystkich serotypów BoNT są dwa typy lektyn pochodzenia zwierzęcego i roślinnego wykazujące powinowactwo do kwasów sialowych [15]. Jednak ich zastosowanie w terapiach wydaje się problematyczne ze względu na powszechność występowania kwasów sialowych na powierzchni komórek eukariotycznych. Zidentyfikowanie nowych receptorów rozpoznawanych przez toksynę BoNT i poznanie mechanizmu jej wiązania się z receptorami bezspornie przyspieszy badania nad blokowaniem tego procesu. Cel może zostać także osiągnięty przez wytworzenie rozpuszczalnych analogów receptorów oraz związków blokujących receptory. Udokumentowano, że fragmenty synaptotagminy II blokują aktywność BoNT/A i B oraz wykazują efekt ochronny na modelu mysim [10].

#### 3.3.2.2. Blokowanie aktywności metaloproteazowej

Poznanie struktury LC BoNT oraz ich celów działania umożliwiło poszukiwanie leków blokujących aktywność kilku serotypów toksyn. Większość badań dotyczy dwu serotypów BoNT/A i B jako tych najczęściej wywołujących zatrucia u ludzi i potencjalnie stanowiących czynnik ataku bioterorystycznego. Jedną z strategii polega na syntetyzowaniu krótkich peptydów o sekwencji aminokwasowej odpowiadającej sekwencji aminokwasowej rozpoznawanej przez endopeptydazę lub sekwencji aminokwasowych konserwowanych wśród białek SNARE [41, 44, 45]. Do poszukiwania peptydów hamujących aktywność enzymatyczną LC BoNT wykorzystywane są też biblioteki peptydowe, technika „phage display” lub „mRNA display” [29, 34, 53]. Jednym z ograniczeń tego typu terapii może być krótki okres działania peptydów, stosunkowo szybko podlegają one procesowi degradacji.

Firmy biotechnologiczne oraz laboratoria naukowe prowadzące eksperymenty mające na celu wprowadzenie do klinik nowych leków dysponują bibliotekami różnych związków chemicznych (związki o niskim ciężarze cząsteczkowym, łatwo przenikające przez osłonę komórkową i nietoksyczne dla człowieka), wśród których poszukiwane są potencjalne inhibitory enzymów. Badania te wspomagane są analizami prowadzonymi *in silico*, co jest możliwe w wypadku białek o znanych strukturach trzeciorzędowych. W celu zahamowania aktywności LC będącej zależną od cynku metaloproteazą poszukiwano związku – chelatora cynku. Jednym z pierwszych badanych związków był TPEN (N,N,N',N'-Tetrakis(2-pirydylo-metylo)etylenodiamina). Jego inhibitorowe działanie nie jest jednak ograniczone wyłącznie do toksyny botulinowej, co uniemożliwia jego użycie w terapiach. Ostatnio przeprowadzono analizy *in silico* kilku milionów związków chemicznych w poszukiwaniu związku blokującego

aktywność endopeptydazową LC BoNT/A. Jednymi ze skutecznych inhibitorów okazały się pochodne kwasów hydroksamowych [15]. Wiele związków jest aktualnie analizowanych w testach *in vitro* oraz *in vivo* na modelach zwierzęcych [19].

Dynamicznie rozwijającą się technologią mającą zastosowanie w wielu gałęziach medycyny, zarówno w terapii jak i diagnostyce są badania dotyczące aptamerów. Nazwa tych cząsteczek pochodzi od łacińskiego słowa „aptus”, co oznacza pasować. Opisane po raz pierwszy w ostatnim dziesięcioleciu poprzedniego wieku niektóre już są licencjonowanymi lekami. Aptamery to krótkie oligonukleotydy (RNA lub DNA) wykazujące wysokie powinowactwo do cząsteczek docelowych, głównie białek. Niektórzy autorzy stosują też określenie aptamery peptydowe w odniesieniu do krótkich peptydów. Zarówno w diagnostyce jak i terapiach aptamery mogą zastąpić w najbliższym czasie przeciwciała. Charakteryzują się bowiem wieloma cechami takimi jak brak immunogenności i toksyczności, brak wywoływania efektów ubocznych, niskie koszty produkcji czy też możliwość wprowadzania modyfikacji chemicznych dającymi im aplikacyjną „przewagę” nad przeciwciałami. Ostatnio znalazły też one zastosowanie w medycynie jako nanobiosensory. Jedną z strategii poszukiwania odpowiedniego dla danej terapii czy diagnostyki aptameru nosi nazwę SELEX (systemic evolution of ligand by exponential enrichment). Polega ona na przeszukiwaniu biblioteki chemicznie syntetyzowanych krótkich RNA lub DNA o różnej sekwencji nukleotydowej i różnorodnej konformacji ( $10^{14}$ – $10^{15}$  cząsteczek) przy użyciu docelowej cząsteczki. Wyszukane aptamery są powielane przy użyciu PCR lub z zastosowaniem odwrotnej transkryptazy a cykl „przeszukiwania” powtarzany jest kilkakrotnie. Około dziesięciu cykli wystarcza przeważnie do „wyłowienia” aptameru o wysokim powinowactwie do celu działania. Opracowanie leku aptamerowego jest stosunkowo szybkie, przeciętnie proces ten zajmuje około 3–4 lat od momentu wyselekcjonowania odpowiedniego aptameru do wprowadzenia leku do klinik. W odniesieniu do BoNT leki aptamerowe mogą potencjalnie blokować trzy domeny toksyny i działać na wszystkich etapach intoksykacji neuronów [14, 24, 30].

#### 4. Podsumowanie

Jednym z głównych czynników zintensyfikowania pracy nad terapiami przeciw-toksynowymi były zdarzenia z 11 września 2001 r. oraz zagrożenie, jakie stanowi broń biologiczna w rękach terrorystów. Jedyną stosowaną strategię zapobiegania chorobom wywołanym przez *B. anthracis* i *C. botulinum* jest aktualnie bierna immunizacja – podanie zwierzęcej lub ludz-

kiej surowicy zawierającej specyficzne przeciwciała neutralizujące toksynę. Poznanie struktur trzeciorzędowych zarówno toksyn jak i toksyn połączonych z ich receptorami pozwoliło na zaplanowanie wielu nowych potencjalnych leków, działających zewnątrz- jak i wewnątrzkomórkowo. Odpowiednich związków poszukuje się metodami przeszukiwania bibliotek peptydowych, bibliotek aptamerowych lub bibliotek „małych związków chemicznych”. Wprowadzenie tych eksperymentalnych leków do powszechnego stosowania wymaga jeszcze wielu badań – udowodnienia ich bezwzględnej skuteczności i braku wywoływania efektów ubocznych. Jak dotąd większość jest badana dopiero *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowych lub na modelach zwierzęcych. Stały rozwój biologii molekularnej, udoskonalanie istniejących oraz opracowywanie nowych technologii pozwoli z dużym prawdopodobieństwem na znaczące przyspieszenie procesów wprowadzenia nowych leków przeciw-toksynowych na rynek.

Dodatkowo toksyna botulinowa znalazła już zastosowanie w leczeniu wielu chorób człowieka oraz kosmetologii, a postęp w zrozumieniu mechanizmów działania toksyny węgla pozwoli prawdopodobnie w niedługim czasie na zastosowanie jej w leczeniu chorób nowotworowych. Ten fakt inspiruje wiele laboratoriów do prowadzenia badań dotyczących wyjaśniania molekularnych mechanizmów oddziaływań obu toksyn z komórkami eukariotycznymi.

#### 6. Piśmiennictwo

1. Aas J., Gessert C.E., Bakken J.S.: Recurrent *Clostridium difficile* colitis: case series involving 18 patients treated with donor stool administered via a nasogastric tube. *Clin. Infect. Dis.* **36**, 580–585 (2003)
2. Abrami L., Reig N., van der Goot F.G.: Anthrax toxin: the long and winding road that leads to the kill. *Trends Microbiol.* **13**, 72–78 (2005)
3. Adekar S.P., Takahashi T., Jones R.M., Al-Saleem F.H., Ancharki D.M., Root M.J., Kapadnis B.P., Simpson L.L., Dessain S.K.: Neutralization of botulinum neurotoxin by a human monoclonal antibody specific for the catalytic light chain. *PLoS ONE*, **3**, e3023 (2008)
4. Albrecht M.T. i wsp.: Human monoclonal antibodies against anthrax lethal factor and protective antigen act independently to protect against *Bacillus anthracis* infection and enhance endogenous immunity to anthrax. *Infect. Immun.* **75**, 5425–5433 (2007) (praca 12 autorów)
5. Arnon S.S. i wsp.: Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA*, **285**, 1059–1070 (2001)
6. Arnon S.S., Schechter R., Maslanka S.E., Jewell N.P., Hatheway C.L.: Human botulism immune globulin for the treatment of infant botulism. *N. Engl. J. Med.* **354**, 462–471 (2006)
7. Bagramyan K., Barash J.R., Arnon S.S., Kalkum M.: Attomolar detection of botulinum toxin type A in complex biological matrices. *PLoS ONE*, **3**, e2041 (2008)



8. Baldwin M.R., Tepp W.H., Przedpelski A., Pier C.L., Bradshaw M., Johnson E.A., Barbieri J.T.: Subunit vaccine against the seven serotypes of botulism. *Infect. Immun.* **76**, 1314–1318 (2008)
9. Bradley K.A., Mogridge J., Mourez M., Collier R.J., Young J.A.: Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature*, **414**, 225–229 (2001)
10. Cai S., Singh B.R.: Strategies to design inhibitors of *Clostridium botulinum* neurotoxins. *Infect. Disord. Drug Targets*, **7**, 47–57 (2007)
11. Chai Q., Arndt J.W., Dong M., Tepp W.H., Johnson E.A., Chapman E.R., Stevens R.C.: Structural basis of cell surface receptor recognition by botulinum neurotoxin B. *Nature*, **444**, 1096–1100 (2006)
12. Chapelsky S., Batty S., Frost M., Mogridge J.: Inhibition of anthrax lethal toxin-induced cytotoxicity of RAW264.7 cells by celastrol. *PLoS ONE*, **3**, e1421 (2008)
13. Chen S., Barbieri J.T.: Unique substrate recognition by botulinum neurotoxins serotypes A and E. *J. Biol. Chem.* **281**, 10906–10911 (2006)
14. Colas P.: The eleven-year switch of peptide aptamers. *J. Biol.* **7**, 2 (2008)
15. Dickerson T.J., Janda K.D.: The use of small molecules to investigate molecular mechanisms and therapeutic targets for treatment of botulinum neurotoxin A intoxication. *ACS Chem. Biol.* **1**, 359–369 (2006)
16. Dong M., Richards D.A., Goodnough M.C., Tepp W.H., Johnson E.A., Chapman E.R.: Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. *J. Cell Biol.* **162**, 1293–1303 (2003)
17. Dong M., Yeh F., Tepp W.H., Dean C., Johnson E.A., Janz R., Chapman E.R.: SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. *Science*, **312**, 592–596 (2006)
18. Drum C.L., Yan S.Z., Bard J., Shen Y.Q., Lu D., Soelaiman S., Grabarek Z., Bohm A., Tang W.J.: Structural basis for the activation of anthrax adenyl cyclase exotoxin by calmodulin. *Nature*, **415**, 396–402 (2002)
19. Eubanks L.M. i wsp.: An *in vitro* and *in vivo* disconnect uncovered through high-throughput identification of botulinum neurotoxin A antagonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 2602–2607 (2007) (praca 19 autorów)
20. Foran P., Lawrence G.W., Shone C.C., Foster K.A., Dolly J.O.: Botulinum neurotoxin C1 cleaves both syntaxin and SNAP-25 in intact and permeabilized chromaffin cells: correlation with its blockade of catecholamine release. *Biochemistry*, **35**, 2630–2636 (1996)
21. Galloux M., Vitrac H., Montagner C., Raffestin S., Popoff M.R., Chenal A., Forge V., Gillet D.: Membrane Interaction of Botulinum Neurotoxin A Translocation (T) Domain: the belt region is a regulatory loop for membrane interaction. *J. Biol. Chem.* **283**, 27668–27676 (2008)
22. Henderson I.R., Navarro-Garcia F., Desvaux M., Fernandez R.C., Ala'Aldeen D.: Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 692–744 (2004)
23. Hudson M.J. i wsp.: Bacillus anthracis: balancing innocent research with dual-use potential. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**, 345–364 (2008) (praca 15 autorów)
24. Jayasena S.D.: Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin. Chem.* **45**, 1628–1650 (1999)
25. Jin R., Rummel A., Binz T., Brunger A.T.: Botulinum neurotoxin B recognizes its protein receptor with high affinity and specificity. *Nature*, **444**, 1092–1095 (2006)
26. Karginov V.A., Nestorovich E.M., Moayeri M., Leppla S.H., Bezrukov S.M.: Blocking anthrax lethal toxin at the protective antigen channel by using structure-inspired drug design. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 15075–15080 (2005)
27. Karginov V.A., Nestorovich E.M., Yohannes A., Robinson T.M., Fahmi N.E., Schmidtman F., Hecht S.M., Bezrukov S.M.: Search for cyclodextrin-based inhibitors of anthrax toxins: synthesis, structural features, and relative activities. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 3740–3753 (2006)
28. Lacy D.B., Tepp W., Cohen A.C., Das Gupta B.R., Stevens R.C.: Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 898–902 (1998)
29. Laing T.D., Marengo A.J., Moore D.M., Moore G.J., Mah D.C., Lee W.E.: Capillary electrophoresis laser-induced fluorescence for screening combinatorial peptide libraries in assays of botulinum neurotoxin A. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **843**, 240–246 (2006)
30. Lee J.O., So H.M., Jeon E.K., Chang H., Won K., Kim Y.H.: Aptamers as molecular recognition elements for electrical nanobiosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* **390**, 1023–1032 (2008)
31. Manayani D.J. i wsp.: A viral nanoparticle with dual function as an anthrax antitoxin and vaccine. *PLoS Pathog.* **3**, 1422–1431 (2007) (praca 13 autorów)
32. Moayeri M., Wiggins J.F., Lindeman R.E., Leppla S.H.: Cisplatin inhibition of anthrax lethal toxin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2658–2665 (2006)
33. Montecucco C., Molgo J.: Botulinum neurotoxins: revival of an old killer. *Curr. Opin. Pharmacol.* **5**, 274–279 (2005)
34. Moore G.J., Moore D.M., Roy S.S., Hayden L.J., Hamilton M.G., Chan N.W., Lee W.E.: Hinge peptide combinatorial libraries for inhibitors of botulinum neurotoxins and saxitoxin: deconvolution strategy. *Mol. Divers.* **10**, 9–16 (2006)
35. Mourez M.: Anthrax toxins. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **152**, 135–164 (2004)
36. Mourez M., Lacy D.B., Cunningham K., Legmann R., Sellman B.R., Mogridge J., Collier R.J.: 2001: a year of major advances in anthrax toxin research. *Trends Microbiol.* **10**, 287–293 (2002)
37. Neumeyer T., Tonello F., Dal Molin F., Schiffler B., Orlik F., Benz R.: Anthrax lethal factor (LF) mediated block of the anthrax protective antigen (PA) ion channel: effect of ionic strength and voltage. *Biochemistry*, **45**, 3060–3068 (2006)
38. Pannifer A.D. i wsp.: Crystal structure of the anthrax lethal factor. *Nature*, **414**, 229–233 (2001) (praca 12 autorów)
39. Petosa C., Collier R.J., Klimpel K.R., Leppla S.H., Liddington R.C.: Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature*, **385**, 833–838 (1997)
40. Pier C.L., Tepp W.H., Bradshaw M., Johnson E.A., Barbieri J.T., Baldwin M.R.: Recombinant holotoxin vaccine against botulism. *Infect. Immun.* **76**, 437–442 (2008)
41. Rossetto O., Schiavo G., Montecucco C., Poulain B., Deloye F., Lozzi L., Shone C.C.: SNARE motif and neurotoxins. *Nature*, **372**, 415–416 (1994)
42. Rummel A. i wsp.: Identification of the protein receptor binding site of botulinum neurotoxins B and G proves the double-receptor concept. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 359–364 (2007) (praca 11 autorów)
43. Schiavo G., Stenbeck G., Rothman J.E., Sollner T.H.: Binding of the synaptic vesicle v-SNARE, synaptotagmin, to the plasma membrane t-SNARE, SNAP-25, can explain docked vesicles at neurotoxin-treated synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 997–1001 (1997)

44. Schmidt J.J., Stafford R.G.: Botulinum neurotoxin serotype F: identification of substrate recognition requirements and development of inhibitors with low nanomolar affinity. *Biochemistry*, **44**, 4067–4073 (2005)
45. Schmidt J.J., Stafford R.G., Millard C.B.: High-throughput assays for botulinum neurotoxin proteolytic activity: serotypes A, B, D, and F. *Anal. Biochem.* **296**, 130–137 (2001)
46. Scobie H.M., Rainey G.J., Bradley K.A., Young J.A.: Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 5170–5174 (2003)
47. Scobie H.M., Thomas D., Marlett J.M., Destito G., Wigelsworth D.J., Collier R.J., Young J.A., Manchester M.: A soluble receptor decoy protects rats against anthrax lethal toxin challenge. *J. Infect. Dis.* **192**, 1047–1051 (2005)
48. Scobie H.M., Wigelsworth D.J., Marlett J.M., Thomas D., Rainey G.J., Lacy D.B., Manchester M., Collier R.J., Young J.A.: Anthrax toxin receptor 2-dependent lethal toxin killing *in vivo*. *PLoS Pathog.* **2**, e111 (2006)
49. Shapiro R.L., Hatheway C., Becher J., Swerdlow D.L.: Botulism surveillance and emergency response. A public health strategy for a global challenge. *JAMA*, **278**, 433–435 (1997)
50. Shoop W.L. i wsp.: Anthrax lethal factor inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 7958–7963 (2005) (praca 24 autorów)
51. Stenmark P., Dupuy J., Imamura A., Kiso M., Stevens R.C.: Crystal structure of botulinum neurotoxin type A in complex with the cell surface co-receptor GT1b-insight into the toxin-neuron interaction. *PLoS Pathog.* **4**, e1000129 (2008)
52. Swaminathan S., Eswaramoorthy S.: Structural analysis of the catalytic and binding sites of *Clostridium botulinum* neurotoxin B. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 693–699 (2000)
53. Yiadom K.P., Muhie S., Yang D.C.: Peptide inhibitors of botulinum neurotoxin by mRNA display. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **335**, 1247–1253 (2005)
54. Yowler B.C., Kensinger R.D., Schengrund C.L.: Botulinum neurotoxin A activity is dependent upon the presence of specific gangliosides in neuroblastoma cells expressing synaptotagmin I. *J. Biol. Chem.* **277**, 32815–32819 (2002)

# PROKARIOTY REDUKUJĄCE Fe(III): KLASYFIKACJA, WYSTĘPOWANIE, MECHANIZMY REDUKCJI Fe(III), ROLA EKOLOGICZNA I ZNACZENIE BIOTECHNOLOGICZNE

Anna Sikora<sup>1\*</sup> i Mieczysław K. Błaszczuk<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa

<sup>2</sup>Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego,  
ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

Wpłynęło w styczniu 2009 r.

1. Wprowadzenie. 2. Charakterystyka fizjologiczno-biochemiczna grup mikroorganizmów redukujących Fe(III). 3. Mechanizmy redukcji Fe(III). 4. Rola ekologiczna prokariotów redukujących Fe(III) w środowisku. 5. Znaczenie prokariotów redukujących Fe(III) w biotechnologii. 5.1. Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe. 5.2. Bioremediacja. 6. Podsumowanie

## Fe(III)-reducing prokaryotes:

### classification, distribution, mechanisms of Fe(III) reduction, ecological role and biotechnological significance

**Abstract:** FRM, ferric ion-respiring microorganisms, are a group of prokaryotes that use iron (III) and other metals as terminal electron acceptors in the process of anaerobic respiration. The list of culturable species of FRM is relatively short and the species belong to different phylogenetic groups. The article presents a physiological and biochemical characteristics of FRM, their ecological role and contribution to the circulation of elements in nature. Special attention is paid to the biotechnological significance of FRM, because of their potential role in (i) bioremediation of anaerobic environments contaminated by organic compounds and toxic heavy metals or radionuclides; (ii) electricity production in microbial fuel cells (MFC). The mechanisms of Fe(III) reduction are also described.

1. Introduction. 2. Physiological and biochemical characteristics of ferric respiring microorganisms. 3. Mechanisms of Fe(III) reduction. 4. Ecological role of FRM. 5. Biotechnological significance of FRM. 5.1. Microbial fuel cells. 5.2. Bioremediation. 6. Summary

**Słowa kluczowe:** prokarioty redukujące Fe(III), mechanizmy redukcji Fe(III), mikrobiologiczne ogniwa paliwowe, bioremediacja  
**Key words:** Fe(III)-respiring microorganisms (FRM), mechanisms of Fe(III) reduction, microbial fuel cells, bioremediation

## 1. Wprowadzenie

Żelazo (Fe) jest dominującym pierwiastkiem naszej Planety, uważa się, że stanowi 45% jej masy. Jest głównym składnikiem (ok. 90%) jądra Ziemi, gdzie występuje w stanie rodzimym. Natomiast w skorupie ziemskiej, której grubość wynosi 5–70 km (średnio 45 km), zawartość żelaza szacuje się na ok. 5% i jest ono czwartym z kolei pierwiastkiem, po tlenie (O), krzemie (Si) i glinie (Al). W skorupie ziemskiej żelazo występuje głównie na +2 lub +3 stopniu utlenienia w postaci różnych minerałów (rud żelaza) przedstawionych w Tabeli I. Żelazo występuje również w niewielkich ilościach na stopniu utlenienia 0, w stanie rodzimym w skałach magmowych oraz meteorytach żelaznych. Żelazo jest bardzo reaktywne i jego forma Fe(II) – jon żelazawy w środowisku neutralnym i warunkach tlenowych łatwo ulega utlenieniu do formy Fe(III) – jon żelazowy [20]. Żelazo (III) może ulegać mikrobiologicznej redukcji do formy dwuwartościowej w wyniku dwóch procesów: (i) redukcji asymilacyjnej związanej z przyswajaniem żelaza i wbudowaniem go w enzymy, kofaktory [20] oraz (ii) redukcji

Tabela I  
Minerały (rudy) żelaza występujące w skorupie ziemskiej  
[20, 61, 62]

Ruda żelaza	Wzór chemiczny
Magnetyt	$Fe_3O_4$ lub $FeO \times Fe_2O_3$
Hematyt	$Fe_2O_3$
Limonit	$Fe_2O_3 \times nH_2O$ lub $FeOOH$
Syderyt	$FeCO_3$
Getyt	$Fe_2O_3 \times H_2O$
Ilmenit	$FeO \times TiO_2$
Wiwianit	$[Fe_3(PO_4)_2 \times 8H_2O]$
Pirytyt (markasyt)	$FeS_2$
Pirotyn	$Fe_nS_{n+1}$ (n=5–6)
Arsenopirytyt	$FeAsS$

dysymilacyjnej związanej z wykorzystaniem żelaza Fe(III) jako ostatecznego akceptora elektronów w procesie oddychania w warunkach beztlenowych. Taki typ oddychania nazywany oddychaniem żelazowym lub oddychaniem Fe(III) (*ferric ion respiration* lub *Fe(III) respiration*) co oznacza, że cały proces związany jest z produkcją energii (61). Nie każdy proces

\* Autor do korespondencji: tel. (22) 592 3337, e-mail:annaw@ibb.waw.pl

Tabela II

Lista mikroorganizmów redukujących żelazo (III) z domeny *Bacteria* zdolnych do oddychania żelazowego [5, 8, 9, 13, 15, 16, 20, 24, 3, 34, 35, 37, 38, 45, 48, 61, 62, 66, 67, 82, 83, 91, 95, 98, 100]

Typ/klasa	Gatunki przykładowe	Rodzaj
<i>Acidobacteria</i>	<i>Geothrix</i>	<i>G. fermentans</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Acidimicrobium</i>	<i>Am. ferrooxidans</i>
<i>Aquificae</i>	<i>Sulfurihydrogenibium</i>	<i>S. azorense</i> , <i>S. subterraneum</i>
<i>Deferribacteres</i>	<i>Deferribacter</i>	<i>D. abyssi</i> , <i>D. thermophilus</i>
	<i>Geovibrio</i>	<i>G. ferrireducens</i>
<i>Deinococcus-Thermus</i>	<i>Deinococcus</i>	<i>D. geothermalis</i>
	<i>Thermus</i>	<i>T. scotoeductus</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Alkaliphilus</i>	<i>A. metalliredigens</i>
	<i>Anaerobranca</i>	<i>A. californensis</i> , <i>A. gottschalkii</i> , <i>A. horicoshi</i>
	<i>Bacillus</i>	<i>B. infernus</i> , <i>B. subterraneus</i>
	<i>Carboxydotherrmus</i>	<i>C. ferrireducens</i>
	<i>Sulfobacillus</i>	<i>S. acidophilus</i> , <i>S. thermosulfidooxidans</i>
	<i>Thermoanaerobacter</i>	<i>T. acetoethylicus</i> , <i>T. brokii</i> , <i>T. siderophilus</i> , <i>T. sulfurophilus</i> , <i>T. wiegelii</i>
	<i>Thermolithobacter</i>	<i>T. ferrireducens</i> , <i>T. carboxydovorans</i>
	<i>Termoterrabacterium</i>	<i>T. ferrireducens</i>
	<i>Thermosinus</i>	<i>T. carboxydovorans</i>
<i>Thermovenabulum</i>	<i>T. ferrioganovororum</i>	
<i>Nitrospira</i>	<i>Magnetobacterium</i>	<i>M. magnetitacticum</i>
$\alpha$ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Acidophilium</i>	<i>A. cryptum</i>
$\beta$ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Ferribacter</i>	<i>F. limneticum</i> , <i>F. thermoautotrophicum</i>
	<i>Ferribacterium</i>	<i>F. limneticum</i>
	<i>Rhodoferax</i>	<i>R. ferrireducens</i>
$\gamma$ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Acidithiobacillus</i>	<i>A. ferrooxidans</i>
	<i>Aeromonas</i>	<i>A. hydrophila</i>
	<i>Ferrimonas</i>	<i>F. balearica</i>
	<i>Pantoea</i>	<i>P. agglomerans</i>
	<i>Shewanella</i>	<i>S. alga</i> , <i>S. baltica</i> , <i>S. frigidimarina</i> , <i>S. oneidensis</i> , <i>S. olleyana</i> , <i>S. paeleana</i> , <i>S. potomacii</i> , <i>S. putrefaciens</i> , <i>S. saccharophila</i>
$\delta$ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Anaeromyxobacter</i>	<i>A. dehalogenans</i>
	<i>Desulfobulbus</i>	<i>D. propionicus</i>
	<i>Desulfotomaculum</i>	<i>D. reducens</i>
	<i>Desulfitobacterium</i>	<i>D. frappieri</i> , <i>D. hafniense</i> , <i>D. metallireducens</i>
	<i>Desulfuromonas</i>	<i>D. acetexigenes</i> , <i>D. acetoxidans</i> , <i>D. chloroethenica</i> , <i>D. michiganensis</i> , <i>D. palmitatis</i> , <i>D. thiophila</i> , <i>D. svalbardensis</i>
	<i>Desulfuromusa</i>	<i>D. bakii</i> , <i>D. kysingii</i> , <i>D. ferrireducens</i> , <i>D. succinoxidans</i>
	<i>Geoalkalibacter</i>	<i>G. ferrihydriticus</i>
	<i>Geobacter</i>	<i>G. bemidjiensis</i> , <i>G. bremensis</i> , <i>G. chappellei</i> , <i>G. grbiciae</i> , <i>G. humireducens</i> , <i>G. hydrogenophilus</i> , <i>G. metallireducens</i> , <i>G. pelophilus</i> , <i>G. psychrophilus</i> , <i>G. pickeringii</i> , <i>G. sulfurreducens</i> , <i>G. thiogenes</i> , <i>G. uraniireducens</i>
	<i>Geopsychrobacter</i>	<i>G. electrodiphilus</i> , <i>G. multivorans</i>
	<i>Geothermobacter</i>	<i>G. ehrlichii</i>
	<i>Malonomonas</i>	<i>M. rubra</i>
<i>Pelobacter</i>	<i>P. acetylenicus</i> , <i>P. acidigalici</i> , <i>P. carbinolicus</i> , <i>P. massiliensis</i> , <i>P. propionicus</i> , <i>P. venetianus</i>	
$\epsilon$ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Sulfurispirillum</i>	<i>S. barnessi</i>
<i>Thermodesulfobacteria</i>	<i>Geothermobacterium</i>	<i>G. ferrireducens</i>
	<i>Thermodesulfobacterium</i>	<i>T. commune</i>
<i>Thermotoga</i>	<i>Thermotoga</i>	<i>T. lettingae</i> , <i>T. maritima</i> , <i>T. subterranea</i>

dysymilacyjnej redukcji żelaza związany jest z wytwarzaniem energii. Ma to miejsce wtedy, gdy redukcja żelaza towarzyszy innym typom oddychania np. fermentacji, czy redukcji siarczanów a żelazo Fe(III) stanowi dodatkowy akceptor elektronów. Uważa się, że jest to sposób na pozbycie się nadmiaru elektronów i protonów z komórki (siła redukcyjna), przy niedostatku zasadniczego akceptora [20, 62].

## 2. Charakterystyka fizjologiczno-biochemiczna grup mikroorganizmów redukujących Fe(III)

Dla określenia prokariotów wykorzystujących Fe(III) jako ostateczny akceptor elektronów w oddychaniu beztlenowym stosuje się skrót FRM (*Fe(III)-respiring microorganisms*). Oprócz Fe(III) redukują one Mn(IV) do Mn(II) oraz kwasy humusowe a także inne metale, pierwiastki promieniotwórcze, np. U(VI) i związki jak azotany, fumaran czy siarkę S<sup>0</sup>. FRM zdolne do oddychania Fe(III) nie tworzą specyficznej filogenetycznej grupy. Należą one do obu domen prokariotów: *Bacteria* i *Archaea*. Obecnie znanych jest znacznie ponad 100 gatunków FRM. Ponad połowa gatunków stale rezyduje w środowiskach psychro-mezofilnych (choć nie są psychrofilami, ale mogą być psychrotolerantami), reszta zajmuje środowiska termofilne i hipertermofilne (źródła gorące, wody geotermalne, kominy hydrotermalne). Jedna grupa FRM całkowicie utlenia materię organiczną do dwutlenku węgla, druga niekompletnie, zwykle do octanu. Liczne FRM, zwłaszcza hipertermofilne, wykorzystują wodór jako źródło elektronów do redukcji Fe(III). W naturalnych środowiskach prokarioty FRM w warunkach beztlenowych utleniają produkty rozkładu materii organicznej, głównie produkty fermentacji glikolitycznych i nieglikolitycznych. W związku z tym, że wodór i octan są dwoma głównymi pośrednimi produktami fermentacji materii organicznej to uważa się, że w naturalnych środowiskach o pH obojętnym bogatych w związki Fe(III) czy Mn(IV) stanowią one istotne źródło elektronów w procesach redukcji metali. Dlatego przy charakterystyce FRM w badaniach laboratoryjnych zawsze określa się ich zdolność do utleniania octanu i wodoru. Octan stosuje się jako źródło węgla i energii do selekcji prokariotów redukujących Fe(III). Utlenianie octanu przebiega zgodnie z reakcją 1, a wodoru zgodnie z reakcją 2 [61, 62, 67, 95]:

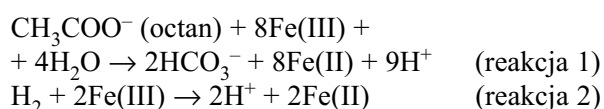


Tabela II pokazuje listę prokariotów FRM z domeny *Bacteria* a tabela III z domeny *Archaea* zdolnych do dysymilacyjnej redukcji żelaza, z wytworzeniem

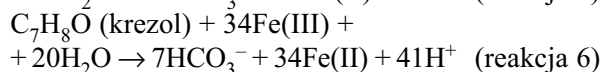
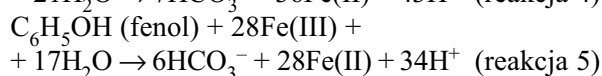
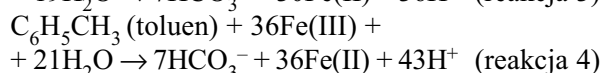
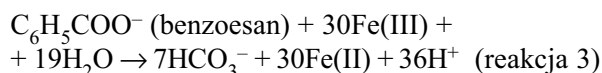
Tabela III

Lista mikroorganizmów redukujących żelazo (III) z domeny *Archaea* zdolnych do oddychania żelazowego [5, 39, 40, 95]

Typ	Rodzaj	Gatunki przykładowe
<i>Euryarchaeota</i>	<i>Archeoglobus</i>	<i>A. fulgidus</i>
	<i>Ferroglobus</i>	<i>F. indicus</i> , <i>F. placidus</i> , <i>F. pacificus</i>
	<i>Geoglobus</i>	<i>G. ahangari</i>
	<i>Pyrococcus</i>	<i>P. furiosus</i>
	<i>Thermococcus</i>	<i>T. celer</i> , <i>T. sibiricus</i>
<i>Crenarchaeota</i>	<i>Geogemma</i>	<i>G. barosi</i> , <i>G. indica</i> , <i>G. pacifica</i>
	<i>Hyperthermus</i>	<i>H. butylicus</i>
	<i>Pyrobaculum</i>	<i>P. aerophilum</i> , <i>P. islandicum</i>
	<i>Pyrodictium</i>	<i>P. abyssi</i> , <i>P. occultum</i>
	<i>Sulfolobus</i>	<i>S. acidocaldarius</i> , <i>S. shibatae</i>

energii w procesie oddychania żelazowego. Najlepiej znanymi i zbadanymi z FRM [5, 20, 34, 35, 38, 48, 61, 62, 66, 67, 91, 98] jest rodzina *Geobacteraceae* oraz rodzina *Desulfuromonadaceae*, obie z klasy  $\delta$ -*Proteobacteria*, typu *Proteobacteria*. Wg Bergey Manual [5] do *Geobacteraceae* należy rodzaj *Geobacter*, który jest jak dotychczas stosunkowo dobrze zbadany. Pierwszą odkrytą bakterią z rodzaju *Geobacter* był *G. metallireducens* (początkowo oznaczony jako szczep GS-15), wyizolowany z osadu rzeki Potomac w USA w 1987 roku. Do *Geobacteraceae* należą gatunki bakterii mezofilnych, rosnące w zakresie temperatur 25–40°C a także psychrotolerancyjny *Geopsychrobacter electrodiphilus*, rosnący w zakresie temperatur 4–30°C oraz termofilny *Geothermobacter ehrlichii*, wyizolowany z hydrotermalnego źródła, rosnący w temperaturach 35–65°C przy optimum 55°C. Wśród *Geobacteraceae* są też inne bakterie ekstremofilne, np. *Geoalkalibacter ferrihydriticus*, bakteria alkalofilna o optymalnym pH = 8,6. Bakterie z rodziny *Geobacteraceae* występują w powierzchniowych warstwach osadów dennych różnorodnych zbiorników wodnych płytkich i głębokich, zwłaszcza piaszczystych, bogatych w związki Fe(III). Bakterie te występują szczególnie licznie w miejscach skażonych ropą naftową. Izolacja chromosomalnego DNA i amplifikacja na jego matrycy genów kodujących 16SrRNA wykazała, że w wymienionych środowiskach jest to dominująca grupa bakterii. Wg Bergey Manual [5] do następnej dość dobrze poznanej rodziny *Desulfuromonadaceae* należą gatunki z rodzaju *Desulfuromonas*, *Desulfuromusa*, *Malonomonas* i *Pelobacter*, występujące w osadach morskich. Psychrofilny *Desulfuromonas svalbardensis* i psychrotolerancyjny *Desulfuromusa ferrireducens* były izolowane z morskich osadów dennych Arktyki, z optymalną temperaturą wzrostu odpowiednio 14°C i 14–17°C i maksymalną 20°C i 23°C.

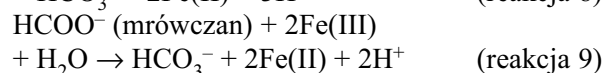
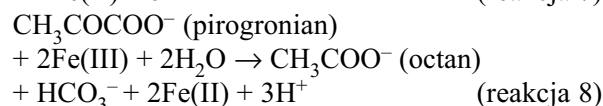
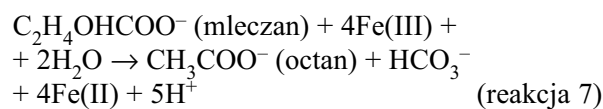
Oprócz rodzaju *Pelobacter*, pozostałe bakterie należące do dwóch powyższych rodzin są zdolne do całkowitego utleniania octanu do dwutlenku węgla z jednoczesną redukcją Fe(III). Większość z nich całkowicie utlenia kwasy organiczne, związki aromatyczne (np. toluen, benzoesan, fenol, krezol), niektóre etanol, długołańcuchowe kwasy tłuszczowe, cukry oraz aminokwasy. Duża część wykorzystuje wodór jako dawcę elektronów do procesów redukcji. Reakcje 3–6 przedstawiają kolejno utlenianie benzoesu, toluenu, fenolu i krezolu z jednoczesną redukcją Fe(III):



Przed odkryciem zdolności do redukcji Fe(III) uważano, że bakterie z rodzaju *Pelobacter* uzyskują energię wyłącznie w wyniku procesów fermentacji. Fermentują one 2,3-butanediol, acetoinę, glikol etylenowy i polietylenowy, acetylen oraz kwas galusowy. Rodzaj *Desulfuromusa* oraz *Malonomonas rubra* prowadzą fermentację jabłczanu i fumaranu. Część gatunków *Desulfuromonas*, *Desulfuromusa*, *Geoalkalibacter ferrihydriticus*, *Pelobacter* jest ściśle beztlenowa, inne są zdolne także do oddychania tlenowego (*Geobacter*). Odkrycie, że *G. sulfurreducens* przeżywa w warunkach atmosferycznych oraz jest zdolny do wzrostu przy obniżonym stężeniu tlenu w stosunku do powietrza tłumaczy fakt, że rodzaj *Geobacter* dominuje w środowiskach beztlenowych, które czasami mogą ulegać natlenieniu. Rodzaje *Desulfuromonas*, *Desulfuromusa*, *Malonomonas*, *Pelobacter* oraz *G. sulfurreducens* mogą redukować także  $\text{S}^0$ .

Kolejne FRM, które są intensywnie badane i dość dobrze poznane to gatunki z rodzaju *Shewanella*, z rodziny *Shewanellaceae*, klasy  $\delta$ -*Proteobacteria*, typu *Proteobacteria* wyizolowane z osadów dennych i warstw podpowierzchniowych różnorodnych zbiorników wodnych oraz gleb. Należą tu bakterie słodkowodne i morskie. Są również szczepy patogenne. W środowiskach beztlenowych, gdzie zredukowane jest żelazo, stanowią one zaledwie do 2% ogólnej ilości bakterii, a nawet nie wykrywa się ich tam wcale. Prawdopodobną przyczyną niewielkiej ilości bakterii z rodzaju *Shewanella* w ogólnej puli FRM jest prawdopodobnie niewielka ilość dostępnych substratów w środowisku oraz fakt, że prowadzą one niepełne utlenianie bardziej złożonych substratów. Jako źródło elektronów do redukcji Fe(III) bakterie te wykorzystują wodór oraz związki organiczne jak kwasy organiczne (mleczan, pirogro-

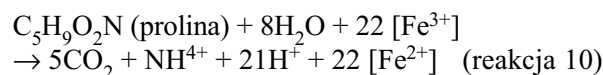
nian, mrówczan) i węglowodany (glukoza). Są to fakultatywne beztlenowce; ruchliwe Gram-ujemne pałeczki, które posiadają wici [5, 61, 62, 67]. Utlenianie mleczanu, pirogronianu i mrówczanu z jednoczesną redukcją Fe(III) przebiega odpowiednio według reakcji 7–9.



Fakultatywne beztlenowce z rodzaju *Ferrimonas* i *Aeromonas* to kolejne bakterie z klasy  $\gamma$ -*Proteobacteria* redukujące Fe(III) z jednoczesnym utlenianiem związków organicznych [20, 83].

Wśród FRM zidentyfikowano pojedyncze gatunki, filogenetycznie odległe od siebie oraz od pozostałych znanych redukujących Fe(III). *Geothrix fermentans* to Gram-ujemna nieruchliwa pałeczka, wyizolowana ze zbiornika wodnego zanieczyszczonego ropą naftową. Jest to ścisły beztlenowiec zdolny do redukcji Fe(III) z jednoczesnym utlenianiem propionianu, mleczanu, fumaranu, bursztynianu oraz długołańcuchowych kwasów tłuszczowych jak kwas palmitynowy. Energię może uzyskiwać także w wyniku fermentacji cytrynianu czy fumaranu. Jest gatunkiem należącym do typu *Acidobacteria* [8].

*Geovibrio ferrireducens* został wyizolowany z terenów skażonych węglowodorami. Jest to ruchliwy Gram-ujemny przecinkowiec, bakteria mezofilna, ściśle beztlenowa, niefermentująca. Elektrony do redukcji Fe(III) uzyskuje w wyniku utleniania octanu, wodoru, mleczanu, propionianu, bursztynianu, fumaranu, pirogronianu oraz, co jest rzadkie, aminokwasów. Reakcja utleniania proliny w połączeniu z redukcją żelaza przebiega zgodnie z reakcją 10:

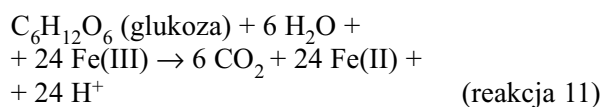


*G. ferrireducens* potrafi też redukować siarkę  $\text{S}^0$ . Największe podobieństwo wykazuje do halofilnej, beztlenowej, heterotroficznej pałeczki *Flexistipes sinus-arabici*, z którą tworzy odrębną grupę filogenetyczną w obrębie domeny *Bacteria* [13].

*Ferribacterium limneticum* jest ruchliwą pałeczką należącą do klasy  $\beta$ -*Proteobacteria*, wyizolowaną z osadów dennych jeziora zanieczyszczonego odpadami kopalnianymi. Jest to bakteria ściśle beztlenowa, redukuje Fe(III) utleniając octan i inne kwasy organiczne, niezdolna do fermentacji. Najbardziej spokrewniona jest z bakterią fotosyntetyzującą *Rhodocyclops tenuis*, która nie jest heterotrofem i nie jest zdolna

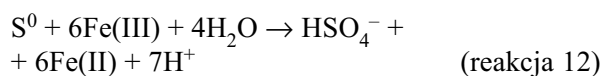
do redukcji Fe(III), ale *F. limneticum* nie jest bakterią fotosyntetyzującą [16].

*Rhodferax ferrireducens* jest krótką ruchliwą Gram-ujemną pałeczką z pojedynczą wicią, z klasy  $\beta$ -*Proteobacteria*, wyizolowaną z osadów dennych zatoki Oyster Bay w stanie Wirginia w USA, rosnącą w temperaturze 4–30°C. Jest fakultatywnym beztlenowcem wykazującym unikalną zdolność całkowitego utleniania glukozy do dwutlenku węgla z jednoczesną redukcją Fe(III) zgodnie z reakcją 11:



Rośnie też na podłożu zawierającym octan, mleczan, jabłczan, propionian, pirogronian, bursztynian, benzoosan. Mimo że bakteria ta jest najbardziej spokrewniona z rodzajem *Rhodferax* to nie jest ani bakterią fotosyntetyzującą ani fermentującą jak inni znani przedstawiciele tego rodzaju. Podobnie nie wykryto żadnej innej bakterii z rodzaju *Rhodferax* zdolnej do pozyskiwania energii z utleniania związków organicznych w połączeniu z redukcją Fe(III) [15].

Procesy redukcji Fe(III) zachodzą również w środowiskach kwaśnych. Wyizolowano bakterię *Acidophilium cryptum*, z klasy  $\alpha$ -*Proteobacteria*, z osadów kwaśnego jeziora pokopalnianego. Jest to Gram-ujemna pałeczka, bezwzględny beztlenowiec zdolny do utleniania cukrów, kwasów organicznych i wodoru w połączeniu z redukcją żelaza [45]. Ze środowisk kwaśnych izoluje się także bakterie uważane za neutrofile. Jedną z nich to *Desulfitobacterium metallireducens* jedyny przedstawiciel rodzaju *Desulfitobacterium*, Gram-dodatni beztlenowiec zdolny do redukcji Fe(III), Mn(IV), U(VI), Co(III) oraz kwasów humusowych. Redukuje też siarkę  $\text{S}^0$  i chlorozwiązki a utlenia kwasy organiczne i alkohole. Inna to *Anaeromyxobacter dehalogenans* z rzędu *Myxococcales* z  $\delta$ -*Proteobacteria*, Gram-ujemny fakultatywny beztlenowiec utleniający octan i redukujący Fe(III), azotany, fumarany i związki chlorofenolowe [82]. Bakterie autotroficzne jak *Acidithiobacillus thiooxidans*, *A. ferrooxidans* czy *Sulfolobus acidocaldarius* też mogą redukować Fe(III) do Fe(II) w kwaśnym pH utleniając siarkę, co opisuje reakcja 12. Proces ten zachodzi w warunkach tlenowych lub beztlenowych i uważa się, że nie służy on produkcji energii [62].



Oprócz alkalofilnych przedstawicieli rodziny *Geobacteraceae* znane są także inne gatunki FRM izolowane ze środowisk o odczynie zasadowym. Należą tu Gram-dodatnie bezwzględne beztlenowce *Alkaliphilus metalliredigens*, którego optymalne pH wzrostu

wynosi 9,5, redukujący Fe(III), Co(III), Cr(VI) oraz kwasy humusowe czy *Tindallia magadiensis*, bakteria fermentująca aminokwasy o optymalnym pH wzrostu 8,5 [100].

Kolejną grupą FRM, choć słabo poznaną, są hypertermofilne archeony żyjące w środowiskach gdzie panują temperatury 80–110°C i gdzie znajduje się dużo związków Fe(III). Utleniają one wodór, octan, długołańcuchowe kwasy tłuszczowe oraz związki aromatyczne do dwutlenku węgla. Redukują również inne metale, Mn(IV), Au(III), Cr(VI), Co(III), U(VI), Tc(VII). Należą tu przedstawiciele następujących gatunków *Archaea*: *Pyrobaculum aerophilum*, *P. islandicum*, *Pyrodictium abyssi*, *Methanopyrus kandleri*, *Ferroglobus placidus*, *Geoglobus ahangari*, *Archeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus furiosus*, *Geogemma barosii* (szczep 121) rosnący w temperaturze 121°C oraz bakterii: *Thermotoga maritima*, *Geothermobacterium ferrireducens*, *Thermoanaerobacter siderophilus*, *Thermus* sp., [5, 39, 40, 95].

Redukcję żelaza jako proces uboczny towarzyszący procesowi fermentacji obserwowano dla następujących gatunków i rodzajów bakterii: *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus circulans*, *B. megaterium*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Clostridium beijerinckii*, *C. pasteurianum*, *C. sporogenes*, *Lactobacillus lactis*, *Pseudomonas* spp., *Vibrio* sp., *Citrobacter freundii* [20, 62]. Wśród bakterii fermentujących wykrywa się też takie, które również mogą pozyskiwać energię w wyniku oddychania żelazowego. Przykładem może być *Pantonea agglomerans* należąca do rodziny *Enterobacteriaceae*, która występuje głównie w glebie oraz w zbiornikach wodnych. Jak wszystkie bakterie należące do tej rodziny jest fakultatywnym beztlenowcem i prowadzi procesy fermentacji. Ale wykazano, że także oddycha beztlenowo redukując Fe(III) oraz Mn(IV), Cr(VI) i kwasy humusowe utleniając octan i wodór [24].

Redukcja rozpuszczalnych związków Fe(III) oraz kwasów humusowych i Cr(VI) jest też procesem ubocznym towarzyszącym fermentacji, jako podstawowej formie zdobywania energii u ścisłego beztlenowca *Deinococcus radiodurans*. Bakteria ta jest najbardziej opornym organizmem na promieniowanie jonizujące spośród dotychczas odkrytych. Przeżywa dawki promieniowania o wartości do 1500 Gy (grej) [25].

Niektóre gatunki rodzaju *Bacillus* również mogą pozyskiwać energię w wyniku oddychania żelazowego. Należą do nich *B. infernus* czy *B. subterraneus*. *B. infernus* został wyizolowany z niecki triasowej z głębokości 2.7 km. Jest to ściśle beztlenowa, termofilna, halotolerancyjna, lekko alkalofilna bakteria, która fermentuje glukozę a także redukuje Fe(III), Mn(IV), azotany utleniając mrówczan i mleczan [9]. *B. subterraneus* wyizolowano z odwiertu głębokich wód geotermalnych w basenie artezyjskim w Australii, jest to mezofilny fakultatywny beztlenowiec. Redukuje

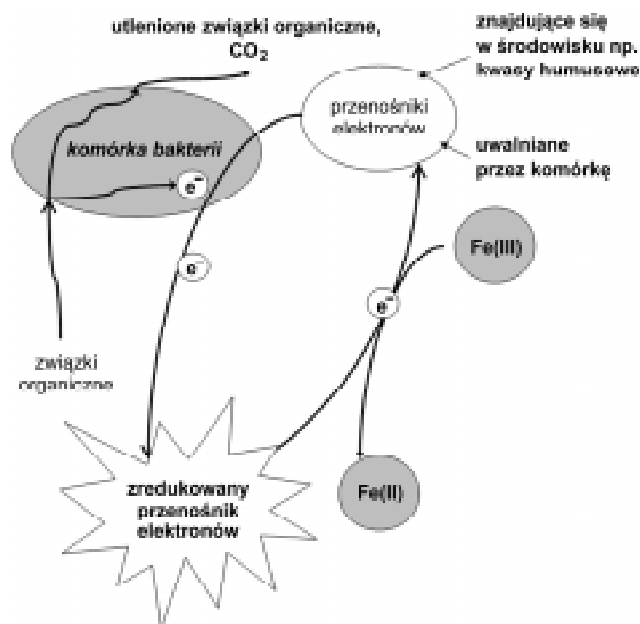
Fe(III), Mn(IV), fumaran, azotany i azotyny utleniając cukry, glicerol, etanol i mleczan [37].

Redukcja Fe(III) może towarzyszyć utlenianiu siarczanów przez bakterie redukujące siarczany. Jest to proces uboczny nie służący produkcji energii obserwowany u np. rodzaju *Desulfovibrio*, *Desulfobacterium autotrophicum* czy *Desulfobacter postgatei* [61, 62]. Ale niektórzy przedstawiciele bakterii redukujących siarczany też mogą oddychać przez redukcję Fe(III), Mn(IV) czy kwasów humusowych. Należą tu *Desulfobulbus propionicus* z rodziny *Desulfobulbaceae* występującej w morskich osadach dennych czy *Desulfotomaculum reducens* [33, 34].

### 3. Mechanizmy redukcji Fe(III)

Rozważając mechanizmy transferu elektronów między komórką bakterii a związkami Fe(III) w środowisku zewnętrznym należy wziąć pod uwagę następujące zagadnienia: bezpośredni kontakt mikroorganizmu z nierozpuszczalnym związkiem Fe(III); udział przenośników elektronów, zwłaszcza kwasów humusowych znajdujących się w środowisku; produkcję przenośników elektronów oraz substancji rozpuszczających nierozpuszczalne związki Fe(III) przez komórkę; bezpośredni kontakt mikroorganizmu z rozpuszczalnym związkiem Fe(III). W większości naturalnych środowisk Fe(III) występuje najczęściej w postaci nierozpuszczalnych tlenków. Filogenetycznie odległe bakterie z grupy FRM wykształciły różne sposoby przenoszenia elektronów na nierozpuszczalne związki żelaza Fe(III) [79].

Naturalnie w środowisku występują przenośniki elektronów oraz związki chelatujące, które ułatwiają procesy mikrobiologicznej redukcji zwłaszcza nierozpuszczalnych związków Fe(III). Przenośnik elektronów wychwytuje elektrony produkowane przez komórkę, w wyniku czego sam ulega redukcji, a następnie abiotycznie redukuje Fe(III). W efekcie reakcji utlenienia następuje regeneracja przenośnika (Rys. 1). Najlepiej poznanymi przenośnikami elektronów są kwasy humusowe, które wchodzi w skład próchnicy glebowej a także naturalnych wód. Zawierają one chinony, związki o właściwościach aromatycznych zawierające dwie grupy ketonowe (C=O), których atomy węgla wchodzi w skład pierścienia aromatycznego. Pobranie przez nie elektronów powoduje powstanie wolnych rodników chinonowych. Kwasy humusowe mogą być końcowym akceptorem elektronów w oddychaniu FRM tak samo jak związki Fe(III). W środowiskach bogatych w kwasy humusowe oraz związki Fe(III) dochodzi do abiotycznej redukcji tego ostatniego. Mikrobiologicznie zredukowane kwasy humusowe mogą abiotycznie redukować związki Fe(III) do Fe(II) i same ulegać utlenie-

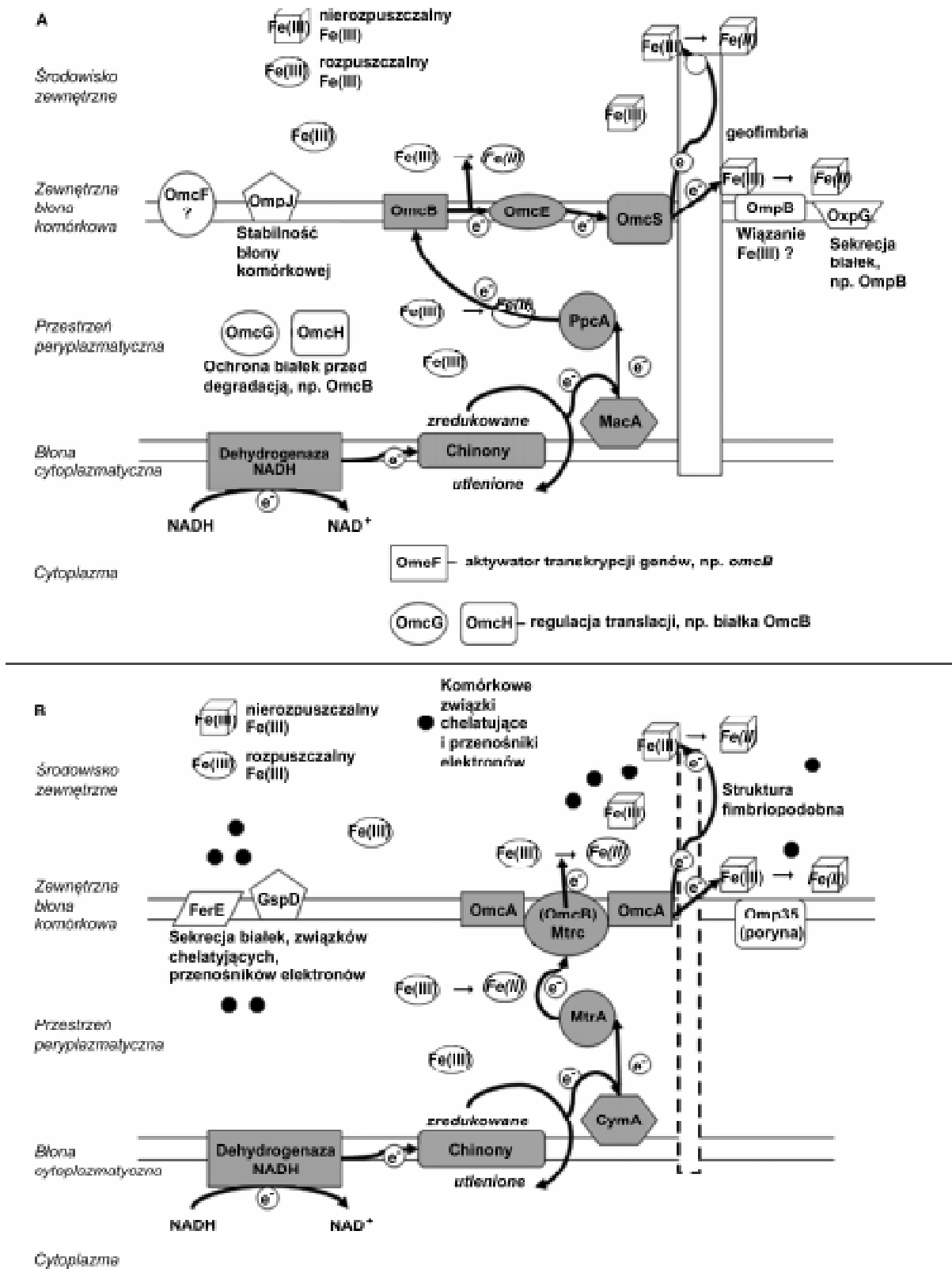


Rys. 1. Mechanizm działania przenośników elektronów w procesie redukcji związków żelaza (III) przez mikroorganizmy redukujące żelazo

niu w wyniku czego następuje ich regeneracja. W ten sposób te same kwasy mogą wielokrotnie ulegać procesom redukcji i utleniania. Obecność kwasów humusowych przyspiesza redukcję żelaza a także utlenianie materii organicznej [61, 69]. Oprócz kwasów humusowych także inne związki mają zdolność przenoszenia elektronów. Należą do nich związki fenolowe znajdujące się w liściach drzew np. klonu, dębu, orzecha włoskiego. Uważa się, że substancje humusowe występujące w naturalnych środowiskach posiadają też właściwości chelatujące (chelacyjne), czyli odznaczają się zdolnością do chemicznego wiązania z metalami i minerałami, przez co zwiększają ich rozpuszczalność. Pewne środowiska obfitują w naturalne przenośniki elektronów oraz związki chelatujące, w innych jest ich deficyt [79]. W badaniach laboratoryjnych do badania mechanizmów redukcji Fe(III) przy udziale przenośników elektronów jako analogów kwasów humusowych stosuje się chinony, najczęściej dwusiarczan 2,6-antrachinonu (AQDS) [69].

Mechanizmy transferu elektronów z komórki bakterii na zewnątrzkomórkowe akceptory jakimi są związki Fe(III) zostały dość dobrze poznane u *G. sulfurreducens*, ponieważ jego genom został całkowicie zsekwencjonowany. Ciekawą cechą tej bakterii jest obecność 111 genów kodujących białka uważane za cytochromy typu *c* na podstawie posiadanej charakterystycznej sekwencji CXXCH wiążącej hem. Szacuje się, że 31 tych białek zlokalizowanych jest w zewnętrznej błonie komórkowej [75]. Mechanizmy redukcji nierozpuszczalnych i rozpuszczalnych związków żelaza częściowo różnią się. Schemat mechanizmu re-





Rys. 2. Schemat mechanizmu redukcji Fe(III) przez *G. sulfurreducens* (A) i *S. oneidensis* MR-1 (B)

dukcji Fe(III) u *G. sulfurreducens* pokazuje rysunek 2A. Dawcą elektronów w komórce jest NADH. Dehydrogenaza NADH przekazuje elektrony na chinony w wewnętrznej błonie komórkowej. Kluczową rolę w przenoszeniu elektronów między wewnętrzną a zewnętrzną

błoną komórkową odgrywają peryplazmatyczne cytochromy typu *c*, MacA i PpcA. MacA jest białkiem o masie cząst. 36 kDa wiążącym dwie grupy hemo- we. Białko to odbiera elektrony ze zredukowanych chinonów i przekazuje je białku PpcA. Mutant *macA*-

wykazuje znacznie niższą aktywność redukcji Fe(III), gdy dostarczone jest ono w postaci rozpuszczalnego cytrynianu Fe(III) [12]. PpcA jest białkiem o masie cząst. 9,6 kDa wiążącym trzy grupy hemowe. Mutacja *ppcA* obniża redukcję cytrynianu Fe(III) o 60% w porównaniu ze szczepem dzikim, gdy dawcą elektronów jest octan. Białko to nie ma znaczenia, gdy źródło elektronów stanowi wodór, bo utlenianie wodoru katalizowane jest przez peryplazmatyczną hydrogenazę. PpcA jest niezbędne do procesów redukcji uranu (VI) oraz kwasów humusowych [50]. PpcA przenosi elektrony na białko OmcB, które jest cytochromem typu *c* występującym w zewnętrznej błonie komórkowej. Wiąże ono wiele grup hemowych i pełni bardzo istotną rolę w transporcie elektronów do zewnętrznej błony komórkowej, do białek OmcE i OmcS. Mutant *omcB*<sup>-</sup> *G. sulfurreducens* jest niezdolny do wzrostu na podłożu zawierającym Fe(III) w postaci rozpuszczalnego cytrynianu. Białko OmcB konieczne jest też do redukcji nierozpuszczalnych tlenków Fe(III) oraz wymagane jest, gdy dawcą elektronów jest zarówno octan jak i wodór. W komórce *G. sulfurreducens* występuje jeszcze białko OmcC wykazujące aż 79% identyczności do OmcB, ale w mutancie *omcC*<sup>-</sup> proces redukcji żelaza w postaci cytrynianu żelazowego przebiega podobnie jak w szczepie dzikim. Funkcja białka OmcC nie jest znana [46].

OmcS, białko o masie cząst. 50 kDa wiążące sześć grup hemowych, i OmcE, białko o masie cząst. 30 kDa wiążące cztery grupy hemowe, to cytochromy typu *c* zlokalizowane na powierzchni zewnętrznej błony komórkowej, które są konieczne do wzrostu na podłożu zawierającym nierozpuszczalny tlenek Fe(III) jako jedyny akceptor elektronów. Zaobserwowano, że mutant *omcE*<sup>-</sup> wykazywał niewielką zdolność do redukcji tlenków Fe(III) i Mn(IV), natomiast *omcS*<sup>-</sup> nie, co wskazuje na ważniejszą rolę białka OmcS w procesach redukcji nierozpuszczalnych związków Fe(III) czy Mn(IV). Mutanty *omcE*<sup>-</sup> i *omcS*<sup>-</sup> rosną na podłożu z cytrynianem Fe(III) jak szczep dziki. Uważa się, że rolą białek OmcS i OmcE jest przekazywanie elektronów na geofimbrie (opis niżej). Gen *omcS* prawdopodobnie tworzy operon z genem *omcT* kodującym białko OmcT, które wykazuje 62.6% homologii do białka OmcS. Jego funkcja jest nieznana [74].

Badania pokazują, że redukcja Fe(III) wymaga współdziałania wielu cytochromów typu *c*. Rolą jednych jest transfer elektronów, inne pełnią funkcje regulatorowe. Do tej drugiej grupy należą białka OmcF, OmcG i OmcH. Białko OmcF wiążące tylko jedną grupę hemową jest najmniejszym z cytochromów typu *c* *G. sulfurreducens*, jego masa cząst. wynosi 9.4 kDa. Mutacja *omcF* powoduje znaczną utratę zdolności redukcji rozpuszczalnego cytrynianu Fe(III). W mutantach *omcF*<sup>-</sup> nie wykrywa się mRNA dla białek OmcB

i OmcC oraz obserwuje się zmiany ilościowe innych cytochromów typu *c*. Białko OmcF jest uważane za aktywator transkrypcji genów, głównie *omcB*, a także *omcC* i prawdopodobnie innych. Ciekawym zjawiskiem jest fakt, że mutacji *omcF* towarzyszy nadekspresja białka OmcS, co umożliwia bakterii spowolniony wzrost na podłożu z cytrynianem żelaza. Białko OmcF wykrywa się też w zewnętrznej błonie komórkowej bakterii [42].

OmcG, białko o masie cząst. 78.7 kDa, i OmcH, białko o masie cząst. 103 kDa, to dwa homologiczne cytochromy typu *c* wiążące wiele grup hemowych. Wykazują 84.4% identyczności. Nie określano ich lokalizacji w komórce. W mutantach *omcG*<sup>-</sup> i *omcH*<sup>-</sup> nie wykrywa się białka OmcB, chociaż transkrypcja genu *omcB* zachodzi bez zakłóceń. Ekspresja tylko jednego z dwóch białek OmcG lub OmcH z plazmidu znosi efekty podwójnej mutacji *omcG omcH*. Przymuszaną rolą białek OmcG i OmcH jest regulacja translacji lub/i stabilizacja białka OmcB oraz ochrona przed degradacją w przestrzeni peryplazmatycznej [41].

Ponadto przy deficycie ostatecznych akceptorów elektronów w podłożu, ich rolę mogą przejściowo pełnić cytochromy typu *c*, znajdujące się w periplazmie i zewnętrznej błonie komórkowej. Szacuje się, że taki mechanizm dostarcza komórce *G. sulfurreducens* energii wystarczającej do przetrwania przez 8 minut lub zapewnia ruch wici na pokonanie odległości kilkuset długości komórki, aby przemieścić się do miejsca gdzie występują akceptory elektronów [22].

Do prawidłowego przebiegu procesów redukcji Fe(III) niezbędne konieczne są również białka zewnętrznej błony komórkowej nie będące przenośnikami elektronów. Należą do nich białka: OmpJ, OxpG, OmpB. Pełnią one rolę pośrednią w procesie transferu elektronów. OmpJ jest najobficiej występującym białkiem w zewnętrznej błonie komórkowej. Jest to białko specyficzne dla rodziny *Geobacteraceae*. Należy ono do poryn, grupy białek błonowych budujących kanały dyfuzyjne (pory) w zewnętrznej błonie komórkowej. Poryny mają strukturę  $\beta$ -harmonijki. Pory umożliwiają bierną dyfuzję różnych roztworów wodnych. Obecność białka OmpJ wymagana jest do redukcji rozpuszczalnego cytrynianu Fe(III) oraz nierozpuszczalnych tlenków Fe(III) i Mn(IV), ponieważ odgrywa ono ważną rolę w utrzymaniu fizycznej integralności błony komórkowej, zapewniając jednocześnie jej prawidłowe funkcjonowanie. Integralność błony komórkowej jest prawdopodobnie niezbędnym czynnikiem dojrzewania białek przenoszących elektrony i całego procesu przenoszenia elektronów. W mutancie *ompJ*<sup>-</sup> *G. sulfurreducens* następuje ok. 50% obniżenie ilości białek cytochromów typu *c* w przestrzeni peryplazmatycznej oraz w zewnętrznej błonie komórkowej. Obserwuje się również powiększenie przestrzeni peryplazmatycznej [1].

OmpB, białko o masie cząst. 139.6 kDa, jest prawdopodobnie oksydazą miedziową, gdyż posiada cztery miejsca wiązania jonów miedzi, dwa przy N-terminalnym i dwa przy C-terminalnym końcu. Wykazuje największe podobieństwo do oksydazy manganowej MofA *Leptothrix discophora*, bakterii utleniającej związek Mn(II). Białko OmpB ulega ekspresji na tym samym poziomie zarówno przy rozpuszczalnych jak i nierozpuszczalnych związkach Fe(III) jako ostatecznych akceptorach elektronów. Jest to białko występujące na powierzchni zewnętrznej błony komórkowej, wykrywa się go również w płynach zewnątrzkomórkowych. Mutant *ompB<sup>-</sup>* *G. sulfurreducens* redukuje rozpuszczalny cytrynian żelaza oraz fumaran jak szczep dziki, natomiast wykazuje znacznie obniżoną redukcję nierozpuszczalnych tlenków Fe(III) oraz Mn(IV). Nie wiadomo czy białko OmpB jest zaangażowane w redukcję Fe(III) i Mn(IV) czy ją pośrednio ułatwia pełniąc funkcję pomocniczą. Mimo że białko to jest uważane za oksydazę miedziową, to posiada też domenę odpowiedzialną za wiązanie fibronektyny, charakterystyczną dla bakteryjnych hydrolaz, zwłaszcza celulazy i chitynaz, odpowiedzialną za adhezję białka do polisacharydu i za zachowanie prawidłowej konformacji centrum aktywnego enzymu. W białku OmpB wykryto również sekwencję, która może być potencjalnym miejscem wiązania żelaza. Uważa się, że domeny odpowiedzialne za wiązanie żelaza i fibronektyny odgrywają rolę w oddziaływaniu między białkiem OmpB a tlenkami Fe(III) oraz Mn(IV). Za sekrecję białka OmpB odpowiada białko OxpG, które jest pseudopiliną, należącą do białek ogólnego systemu sekrecji typu II. Pseudopiliny tworzą fimbriopodobne struktury peryplazmatyczne, umożliwiające sekrecję białek przez tworzenie kanału dla wydzielanego białka lub wypychanie go na zewnątrz błony. Przypuszcza się, że rolą białka OxpG jest także sekrecja innych białek odpowiedzialnych za redukcję nierozpuszczalnych tlenków Fe(III) i Mn(IV). Mutant *oxpG<sup>-</sup>* nie jest zdolny do redukcji nierozpuszczalnych tlenków Fe(III) oraz Mn(IV). Natomiast redukcja rozpuszczalnego cytrynianu żelazowego zachodzi bez zmian, tak jak u szczepu dzikiego [73].

Początkowo uważano, że w redukcji Fe(III) biorą udział tylko cytochromy typu *c*. I tak jest, gdy akceptorem elektronów są rozpuszczalne związki żelaza, które odbierają elektrony bezpośrednio od białek w zewnętrznej błonie komórkowej lub w przestrzeni peryplazmatycznej. Jako ciekawostkę należy tu podać, że u bakterii z rodzaju *Pelobacter* nie wykryto cytochromów typu *c* [66]. Ostatnio u *G. sulfurreducens* wykryto fimbrie, nazwane geofimbriami, które mają zdolność przenoszenia elektronów. Zbadano przewodnictwo elektryczne białek fimbrii i innych białek zewnątrzkomórkowych i wykazano, że białka geofimbrii są do-

brymi przewodnikami elektronów i nazwano je „nanoprzewodami” (*microbial nanowires*). Geofimbrie tworzą się, gdy bakterie rosną na podłożu zawierającym nierozpuszczalne lub słabo rozpuszczalne związki trójwartościowego żelaza, np. tlenki żelaza a także przy innym niż Fe(III) akceptorze elektronów, np. fumaranie w warunkach suboptymalnych. Przy rozpuszczalnym cytrynianie żelazowym nie stwierdzono ich obecności. Przypomnijmy, że w większości środowisk dominują nierozpuszczalne tlenki Fe(III). Białko, z którego zbudowane są geofimbrie to produkt genu *pilA* [84]. PilA jest białkiem strukturalnym fimbrii typu IV. Fimbrie typu IV odpowiedzialne są za poruszanie się komórki niezależne od wici, kolonizację i tworzenie biofilmów, zapewniają kontakt bakterii z podłożem. Najlepiej poznane są one u bakterii patogennych, np. z rodzaju *Neisseria* czy *Pseudomonas* [72]. W przypadku *G. sulfurreducens* białko PilA jest krótsze niż u innych bakterii, ale zawiera silnie konserwowaną N-terminalną domenę fimbrii typu IV. Mutant *pilA<sup>-</sup>* *Geobacter sulfurreducens* nie rósł na podłożu, gdzie jedynym akceptorem elektronów były nierozpuszczalne tlenki Fe(III). Natomiast, gdy do podłoża dodano inny akceptor elektronów, np. fumaran, to zarówno szczep dziki jak i mutant *pilA<sup>-</sup>* wykazywały normalny wzrost. Na zdjęciach spod mikroskopu elektronowego widać było, że kryształy tlenku żelaza otaczały geofimbrie w przypadku dzikiego szczepu a w mutancie *pilA<sup>-</sup>* tworzyły skupiska przy komórkach. To wskazuje, że funkcją fimbrii nie jest zapewnienie fizycznego kontaktu z kryształami związku żelaza, ale bezpośredni udział w przenoszeniu elektronów. Dokładny mechanizm tego zjawiska nie jest jeszcze poznany. Wprowadzenie plazmidu z dzikim genem *pilA* na plazmidzie do mutantu *pilA<sup>-</sup>* powodowało zniesienie efektów mutacji i powstanie funkcjonalnych geofimbrii. Uważa się, że geofimbrie odgrywają ważną rolę w środowiskach, gdzie przeważają nierozpuszczalne związki żelaza trójwartościowego [84]. Pokazano, że fimbrie *G. sulfurreducens* są konieczne zarówno do tworzenia biofilmu jak i przenoszenia elektronów na anodę w mikrobiologicznych ogniwach paliwowych [85, 86].

Procesy redukcji Fe(III) zostały też dość dobrze poznane dla *Shewanella oneidensis* szczep MR-1 (dawniej *S. putrefaciens* szczep MR-1) (rys. 2B), której genom również został zsekwencjonowany. Genom *S. oneidensis* zawiera 42 geny kodujące białka cytochromy typu *c*, 15 z nich związanych jest z błonami, w tym 5 z błoną zewnętrzną [31]. Podobnie jak u *G. sulfurreducens* białkowe przenośniki elektronów odbierają je ze zredukowanych chinonów w wewnętrznej błonie komórkowej. Pierwszym jest CymA, białko błony cytoplazmatycznej o masie cząst. 20,8 kDa, które jest cytochromem typu *c*, wiążącym cztery grupy

hemowe. Mutant *cymA*<sup>-</sup> jest defektywny w redukcji związków Fe(III) i Mn(IV) a także azotanów i fumaranu [77]. Białko Cym A przenosi elektrony na białko MtrA o masie cząst. 36 kDa, które jest cytochromem typu *c* wiążącym 10 grup hemowych zlokalizowanym w peryplazmie. Mutant *mtrA*<sup>-</sup> wykazuje brak zdolności redukcji Fe (III). Rolą białka MtrA jest przekazanie elektronów cytochromom typu *c* zewnętrznej błony komórkowej, białkom MtrC (OmcB) i OmcA. Być może łańcuszek białek przenoszących elektrony jest dłuższy, ale nie zostały one jeszcze poznane. Masa cząst. białka MtrC wynosi 75 kDa, a białka OmcA 83 kDa, oba wiążą 10 grup hemowych, są lipoproteinami i pełnią funkcję reduktaz Fe(III). Tworzą stabilny kompleks białkowy, heterotrimer zbudowany z dwóch cząsteczek białka OmcA i jednej cząsteczki MtrC. Pojedyncze mutanty *mtrC*<sup>-</sup> i *omcA*<sup>-</sup> zachowują częściową zdolność redukcji rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych związków Fe (III) [3, 92].

Podobnie jak u *G. sulfurreducens* w komórkach *S. oneidensis* inne białka niż tylko cytochromy typu *c* uczestniczą w procesie redukcji żelaza. W zewnętrznej błonie komórkowej znajduje się białko MtrB o masie cząst. 75 kDa, które posiada charakterystyczną sekwencję CXXC wiążącą metale. Prawdopodobną rolą białka MtrB jest wiązanie bakterii z jodem metalu w trakcie procesu redukcji związków Fe(III) i Mn(IV). Białko MtrB może też odpowiadać za właściwą lokalizację białek MtrC i OmcA w błonie zewnętrznej. Mutant *mtrB*<sup>-</sup> jest niezdolny do redukcji Fe(III) i Mn(IV) [4, 93]. Innymi białkami są białka zewnętrznej błony komórkowej należące do ogólnego systemu sekrecji typu II: produkty genów *ferE* (*gspE*) oraz *gspD* odpowiedzialne za translokację białek MtrC i OmcA do i przez zewnętrzną błonę komórkową. Mutanty *ferE* i *gspD* są niezdolne do wzrostu na podłożu zawierającym związki Fe(III) i Mn(IV). Istnieje hipoteza, że ten system sekrecji bierze też udział w uwalnianiu na zewnątrz komórki substancji będących przenośnikami elektronów oraz związków chelatujących (patrz niżej) [19, 93]. Kolejnym białkiem wpływającym na proces redukcji Fe (III) jest białko z grupy poryn, Omp35, o masie cząst. 35 kDa występujące w zewnętrznej błonie komórkowej. Mutanty *omp35*<sup>-</sup> wykazują zaburzenia w procesie redukcji fumaranu, azotanów i związków Fe(III) oraz Mn(IV), ale dokładny mechanizm tego zjawiska nie został poznany [71].

U *S. oneidensis* wykryto też fimbriopodobne, jak to określili autorzy, struktury pełniące funkcję nanodrutów, ale nie określono z jakich białek są one zbudowane. Stwierdzono, że tworzą się one w warunkach beztlenowych lub przy ograniczonej ilości tlenu w środowisku. Wykazano również, że przewodzenie elektronów przez nanodrutu u *S. oneidensis* wymaga funkcjonalnych cytochromów typu *c* MtrC i OmcA [28].

We wnętrzu komórek *S. oneidensis* wykryto granulę zawierającą tlenki Fe(II) i Fe(III) oraz tlenki Mn(IV). Uważa się, że bakterie te przechowują minerały zawierające Fe(III) lub Mn(IV) w komórce jako zapas ostatecznych akceptorów elektronów, które są wykorzystywane w warunkach beztlenowych przy braku tych związków w środowisku [26, 27].

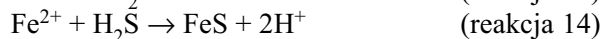
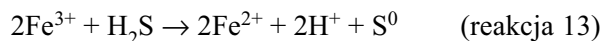
U gatunków z rodzaju *Shewanella* oraz u *Geothrix fermentans* opisano strategię umożliwiającą redukcję nierozpuszczalnych związków Fe(III), bez bezpośredniego kontaktu między komórką bakterii a akceptorem elektronów. Polega ona na uwalnianiu związków pełniących funkcję przenośnika elektronów (flawiny i chinony) oraz związków chelatujących (np. chinony). U rodzaju *Shewanella* zidentyfikowano przenośniki elektronów, którymi są flawiny, ryboflawina oraz mononukleotyd flawinowy (FMN) [14]. Uważa się, że przenośnikiem elektronów u *G. fermentans* jest rozpuszczalny w wodzie związek z grupy chinonów o masie cząst. mniejszej niż 12 kDa, chociaż nie został on zidentyfikowany. Produkcja przenośników elektronów jest wydatkiem energetycznym dla komórki i opłaca się, gdy bakterie żyją w populacjach o dużych gęstościach, przede wszystkim, gdy tworzą biofilm [79]. W badaniach nad mechanizmami redukcji nierozpuszczalnych związków Fe(III) u *S. oneidensis* stwierdzono, że substancje pełniące funkcje przenośników elektronów wydzielane są tylko do matriks biofilmu utworzonego przez te bakterie [47].

W obecności azotanów czy fumaranu jako akceptorów elektronów w podłożu bakterie redukujące żelazo (*G. metalireducens*, *G. sulfurreducens*, *G. fermentans* i *S. alga*) redukują je, wykorzystując jako źródło elektronów zredukowane kwasy humusowe a także zredukowane związki Fe(II). Zjawisko wykorzystania zredukowanych kwasów humusowych jako źródła elektronów do redukcji azotanów obserwuje się też dla bakterii denitryfikacyjnych [23, 68].

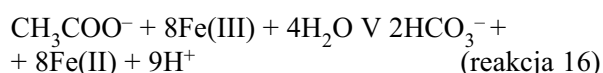
Redukcja Fe(III), która nie służy produkcji energii, u bakterii fermentujących jest wynikiem działania hydrogenaz. Dawcą elektronów do procesów redukcji jest wodór. Pokazano, że w warunkach beztlenowych *E. coli* może redukować rozpuszczalne związki technetu Tc(VII) do nierozpuszczalnych form ulegających wytrącaniu. Reakcja ta jest katalizowana przez hydrogenazę Hyc, która wchodzi w skład kompleksu FHL, odpowiedzialną za produkcję wodoru z mrówczanu w fermentacji kwasów mieszanych (fermentacji kwasu mrówkowego). Dawcą elektronów do redukcji Tc(VII) stanowi mrówczan lub wodór [52]. Okazuje się również, że hydrogenaza I *Clostridium pasteurianum* posiada aktywność reduktazy selenianu (IV)  $\text{SeO}_3^{2-} \rightarrow \text{S}^0$  a także związków telluru (IV)  $\text{TeO}_3^{2-}$ . Elektrony pochodzą z utleniania cząsteczek wodoru, a pośrednikiem w ich przenoszeniu jest ferredoksyna [99]. Z kolei

u prokariotów redukujących siarczany rolę reduktazy metali pełni cytochrom  $c_3$  [65].

Fe(III) może być też redukowane do Fe(II) abiotycznie, np. w reakcji z siarkowodorem produkowanym przez prokarioty redukujące siarczany zgodnie z reakcjami 13–15 [20]:



Podobną redukcję Fe(III) do Fe(II) obserwuje się w reakcji z innym metabolitem jakim jest kwas mrówkowy zgodnie z reakcją 16 [62]:



#### 4. Rola ekologiczna prokariotów redukujących Fe(III) w środowisku

Redukcja Fe(III) uważana jest za jedną z pierwotnych, obok redukcji  $\text{S}^0$ , a nawet wręcz najbardziej pierwotną formą oddychania mikroorganizmów. Uważa się, że pierwsze organizmy żywe to przedstawiciele FRM. Prawdopodobnie utlenianie wodoru połączone z redukcją Fe(III) było prametabolizmem, który dał początek ewolucji życia na Ziemi. Warunki środowiskowe wczesnego okresu początków życia na Ziemi, 3–5 miliardów lat temu, czyli wysoka temperatura, duża ilość wodoru oraz związków żelaza pochodzących z wnętrza Ziemi a występujących na jej powierzchni w formie utlenionej Fe(III), głównie na skutek intensywnego działania promieniowania UV, sprzyjała produkcji energii w wyniku utleniania wodoru i redukcji związków Fe(III). Istnieje wiele dowodów na to, że złoża magnetytu z okresu wczesnego prekambru są pochodzenia mikrobiologicznego a dokładnie wynikiem aktywności żyjących ówczesznie hypertermofilnych FRM. Metodą badania stosunku zawartości dwóch izotopów węgla  $^{12}\text{C}$  do  $^{13}\text{C}$  stwierdzono, że wiek materii organicznej towarzyszącej prekambryjskim złożom magnetytu jest ściśle skorelowany z wiekiem utlenionej materii organicznej z tamtego okresu. Jak dotychczas nie został poznany żaden abiotyczny proces związany z jednoczesnym utlenianiem materii organicznej i redukcją Fe(III) do magnetytu [61, 62].

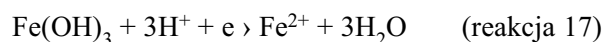
Uważa się, że analogiczne procesy mikrobiologicznej redukcji Fe(III) w połączeniu z utlenianiem wodoru jakie miały miejsce w okresie początków życia na Ziemi obecnie odbywają się w środowiskach, w których panują wysokie temperatury (80–110°C), np. w gorących źródłach. Gorące źródła obfitują w duże ilości Fe(II), które ulega utlenieniu do formy Fe(III)

w zetknięciu się z powietrzem. Wokół źródeł gromadzą się osady bogate w związki Fe(III). Z gorących źródeł wydobywają się też duże ilości wodoru. Wszystko to sprawia, że tworzą się idealne warunki do rozwoju termofilnych i hypertermofilnych beztlenowych mikroorganizmów redukujących Fe(III), dla których źródłem elektronów jest utlenianie wodoru. Oprócz wodoru współczesne termofilne i hypertermofilne FRM prawdopodobnie utleniają również związki organiczne jak octan, związki aromatyczne czy długołańcuchowe kwasy tłuszczowe. Dowodem na aktywność tych mikroorganizmów w gorących środowiskach jest wykrywany tam magnetyt w postaci ziarnistych struktur [39, 61, 62, 95]. Również meteoryty pochodzące z Marsa zawierają ziarniste struktury magnetytu. Istnieje przypuszczenie, że powstały one w wyniku aktywności FRM na Marsie [61]. Jak wiadomo badania nad magnetytem pozwoliły na odkrycie zasad magnetyzmu i elektryczności. Jako ciekawostkę warto tu dodać, że padło nawet stwierdzenie, że gdyby nie *G. metallireducens* (GS-15) i inne FRM nie mielibyśmy dziś radia i telewizji [61].

Innymi minerałami powstałymi w wyniku aktywności bakterii redukujących Fe(III) i Mn(IV) są syderyt ( $\text{FeCO}_3$ ), wiwianit [ $\text{Fe}_3(\text{PO}_4) \times 8\text{H}_2\text{O}$ ] czy rodochrozyt ( $\text{MnCO}_3$ ). FRM mogą też redukować związki uranu U(VI), w wyniku czego powstają złoża U(IV) w postaci uraninitu ( $\text{UO}_2$ ) [61].

Analogiczne procesy mikrobiologicznej redukcji U(VI) do tych zachodzących w warunkach mezofilnych mają też miejsce w środowiskach termofilnych i hypertermofilnych. Pokazano, że hypertermofilny archeon *Pyrobaculum islandicum* jest zdolny do redukcji U(VI) do U(IV) w temperaturze 100°C, w wyniku czego powstaje nierozpuszczalny uraninit. Redukcja U(VI) wymaga obecności wodoru jako dawcy elektronów [40].

Z mikrobiologiczną redukcją Fe(III) w glebach związane jest zjawisko powstawania gleb glejowych. Polega ono na tym, że gleba staje się kleista i przyjmuje szarą lub zielonkawo-niebieską barwę. Jest to wynik powstania związku  $\text{Fe}_3(\text{OH})_8$  zawierającego żelazo na stopniu utlenienia +2 i +3 w wyniku reakcji 17 i 18 [20]:



Innym zjawiskiem jest lateryzacja gleby w wilgotnych i gorących klimatach. W wyniku intensywnej aktywności prokariotów redukujących Fe(III) cząstki organiczne ulegają prawie całkowitej mineralizacji i jednocześnie tworzą się duże ilości tlenków Fe(II), które ulegają wytrącaniu i powodują jakby cementowanie cząsteczek gleby. W efekcie tworzy się twardy

Tabela IV

Wartości termodynamiczne redukcji nieorganicznych akceptorów elektronów w obecności materii organicznej [89]

Reakcja	Wartości $Eh$ (V)	$\Delta G$ (kcal/mol)
Redukcja tlenu: $O_2 + 4H^+ + 4e^- - 2H_2O$	0,812	-29,9
Redukcja jonów azotanowych: $NO_3^- + 6H^+ + 6e^- - N_2 + 3H_2O$	0,747	-28,4
Redukcja jonów $Mn^{+4}$ do $Mn^{2+}$ : $MnO_2 + 4H^+ + 2e^- - Mn^{2+} + 2H_2O$	0,526	-23,3
Redukcja jonów $Fe^{3+}$ do $Fe^{2+}$ : $Fe(OH)_3 + 3H^+ + e^- - Fe^{2+} + 3H_2O$	-0,047	-10,1
Redukcja jonów $SO_4^{2-}$ do $H_2S$ : $SO_4^{2-} + 10H^+ + 8e^- - H_2S + 4H_2O$	-0,221	-5,9
Redukcja $CO_2$ do $CH_4$ : $CO_2 + 8H^+ + 8e^- - CH_4 + 2H_2O$	-0,244	-5,6

czerwony lub ciemnobrązowy lateryt. Jego składnikami są także tlenki glinu [20].

Redukcja Fe(III) oraz Mn(IV) przez bakterie wpływa na stan wód, głównie wód gruntowych. W wyniku reakcji redukcji niektóre nierozpuszczalne tlenki Fe(III) i Mn(IV) ulegają przekształceniu do rozpuszczalnych związków Fe(II) i Mn(II). W takiej formie dostają się do wód gruntowych, gdzie w wyniku zetknięcia się z powietrzem ulegają utlenieniu do nierozpuszczalnych tlenków Fe(III) i Mn(IV). Powoduje to złą jakość wody pitnej, jej nieodpowiedni smak i kolor, problemy typu zatykanie się rur wodno-kanalizacyjnych, itp. Ponadto wraz z rozpuszczalnymi zredukowanymi związkami Fe(II) i Mn(II) do wód gruntowych mogą przedostać się fosforany i śladowe ilości toksycznych metali, które zwykle adsorbują się na nierozpuszczalnych tlenkach Fe(III) i Mn(IV). W efekcie tych procesów następuje wzrost siły jonowej, wzrost stężenia kationów, także wzrost pH i skażenie wód metalami toksycznymi. To wszystko z kolei ma niekorzystny wpływ na wzrost roślin [61, 62].

Jak już wspomniano przy omawianiu mechanizmów redukcji Fe(III) końcowym akceptorem elektronów w oddychaniu FRM mogą być kwasy humusowe. Zredukowane kwasy humusowe w środowisku mogą stanowić źródło elektronów do innych procesów mikrobiologicznej redukcji np. azotanów, selenianów, arsenianów [61].

Utlenianie materii organicznej z jednoczesną redukcją Fe(III) lub Mn(IV) stanowi ważny element w obiegu węgla w beztlenowych osadach dennych słodkowodnych zbiorników wodnych, w osadach morskich, na terenach podmokłych, w podmokłych glebach, np. pola ryżowe, w płytkich zbiornikach wodnych zanieczyszczonych związkami organicznymi. Niezbędnym warunkiem jest dostępność związków Fe(III) oraz Mn(IV) i łatwość utleniania ich form zredukowanych [61]. Oddychanie przez redukcję Fe(III) oraz Mn(IV) odgrywa istotną rolę w środowiskach ubogich w azotany i siarczany, gdzie nie zachodzi metanogeneza [20].

Jednocześnie mikrobiologiczna redukcja siarczanów jak i procesy metanogenezy są zahamowane w środowiskach bogatych w Fe(III). Dodanie tlenków Fe(III) lub Mn(IV) do środowisk, gdzie intensywnie zachodzą procesy redukcji siarczanów oraz procesy metanogenezy, powoduje ich wyraźne spowolnienie. Nie wynika to z toksyczności związków żelaza, tylko ze zmiany składu mikroflory i zdominowania jej przez organizmy FRM. Podobny efekt obserwuje się po wprowadzeniu do podłoża wodoru i/lub octanów. Zjawisko to jest wynikiem współzawodnictwa między poszczególnymi grupami mikroorganizmów o substraty organiczne będące donorami elektronów. Decyduje o tym potencjał oksydoredukcyjny reakcji redukcji związków nieorganicznych i utleniania materii organicznej [89]. Jak widać z danych w Tabeli IV prokarioty redukujące Fe(III) i Mn(IV) żyją na pograniczu dodatniego i ujemnego potencjału oksydoredukcyjnego, uzyskując przy tym dwukrotnie więcej energii przy utlenieniu mola substratu organicznego niż prokarioty redukujące siarczany (PRS) oraz archeony metanogenne. FRM są więc bardziej istotne ekologicznie.

Ogromne znaczenie dla środowiska ma usuwanie zanieczyszczeń organicznych z terenów skażonych ropą naftową czy wysypisk śmieci przez FRM (rozdz. 5.2).

Mikrobiologiczna transformacja form żelaza Fe(II) i Fe(III) pełni ważną rolę w obiegu żelaza w przyrodzie. Do procesów mikrobiologicznych wpływających na krążenie żelaza oprócz oddychania Fe(III) i innych form dysymilacyjnej redukcji żelaza należą oddziaływanie końcowych produktów metabolizmu bakterii na minerały zawierające żelazo oraz procesy mikrobiologicznego utleniania jonu żelazawego do jonu żelazowego [20]. FRM mają też istotne znaczenie w krążeniu manganu w przyrodzie. Uważa się, że ilość związków manganu w środowisku stanowi 10% ilości związków żelaza, ale za to Mn(IV) jest chętniej wykorzystywany jako akceptor elektronów niż Fe(III), co również spowodowane jest potencjałem redoks reakcji redukcji Fe(III) i Mn(IV) (Tabela IV) [61, 89].

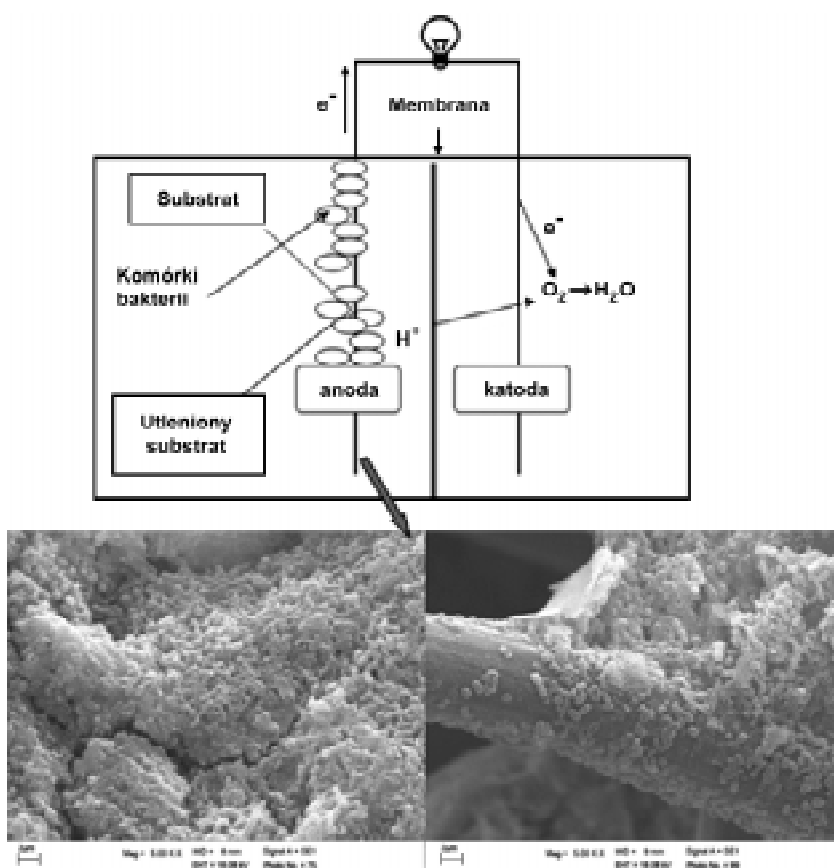
## 5. Znaczenie prokariotów redukujących Fe(III) w biotechnologii

Biotechnologię określa się jako integrację nauk przyrodniczych i inżynierskich w celu zastosowania czynników biologicznych (organizmów, komórek, enzymów) do pozyskania dóbr i usług. Wśród czynników biologicznych wykorzystywanych w biotechnologii dominującą rolę odgrywają bakterie. Prokarioty redukujące Fe(III) oraz inne metale stanowią bardzo ciekawą grupę drobnoustrojów z punktu widzenia biotechnologii. Wyizolowane i zidentyfikowane niedawno, w przyszłości mogą odegrać dużą rolę w procesach bioremediacji oraz znaleźć zastosowanie w mikrobiologicznych ogniwach paliwowych do produkcji prądu z jednoczesnym usuwaniem różnorodnych odpadów organicznych.

### 5.1. Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe

Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe (MFC, *microbial fuel cell*) to układy w których wykorzystuje się mikroorganizmy beztlenowe do produkcji energii elektrycznej. W wyniku oddychania komórkowego następuje przekształcenie energii chemicznej ukrytej w wiązaniach chemicznych w związkach organicznych

w energię elektryczną. MFC działają na zasadzie chemicznych ogniw paliwowych. W tych ostatnich produkcja energii elektrycznej następuje w wyniku elektrochemicznej reakcji spalania paliwa (wodoru lub prostego związku chemicznego bogatego w wodór, jak np. metanol czy lekkie węglowodory) doprowadzanego do anody w utleniaczu, np. tlenie z powietrza doprowadzanym do katody. Mikrobiologiczne ogniwo paliwowe składa się z przedziałów anodowego i katodowego oddzielonych od siebie membraną jonosektywną przepuszczającą jony, zwykle protony. W przedziale anodowym mają miejsce reakcje utleniania. Protony przenoszone są z przedziału anodowego do przedziału katodowego przez membranę. Elektronów przenoszonych są na katodę przez zewnętrzny obwód elektryczny, w którym wydziela się energia elektryczna. W przedziale katodowym następują reakcje redukcji. Jak do tej pory zaproponowano kilka typów MFC [11, 55, 94]. Jedną z koncepcji zakłada, że w przedziale anodowym MFC hodowane są bakterie redukujące Fe(III), które tworzą biofilm na anodzie. W wyniku utleniania przez te bakterie związków organicznych w procesie oddychania powstają elektrony, które przenoszone są bezpośrednio na anodę MFC zamiast na naturalne akceptory znajdujące się w środowisku zewnątrzkomórkowym. W efekcie tego procesu produkowana jest energia elektryczna (rys. 3). Bakterie



Rys. 3. Schemat mikrobiologicznego ogniwa paliwowego z udziałem bakterii redukujących żelazo (III).

Na zdjęciach pokazano anodę MFC w postaci tkaniny węglowej porośniętej bakteriami z hodowli selekcyjnej bakterie redukujące żelazo (badania własne).

zdolne do produkcji energii w wyniku bezpośredniego transferu elektronów pochodzących z utleniania materii organicznej na anodę mikrobiologicznego ogniwa paliwowego zostały nazwane przez jednych autorów elektricigenami (*electricigens*) [57–60] a przez innych egzoelektrogenami (*exoelectrogens*) [55]. Do tej pory opisano działanie MFC z udziałem czystych kultur następujących gatunków bakterii: *Rhodospirillum rubrum* [15], *Geothrix fermentans* [8], *Desulfobulbus propionicus* [33], *Aeromonas hydrophila* [83], *Clostridium butyricum* szczep EG3 [81], *Geopsychrobacter electrophilus* [35], *Geobacter sulfurreducens* [6], *G. metallireducens*, *Desulfuromonas acetoxidans* [7], *S. putrefaciens* szczep MR-1 [43]. Najczęściej stosowanym materiałem, z którego wykonuje się anody w tego typu ogniwach jest grafit. W eksperymentach z *Geobacter sulfurreducens* pokazano, że bardzo dobrym materiałem anodowym może być złoto. To odkrycie jest ważne dla zastosowań MFC z udziałem bakterii redukujących żelazo na mikroskalę [88].

Buduje się również osadowe mikrobiologiczne ogniwa paliwowe (SMFC, *sediment MFC*). Anoda tego typu ogniwa umieszczana jest bezpośrednio w beztlenowych osadach dennych zbiorników wodnych a katoda w miejscach, do których dociera tlen. Osiągana gęstość mocy produkowanego prądu wynosi od kilku do kilkudziesięciu mW/m<sup>2</sup>. Takie układy zwane też BUGs (*Benthic Unattended Generators*) mogą mieć zastosowanie jako systemy przeznaczone do zasilania urządzeń elektrycznych w odległych miejscach jak głębiny oceanu, gdzie wymiana baterii jest technicznie trudna i kosztowna. Osadowe MFC można też zbudować w warunkach laboratoryjnych umieszczając anodę ogniwa w próbkach osadów dennych. Analizy biofilmów pokrywających anody osadowych MFC pokazały, że ich dominującym składnikiem są bakterie z rodziny *Geobacteraceae*, rodzaj *Desulfuromonas* w przypadku słonych osadów morskich i rodzaj *Geobacter* w przypadku osadów słodkowodnych. W różnych warunkach znaczący udział mają też inne bakterie, np. z rodziny *Desulfobulbaceae* czy rodzaj *Geothrix* [7, 17, 33, 55, 56, 57, 97]. Osadowe mikrobiologiczne ogniwa paliwowe pozwalają na odkrywanie i izolację nowych elektrochemicznie aktywnych gatunków i szczepów bakterii [35, 81, 83].

Obecnie rozważa się trzy kierunki rozwoju i zastosowań MFC z udziałem elektricigenów. Pierwszy to usuwanie odpadów organicznych z jednoczesną produkcją energii elektrycznej. Substratami miałyby tu być ścieki pochodzące z gospodarstw domowych czy odpady z produkcji rolnej. Rozważa się stworzenie układów, odpowiedników systemów BUGs, które pokrywałyby częściowo zapotrzebowanie na energię, zwłaszcza na dużych obszarach rolnych oraz w krajach rozwijających się. Drugi kierunek to samowystarczalne

roboty pobierające substraty organiczne z otoczenia. Trzeci kierunek to zastosowania na wspomnianą już mikroskalę, głównie biosensory, czyli systemy, które wykorzystują reakcje biologiczne do wykrywania różnych związków. Obecność danego związku w przedziale anodowym uruchamia przepływ prądu, co rejestrowane jest metodami elektronicznymi [6, 44]. Te potencjalne zastosowania wymagają zwiększenia wydajności i optymalizacji MFC. Konieczne jest więc dogłębne poznanie mechanizmów transferu elektronów na anodę bioogniwa przez znane już mikroorganizmy zwane elektricigenami, ich fizjologii, ekologii oraz poszukiwanie nowych gatunków. Narzędzi ku temu dostarcza obecny burzliwy rozwój genomiki i różnorodnych metod biologii molekularnej. Szuka się sposobu zwiększenia aktywności oddechowej bakterii pokrywających anodę. Rozważana jest koncepcja modyfikacji genetycznych bakterii w kierunku konstrukcji mutantów np. nadprodukcujących białka, odpowiedzialnych za kontakt z powierzchnią anody [56–59].

Wydaje się, że nie było i nie istnieje żadna presja ewolucyjna w kierunku produkcji energii przez elektricigeny w naturalnych środowiskach. Nie wiadomo czy białka odpowiedzialne za przenoszenie elektronów na akceptory znajdujące się na zewnątrz komórki w naturalnym środowisku i w warunkach laboratoryjnych działają równie wydajnie, gdy bakteria rośnie na materiale, z którego zbudowana jest anoda MFC [59]. Stosując technikę mikroczipów DNA oraz hybrydyzację northern porównywano ekspresję genów *G. sulfurreducens* rosnących na podłożu z cytrynianem żelaza oraz na anodzie grafitowej w mikrobiologicznym ogniwie paliwowym. Stwierdzono zmienioną ekspresję 474 genów, gdy elektroda była jedynym akceptorem elektronów. 197 genów było transkrybowanych silniej a 277 słabiej. Największą różnicę, bo aż 19-krotny wzrost ekspresji, obserwowano dla genu kodującego białko OmcS, cytochrom typu *c* w zewnętrznej błonie komórkowej. Co więcej, mutant z delecją *omcS* nie był zdolny do produkcji energii. Podwyższonej ekspresji podlegały też geny *omcE* i *omcT*. Przypomnijmy, że białka OmcS i OmcE są odpowiedzialne za redukcję nierozpuszczalnego tlenku żelazowego. Żadnych różnic nie obserwowano natomiast dla transkryptów *omcB*, *ompB*, *ompJ* oraz piliny budującej nanodrut. Ponadto mutacje w genach *omcB* i *pilA* nie zmieniły produkcji energii elektrycznej. Cytochromy typu *c* zlokalizowane w zewnętrznej błonie komórkowej prawdopodobnie odgrywają istotną rolę w kontaktach komórki bakterii z elektrodą [36].

Wyniki innych badań sugerują, że również inne białka mogą być istotne w transferze elektronów na naturalne akceptory w środowisku niż na anodę mikrobiologicznego ogniwa paliwowego. Otrzymały mutanty *S. oneidensis* MR-1, które produkowały



prąd w MFC, ale nie były w stanie zredukować tlenku Fe(III) [10]. Z kolei inna bakteria z rodziny *Geobacteraceae*, *Pelobacter carbinolicus* jest zdolna do redukcji żelaza (III), ale w MFC z jej udziałem nie był produkowany prąd [87].

## 5.2. Bioremediacja

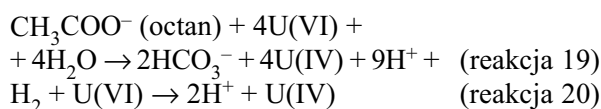
Terminem bioremediacja określa się technologię leczenia środowiska naturalnego ze skażeń, głównie powodowanych przez metale ciężkie, produkty ropy naftowej i pierwiastki radioaktywne, za pomocą żywych mikroorganizmów w celu ich rozkładu lub przeprowadzenia w formy mniej szkodliwe. Bioremediacja *in situ* włącza procesy degradacji, detoksyfikacji oraz immobilizacji zanieczyszczeń przez mikroorganizmy, które naturalnie żyją w strefach skażonych [60].

FRM mogą znaleźć zastosowanie w procesach bioremediacji na dwa sposoby. Pierwszy to utlenianie do dwutlenku węgla w warunkach beztlenowych związków organicznych, jak np. węglowodory aromatyczne w miejscach skażonych ropą naftową, połączone z redukcją żelaza. Tereny skażone przez ropę naftową obfitują w FRM, głównie rodzaj *Geobacter*. Istnieje pomysł zastosowania układów opartych na mikrobiologicznych ogniwach paliwowych do oczyszczania terenów skażonych ropopochodnymi związkami organicznymi. W wyniku utleniania tych związków przez bakterie z grupy FRM produkowana byłaby energia elektryczna [76]. Dodanie substancji chelatujących nierozpuszczalne tlenki Fe(III) do próbek osadów zanieczyszczonych ropą naftową powodowało przyspieszenie procesu utleniania ropopochodnych związków aromatycznych i procesów redukcji Fe(III). Może to być strategią stosowaną w bioremediacji terenów skażonych ropą naftową przy udziale bakterii z grupy FRM [70].

Drugi sposób zastosowania bakterii redukujących żelazo w procesach bioremediacji to wykorzystanie ich zdolności do redukcji innych metali niż Fe(III) czy Mn (IV), zwłaszcza tych, które są toksyczne i niebezpieczne dla człowieka i środowiska. Większość pierwiastków może występować na różnym stopniu utlenienia w różnych związkach chemicznych. Stopień utlenienia, na którym znajduje się dany pierwiastek wpływa na własności fizyko-chemiczne (np. rozpuszczalność w wodzie) związków, które tworzy. Szczególne znaczenie z punktu widzenia bioremediacji mają procesy (często są to procesy redukcji) przeprowadzania form toksycznych pierwiastków rozpuszczalnych w wodzie w formy nierozpuszczalne, które ulegają wytrącaniu i w ten sposób łatwo je usunąć z miejsc skażonych.

FRM mogą być skutecznym narzędziem do bioremediacji terenów skażonych uranem pochodzącym z odpadów radioaktywnych. Okres półtrwania uranu

w zależności od izotopu wynosi od 247 tysięcy do 4.5 miliardów lat. Związki uranu (VI) są rozpuszczalne w wodzie, stąd bardzo trudne do usunięcia ze środowiska. Natomiast uran (IV) tworzy nierozpuszczalne tlenki – uraninit, które łatwo ulegają wytrąceniu. Zatem mikrobiologiczna redukcja U (VI) do U (IV) może przyczynić się do usuwania uranu ze środowiska, zwłaszcza ze skażonych wód [2, 63, 64, 96]. Czyste kultury bakterii z grupy FRM (rodzaj *Geobacter*, *Shewanella*) redukują U(VI) do U(IV) i w ten sposób pozyskują energię niezbędną do procesów życiowych. Reakcje 19 i 20 opisują redukcję U(VI) do U(IV) przy udziale elektronów pochodzących z utleniania odpowiednio octanu i wodoru.



Do redukcji uranu (VI) zdolne też są prokarioty redukujące siarczany, jednak proces ten nie służy pozyskiwaniu energii. Dotychczas stwierdzono, że zdolność redukcji uranu (VI) do uranu (IV) posiadają bakterie z rodziny *Desulfobacteriaceae*, np. *Desulfobacterium desulfuricans*, a także nieliczni przedstawiciele z rodziny *Peptococcaceae*, np. rodzaj *Desulfotomaculum*. Filogenetyczna analiza populacji bakterii w próbkach pobranych z osadów skażonych uranem pokazuje, że dominują tam przedstawiciele rodzin *Geobacteraceae* i *Desulfobacteriaceae* [96].

W badaniach laboratoryjnych pokazano, że prostą metodą zwiększania procesów redukcji uranu (VI) w skażonych próbkach pobranych z naturalnych środowisk wodnych jest dodanie octanu jako dawcy elektronów. W takich warunkach następuje silny rozwój FRM, głównie z rodziny *Geobacteraceae*, które stanowią nawet do 40% całego zespołu mikroorganizmów (*microbial community*) [32]. Taką samą strategię (wzbogacanie w octan) zastosowano w badaniach *in situ* w zbiorniku wodnym zanieczyszczonym związkami uranu. Doświadczenie trwało 3 miesiące. Początkowo również obserwowano rozwój bakterii z rodziny *Geobacteraceae* i wzmożone wytrącanie uraninitu. Stwierdzono 70% obniżenie zawartości U(VI). Jednak po pewnym czasie dominującą grupą stały się bakterie redukujące siarczany, które utleniały octan. Spowodowane to było głównie wyczerpaniem się związków żelaza Fe(III). W efekcie nastąpił wzrost ilości uranu (VI) w badanym środowisku. Bakterie redukujące siarczany również redukowały uran (VI) do U(IV), ale znacznie mniej efektywnie w porównaniu do stanu, gdy w badanym środowisku dominowała rodzina *Geobacteraceae* [2]. W trzecim miesiącu opisanego eksperymentu pobrano próbkę osadu dennego i wyizolowano z niej nowy gatunek należący do rodzaju *Geobacter* – *Geobacter uranii-reducens* [91].

W obecności azotanów nie obserwuje się redukcji U(VI) do U(IV) zarówno w badaniach *in situ* jak i w warunkach laboratoryjnych w czystych hodowlach *G. metallireducens* oraz w próbkach pobranych z różnych miejsc skażonych uranem. We wszystkich tych układach zredukowany jest jon azotanowy [21, 23, 90]. Istnieje kilka przyczyn tego zjawiska. Po pierwsze, reakcja redukcji jonu azotanowego jest bardziej korzystna termodynamicznie dla bakterii redukujących żelazo zdolnych też do redukcji  $\text{NO}_3^-$  niż reakcja redukcji uranu (VI). Po drugie, w naturalnych środowiskach redukcja metali jest energetycznie mniej korzystną formą oddychania beztlenowego w porównaniu z redukcją azotanów i konkurencję wygrywają bakterie denitryfikacyjne. Po trzecie, zredukowane formy U(IV) podobnie jak Fe(II) mogą być utleniane w obecności azotanów przez bakterie denitryfikacyjne, a nawet przez same FRM. Poza tym utlenianie zarówno U (IV) oraz żelaza Fe(II) może zachodzić abiotycznie [23].

Bardzo ważnym odkryciem z punktu widzenia zastosowania rodzaju *Geobacter* do bioremediacji terenów skażonych uranem (VI) było wykazanie, że dawcą elektronów do procesów redukcji prowadzonych przez te bakterie może być grafitowa elektroda [29]. Takie elektrody pokryte biofilmem bakteryjnym umieszczano w miejscach skażonych uranem (VI). Stanowiły one źródło elektronów do mikrobiologicznej reakcji redukcji U(VI) do U(IV). Takie rozwiązanie znacznie ułatwia usuwanie wytrąconego uraninitu ze środowiska, gdyż osadza się on na powierzchni elektrod [30].

Produktem rozszczepienia uranu jest technet  $^{99}\text{Tc}$ . Występuje w dużych ilościach w miejscach testowania broni jądrowej oraz tam, gdzie składowane są odpady radioaktywne. Okres półtrwania technetu  $^{99}\text{Tc}$  jest bardzo długi i wynosi 213 tysięcy lat. W środowisku Tc występuje na +7 stopniu utlenienia w postaci jonu  $\text{TcO}_4^-$ , który może być włączany w łańcuch pokarmowy jako analog siarczanów. Technet Tc(VII) może ulegać mikrobiologicznej redukcji, w wyniku czego powstaje nierozpuszczalny tlenek  $\text{TcO}_2$ , w którym technet występuje na +4 stopniu utlenienia. W takiej postaci technet może być stosunkowo łatwo usunięty ze środowiska. Pokazano dwa mechanizmy redukcji Tc(VII) do Tc(IV) dla *G. sulfurreducens*. W pierwszym technet zredukowany jest enzymatycznie przy jednoczesnym utlenianiu wodoru. Uważa się, że funkcją reduktazy Tc(VII) pełni hydrogenaza. Drugi mechanizm zakłada, że Tc(VII) może ulegać redukcji do Tc(IV) pośrednio w sposób abiotyczny przez zredukowane kwasy humusowe oraz magnetyt. Wytrącony  $\text{TcO}_2$  osadza się na powierzchni kryształów magnetytu. Do redukcji technetu oprócz *G. sulfurreducens* zdolny jest także *G. metallireducens* i inny przedstawiciel grupy FRM, *S. putrefaciens* [51], a także *E. coli* (mechanizm redukcji opisany w rozdz. 3) [52, 53] czy *D. desulfuricans*.

W przypadku tej ostatniej, gdy donorem elektronów był wodór lub mrówczan, a akceptorem elektronów jon  $\text{TcO}_4^-$  zamiast siarczanu w warunkach beztlenowych, następowało utlenienie wodoru lub mrówczanu z jednoczesną redukcją  $\text{TcO}_4^-$  do nierozpuszczalnego siarczku Tc. Wynik ten wskazywał na enzymatyczną redukcję Tc(VII), którą przeprowadza peryplazmatyczna hydrogenaza. Oprócz tego jon  $\text{TcO}_4^-$  może być zredukowany abiotycznie do siarczku technetu w reakcji z siarkowodorem, powstałym w wyniku aktywności bakterii redukujących siarczany [53, 54].

Członkowie rodzin *Geobacteraceae* oraz *Shewanellaceae* są modelowymi organizmami w badaniach nad zastosowaniem bakterii redukujących żelazo do bioremediacji terenów skażonych uranem czy metalami ciężkimi. Jak wiadomo bakterie z rodzin *Geobacteraceae* oraz *Shewanellaceae* są neutrofilami. Poddano zatem analizie konsorcja redukujące żelazo i uran, z podpowierzchniowych osadów z terenów skażonych uranem i azotanami, o niskim pH. Metodą analizy sekwencji genu kodującego 16S rRNA z DNA pochodzącego z pobranych próbek osadów wykazano znaczny udział fakultatywnych beztlenowców zdolnych do redukcji żelaza należących do rodzaju *Anaeromyxobacter* [82].

Wykazano również, że przedstawiciel rodziny *Geobacteraceae*, *G. metallireducens*, jest zdolny do pozyskania energii w wyniku utleniania materii organicznej w połączeniu z redukcją wanadu V(V) do V(IV). Wanad jest naturalnie występującym metalem skorupy ziemskiej w ilościach podobnych do cynku. Do środowiska dostaje się również, w ilościach powodujących jego skażenie, wraz z odpadami z przemysłu wydobywczego, metalurgicznego, farmaceutycznego oraz nowoczesnych technologii. Wanad może występować w środowisku na +3, +4 i +5 stopniu utlenienia. Najbardziej toksyczną formą jest V(V). Związki V(V) są rozpuszczalne w wodzie. Wanad na stopniu utlenienia +4 jest nierozpuszczalny w wodzie. Występuje w postaci kationów  $\text{VO}^{2+}$ , które ulegają adsorpcji na cząsteczkach kwasów humusowych i tworzą z nimi trwałe kompleksy. Zatem przekształcenie formy V(V) do V(IV) może stanowić metodę immobilizacji wanadu a następnie usuwanie go ze skażonych terenów [80].

Bakterie z rodzaju *Geobacter* oraz bakterie ekstremofilne jak *Pyrobaculum islandicum* mogą też redukować Hg(II) do Hg(0), Cr(VI) do Cr(III), czy Co(III) do Co(II) [49, 64].

Redukcja metali niezwiązana z pozyskiwaniem energii niezbędnej do życia jest dość szeroko rozpowszechniona wśród bakterii i odgrywa dużą rolę w krążeniu różnych metali w przyrodzie. Procesy te mają szczególnie istotne znaczenie dla środowiska z powodu przekształcania różnych toksycznych metali w formy mniej toksyczne, łatwe do usunięcia. Do

tych metali należą: selen [redukcja Se(VI), Se(IV), Se(0) przez różne gatunki *Clostridium*, *Citrobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*], chrom [redukcja Cr(VI) do Cr(III) przez różne gatunki *Pseudomonas*, *Bacillus* oraz *Aeromonas dechromatica*, *Achromobacter eurydice*, *Micrococcus roseus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Desulfovibrio desulfuricans*], rtęć [redukcja Hg(II) do Hg(0)], technet [redukcja Tc(VII) do Tc(IV) przez rodzaj *Moraxella* i *Planococcus*], wanad [redukcja V(V) do V(IV) przez gatunki *Pseudomonas*], molibden [redukcja Mo(V) do Mo(IV) przez *Pseudomonas guillermontii*, *Micrococcus* sp., *Acidithiobacillus ferrooxidans*, gatunki *Sulfolobus*], miedź [redukcja Cu(II) do Cu(I) przez *A. ferrooxidans*], palad [redukcja Pd(II) do Pd(0) przez *Desulfovibrio desulfuricans*] [64].

Zdolność mikroorganizmów do redukcji metali zarówno mającej na celu produkcję energii (*G. metallireducens*) jak i będącej procesem ubocznym (*E. coli*, *D. desulfuricans*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*) można też wykorzystać do otrzymywania cennych kruszców jakimi są złoto i srebro. W wyniku redukcji rozpuszczalnych form Au(III) lub Au(I) powstaje złoto metaliczne, a Ag(I) metaliczne srebro [18, 64].

## 6. Podsumowanie

Wyniki dotychczasowych badań nad FRM wskazują, że energia pozyskiwana do wzrostu i rozwoju z dysymilacyjnej redukcji Fe(III) oraz Mn(IV) i innych metali wpływa istotnie na cykle biogeochemiczne w środowiskach beztlenowych. FRM tworzą „superrodzinę”, do której należą różnorodne taksony z domeny *Bacteria* jak i domeny *Archaea*. FRM są także ważnym czynnikiem w procesie bioremediacji zarówno zanieczyszczeń organicznych oraz metalami ciężkimi i pierwiastkami promieniotwórczymi w beztlenowych warstwach środowisk mezofilnych jak i psychrofilnych, termofilnych i hypertermofilnych. FRM znalazły również zastosowanie w MFC jako czynnik produkujący energię elektryczną. FRM wykształciły szereg mechanizmów umożliwiających redukcję rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych związków Fe(III), Mn(IV) i innych metali.

## 7. Piśmiennictwo

1. Afkar E., Reguera G., Schiffer M., Lovley D.R.: A novel *Geobacteraceae*-specific outer membrane protein J (OmpJ) is essential for electron transport to Fe(III) and Mn(IV) oxides in *Geobacter sulfurreducens*. *BMC Microbiol.* **5**, 41 (2005)
2. Anderson R.T., Lovley D.R. i wsp.: Stimulating the in situ activity of *Geobacter* species to remove uranium from the groundwater of a uranium-contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5884–5891 (2003) (wyżej cytowana praca jest dziełem 13 autorów)
3. Beliaev A.S., Saffarini D.A., McLaughlin J.M., Hunnicut D.: MtrC, an outer membrane decahaem c cytochrome required for metal reduction in *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Mol. Microbiol.* **39**, 722–730 (2001)
4. Beliaev A.S., Saffarini D.A.: *Shewanella putrefaciens* mtrB encodes an outer membrane protein required for Fe(III) and Mn(IV) reduction. *J. Bacteriol.* **180**, 6292–6297 (1998)
5. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2<sup>nd</sup> Edition, Springer, New York 2001/2005
6. Bond D.R., Lovley D.R.: Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1548–1555 (2003)
7. Bond D.R., Holmes D.E., Tender L.M., Lovley D.R.: Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science*, **295**, 483–485 (2002)
8. Bond D.R., Lovley D.R.: Evidence for involvement of an electron shuttle in electricity generation by *Geothrix fermentans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 2186–2189 (2005)
9. Boone D.R., Liu Y., Zhao Z.J., Balkwill D.L., Drake G.R., Stevens T.O., Aldrich H.C.: *Bacillus infernus* sp. nov., an Fe(III)- and Mn(IV)-reducing anaerobe from the deep terrestrial subsurface. *Int. J. System. Bacteriol.* **45**, 441–448 (1995)
10. Bretschger O., K.H. Nealson i wsp.: Current production and metal oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 wild type and mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 7003–7011 (2007) (wyżej cytowana praca jest dziełem 18 autorów)
11. Bullen R.A., Arnot T.C., Lakeman J.B., Walsh F.C.: Biofuel cells and their development. *Biosens. Bioelectron.* **21**, 2015–2045 (2006)
12. Butler J.E., Kaufmann F., Coppi M.V., Nunez C., Lovley D.R.: MacA, A diheme c-type cytochrome involved in Fe(III) reduction by *Geobacter sulfurreducens*. *J. Bacteriol.* **186**, 4042–4045 (2004)
13. Caccavo F., Coates J.D., Rossello-Mora R.A., Ludwig W., Schleifer K.H., Lovley D.R., McInerney M.J.: *Geovibrio ferrireducens*, a phylogenetically distinct dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium. *Arch. Microbiol.* **165**, 370–376 (1996)
14. von Canstein H., Ogawa J., Shimizu S., Lloyd J.R.: Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 615–623 (2008)
15. Chaudhuri S.K., Lovley D.R.: Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nature Biotechnol.* **21**, 1229–1232 (2003)
16. Cummings D.E., Caccavo F., Spring S., Rosenzweig R.F.: *Ferribacterium limneticum*, gen. nov., sp. nov., an Fe(III)-reducing microorganism isolated from mining-impacted freshwater lake sediments. *Arch. Microbiol.* **171**, 183–188 (1999)
17. DeLong E.F., Chandler P.: Power from the deep. *Nature Biotechnol.* **20**, 788–789 (2002)
18. Deplanche K., Macaskie L.E.: Biorecovery of gold by *Escherichia coli* and *Desulfovibrio desulfuricans*. *Biotechnol. Bioeng.* **99**, 1055–1064 (2008)
19. DiChristina T.J., Moore C.M., Haller C.A.: Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction by *Shewanella putrefaciens* requires *ferA*, a homolog of the *pulE* (*gspE*) type II protein secretion gene. *J. Bacteriol.* **184**, 142–151 (2002)
20. Ehrlich H.L., Geomicrobiology of iron (w) Geomicrobiology, red. H.L. Ehrlich, Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, 2002, s. 345.

21. Elias D.A., Krumholz L.R., Wong D., Long P.E., Sufilita J.M.: Characterization of microbial activities and U reduction in a shallow aquifer contaminated by uranium mill tailings. *Microb. Ecol.* **46**, 83–91 (2003)
22. Esteve-Nunez A., Sosnik J., Visconti P., Lovley D.R.: Fluorescent properties of *c*-type cytochromes reveal their potential role as an extracytoplasmic electron sink in *Geobacter sulfurreducens*. *Environ. Microbiol.* **10**, 497–505 (2008)
23. Finneran K.T., Housewright M.E., Lovley D.R.: Multiple influences of nitrate on uranium solubility during bioremediation of uranium-contaminated subsurface sediments. *Env. Microbiol.* **4**, 510–516 (2002)
24. Francis C.A., Obraztsova A.Y., Tebo B.M.: Dissimilatory metal reduction by the facultative anaerobe *Pantoea agglomerans* SP1. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 543–548 (2000)
25. Fredrickson J.K., Kostandarites H.M., Li S.W., Plymale A.E., Daly M.J.: Reduction of Fe(III), Cr(VI), U(VI), and Tc(VII) by *Deinococcus radiodurans* R1. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2006–2011 (2000)
26. Glasauer S., Langley S., Boyanov M., Lai B., Kemner K., Beveridge T.J.: Mixed-valence cytoplasmic iron granules are linked to anaerobic respiration. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 993–996 (2007)
27. Glasauer S., Langley S., Beveridge T.J.: Intracellular manganese granules formed by a subsurface bacterium. *Environ. Microbiol.* **6**, 1042–1048 (2004)
28. Gorby Y.A., Fredrickson J.K. i wsp.: Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 11358–11363 (2006) (wyżej cytowana praca jest dziełem 24 autorów)
29. Gregory K.B., Bond D.R., Lovley D.R.: Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration. *Environ. Microbiol.* **6**, 596–604 (2004)
30. Gregory K.B., Lovley D.R.: Remediation and recovery of uranium from contaminated subsurface environments with electrodes. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 8943–8947 (2005)
31. Heidelberg J.F. C.M. Fraser i wsp.: Genome sequence of the dissimilatory metal iron-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *Nature Biotechnol.* **20**, 1118–1123 (2002) (wyżej cytowana praca jest dziełem 43 autorów)
32. Holmes D.E., Finneran K.T., O’Neil R.A., Lovley D.R.: Enrichment of *Geobacteraceae* associated with stimulation of dissimilatory metal reduction in uranium-contaminated aquifer sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2300–2306 (2002)
33. Holmes D.E., Bond D.R., Lovley D.R.: Electron transfer by *Desulfobulbus propionicus* to Fe(III) and graphite electrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1234–1237 (2004)
34. Holmes D.E., Bond D.R., O’Neil R.A., Reimers C.E., Tender L.R., Lovley D.R.: Microbial communities associated with electrodes harvesting electricity from a variety of aquatic sediments. *Microb. Ecol.* **48**, 178–190 (2004)
35. Holmes D.E., Nicoll J.S., Bond D.R., Lovley D.R.: Potential role of a novel psychrotolerant member of the family *Geobacteraceae*, *Geopsychrobacter electrophilus* gen. nov., sp. nov., in electricity production by a marine sediment fuel cell. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 6023–6030 (2004)
36. Holmes D.E., Chaudhuri S.K., Nevin K.P., Mehta T., Methe B.A., Liu A., Ward J.E., Woodard T.L., Webster J., Lovley D.R.: Microarray and genetic analysis of electron transfer to electrodes in *Geobacter sulfurreducens*. *Environ. Microbiol.* **8**, 1805–1815 (2006)
37. Kanso S., Greene A.C., Patel B.K.C.: *Bacillus subterraneus* sp. nov., an iron- and manganese-reducing bacterium from a deep subsurface Australian thermal aquifer. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* **52**, 869–874 (2002)
38. Kashefi K., Holmes D.E., Baross J.A., Lovley D.R.: Thermophily in the *Geobacteraceae*: *Geothermobacter ehrlichii* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic member of the *Geobacteraceae* from the “Bag City” hydrothermal vent. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2985–2993 (2003)
39. Kashefi K., Holmes D.E., Lovley D.R., Tor J.M.: Potential importance of dissimilatory Fe(III)-reducing microorganisms in hot sedimentary environments (w) The Subseafloor Biosphere at Mid-Ocean Ridges, Geophysical Monograph Series 144, 2004, str. 199.
40. Kashefi K., Moskowicz B.M., Lovley D.R.: Characterization of extracellular minerals produced during dissimilatory Fe(III) and U(VI) reduction at 100°C by *Pyrobaculum islandicum*. *Geobiology*, **6**, 147–154 (2008)
41. Kim B.H., Qian X., Leang C., Coppi M.V., Lovley D.R.: Two putative *c*-type multiheme cytochromes required for the expression of OmcB, an outer membrane protein essential for optimal Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *J. Bacteriol.* **188**, 3138–3142 (2006)
42. Kim B.H., Leang C., Ding Y.-H. R., Glaven R.H., Coppi M.V., Lovley D.R.: OmcF, a putative *c*-type monoheme outer membrane cytochrome required for the expression of outer membrane cytochromes in *Geobacter sulfurreducens*. *J. Bacteriol.* **187**, 4505–4513 (2005)
43. Kim H.J., Park H.S., Hyun M.S., Chang I.S., Kim M., Kim B.H.: A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Enzyme Microb. Technol.* **30**, 145–152 (2002)
44. Kim H.J., Hyun M.S., Chang I.S., Kim B.H.: A Microbial Fuel Cell Type Lactate Biosensor Using a Metal-Reducing Bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 365–367 (1998)
45. Kusel K., Dorsch T., Acker G., Stackebrandt E.: Microbial reduction of Fe(III) in acidic sediments: isolation of *Acidiphilum cryptum* JF-5 capable of coupling the reduction of Fe(III) to the oxidation of glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3633–3640 (1999)
46. Leang C., Coppi M.V., Lovley D.R.: OmcB, a *c*-type polyheme cytochrome, involved in Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *J. Bacteriol.* **185**, 2096–2103 (2003)
47. Lies D.P., Hernandez M.E., Kappler A., Mielke R.E., Gralnick J.A., Newman D.K.: *Shewanella oneidensis* MR-1 uses overlapping pathways for iron reduction at a distance and by direct contact under conditions relevant for biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 4414–4426 (2005)
48. Lin W.C., Coppi M.V., Lovley D.R.: *Geobacter sulfurreducens* can grow with oxygen as a terminal electron acceptor. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 2525–2528 (2004)
49. Lloyd J.R., Lovley D.R.: Microbial detoxification of metals and radionuclides. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 248–253 (2001)
50. Lloyd J.R., Leang C., Hodges-Myerson A.L., Coppi M.V., Cuifo S., Methe B., Sandler S.J., Lovley D.R.: Biochemical and genetic characterization of PpCA, a periplasmic *c*-type cytochrome in *Geobacter sulfurreducens*. *Biochem. J.* **369**, 153–161 (2003)
51. Lloyd J.R., Sole V.A., van Praagh C.V.G., Lovley D.R.: Direct and Fe(II)-mediated reduction of technetium by Fe(III)-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3743–3749 (2000)

52. Lloyd J.R., Cole J.A., Macaskie L.E.: Reduction and removal of heptavalent technetium from solution by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**, 2014–2021 (1997)
53. Lloyd J.R., Thomas G.H., Finlay J.A., Cole J.A., Macaskie L.E.: Microbial reduction of technetium by *Escherichia coli* and *Desulfovibrio desulfuricans*: Enhancement via the use of high-activity strains and effect of process parameters. *Bio-technol. Bioeng.* **66**, 122–130 (1999)
54. Lloyd J.R., Nolting H.-F., Sole V.A., Bosecker K., Macaskie L.E.: Technetium reduction and precipitation by sulfate-reducing bacteria. *Geomicrobiol. J.* **15**, 45–58 (1998)
55. Logan B.E.: Microbial fuel cells, red. B.E. Logan, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA, 2008.
56. Lovley D.R.: Microbial energizers: fuel cells that keep on going. *Microbe*, **1**, 323–329 (2006)
57. Lovley D.R.: Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 497–508 (2006)
58. Lovley D.R.: Microbial fuel cells: novel microbial physiologies and engineering approaches. *Curr Opin. Biotechnol.* **17**, 327–332 (2006)
59. Lovley D.R.: Taming electricigens. *The Scientist*, July 2006, 46
60. Lovley D.R.: Anaerobes to the rescue. *Science*, **293**, 1444–1446 (2001)
61. Lovley D.R., Fe(III) and Mn(IV) reduction (w) Environmental Microbe-Metal Interactions, red. D.R. Lovley. ASM Press Washington, D.C., 2000, s. 3.
62. Lovley D.R.: Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiol. Rev.* **55**, 259–287 (1991)
63. Lovley D.R.: Dissimilatory reduction of iron and uranium (w) Trends in Microbial Ecology, red. R. Guerrero i C. Pedros-Alio. Spanish Society for Microbiology Barcelona, 1993, s. 71.
64. Lovley D.R.: Dissimilatory metal reduction. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 263–290 (1993)
65. Lovley D.R., Philips E.P.: Reduction of chromate by *Desulfovibrio vulgaris* and its *c<sub>3</sub>* cytochrome. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 726–728 (1994)
66. Lovley D.R., Philips E.J.P., Lonergan D.J., Widman P.K.: Fe(III) and S<sup>0</sup> reduction by *Pelobacter carbinolicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2132–2138 (1995)
67. Lovley D.R., Holmes D.E., Nevin K.P.: Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Adv. Microbiol. Physiol.* **49**, 219–286 (2004)
68. Lovley D.R., Fraga J.L., Coates J.D., Blunt-Harris E.L.: Humics as an electron donor for anaerobic respiration. *Environ. Microbiol.* **1**, 89–98 (1999)
69. Lovley D.R., Fraga J.L., Blunt-Harris E.L., Hayes L.A., Phillips E.J., Coates D.J.: Humic substances as a mediator for microbially catalyzed metal reduction. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **26**, 152–157 (1998)
70. Lovley D.R., Woodward J.C., Chappelle F.H.: Rapid anaerobic benzene oxidation with a variety of chelated Fe(III) forms. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 288–291 (1996)
71. Maier T.M., Myers C.R.: The outer membrane protein Omp35 affects the reduction of Fe(III), nitrate, and fumarate by *Shewanella oneidensis* MR-1. *BMC Microbiol.* **4**, 23 (2004)
72. Mattick J.S.: Type IV pili and twitching motility. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 289–314 (2002)
73. Mehta T., Childers S.E., Glaven R., Lovley D.R., Mester T.: A putative multicopper protein secreted by an atypical type II secretion system involved in the reduction of insoluble electron acceptors in *Geobacter sulfurreducens*. *Microbiology*, **152**, 2257–2264 (2006)
74. Mehta T., Coppi M.V., Childers S.E., Lovley D.R.: Outer membrane *c*-type cytochromes required for Fe(III) and Mn(IV) oxide reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8634–8641 (2005)
75. Methe B.A., C.M. Fraser I wsp.: Genom of *Geobacter sulfurreducens*: metal reduction in subsurface environments. *Science*, **302**, 1967–1969 (2003) (wyżej cytowana praca jest dziełem 34 autorów)
76. Morris J.M., Jin S.: Feasibility of using microbial fuel cell technology for bioremediation of hydrocarbons in groundwater. *J. Env. Sci. Health*, **43**, 18–23 (2008)
77. Myers C.R., Myers J.: Cloning and sequence of *cymA*, a gene encoding a tetraheme cytochrome *c* required for reduction of iron (III), fumarate and nitrate by *Shewanella putrefaciens* MR-1. *J. Bacteriol.* **179**, 1143–1152 (1997)
78. Nevin K.P., Lovley D.R.: Mechanisms for accessing insoluble Fe(III) oxide during dissimilatory Fe(III) reduction by *Geothrix fermentans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2294–2299 (2002)
79. Nevin K.P., Lovley D.R.: Mechanisms for Fe(III) oxide reduction in sedimentary environments. *Geomicrobiol. J.* **19**, 141–159 (2002)
80. Ortiz-Bernard I., Anderson R.T., Vrionis H.A., Lovley D.R.: Vanadium respiration by *Geobacter metallireducens*: novel strategy for in situ removal of vanadium from groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3091–3095 (2004)
81. Park H.S., Kim B.H., Kim H.S., Kim H.J., Kim G.T., Kim M., Ch I.S., Park Y.K., Chang H.I.: A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Clostridium butyricum* isolated from a microbial fuel cell. *Anaerobe*, **7**, 297–306 (2001)
82. Petrie L., North N.N., Dollhopf S.L., Balkwill D.L., Kostka J.E.: Enumeration and characterization of iron(III)-reducing microbial communities from acidic subsurface sediments contaminated with uranium. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 7467–7479 (2003)
83. Pham C.A., Jung S.J., Phung N.T., Lee J., Chang I.S., Kim B.H., Yi H., Chun J.: A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Aeromonas hydrophila*, isolated from a microbial fuel cell. *FEMS Microbiol. Lett.* **223**, 129–134 (2003)
84. Reguera G., McCarthy K.D., Mehta T., Nicoll J.S., Tuominen M.T., Lovley D.R.: Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*, **435**, 1098–1101 (2005)
85. Reguera G., Nevin K.P., Nicoll J.S., Covalla S.F., Woodard T.L., Lovley D.R.: Biofilm and nanowire production leads to increased current in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 7345–7348 (2006)
86. Reguera G., Pollina R.B., Nicoll J.S., Lovley D.R.: Possible nonconductive role of *Geobacter sulfurreducens* pilus nanowires in biofilm formation. *J. Bacteriol.* **189**, 2125–2127 (2007)
87. Richter H., Lanthier M., Nevin K.P., Lovley D.R.: Lack of electricity production by *Pelobacter carbinolicus* indicates that the capacity for Fe(III) oxide reduction does not necessarily confer electron transfer ability to fuel cell anodes. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 5347–5353 (2007)
88. Richter H., McCarthy K., Nevin K.P., Johnson J.P., Rotello V.M., Lovley D.R.: Electricity generation by *Geobacter sulfurreducens* attached to gold electrodes. *Langmuir*, **24**, 4376–4379 (2008)
89. Schlesinger W.H.: Biogeochemistry: an analysis of global change. Academic Press, San Diego, 1997
90. Senko J.M., Istok J.D., Suflita J.M., Krumholz L.R.: In-situ evidence for uranium immobilization and remobilization. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 1491–1496 (2002)

91. Shelobolina E.S., Vrionis H.A., Findlay R.H., Lovley D.R.: *Geobacter uraniireducens* sp. nov., isolated from subsurface sediment undergoing uranium bioremediation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 1075–1078 (2008)
92. Shi L., T.C. Squier i wsp.: Isolation of a high-affinity functional protein complex between OmcA and MtrC: two outer membrane decaheme *c*-type cytochromes of *S. oneidensis* MR-1. *J. Bacteriol.* **188**, 4705–4714 (2006) (wyżej cytowana praca jest dziełem 17 autorów)
93. Shi L., Squier T.C., Zachara J.M., Fredrickson J.K.: Respiration of metal (hydr)oxides by *Shewanella* and *Geobacter*: a key role for multiheme *c*-type cytochromes. *Mol. Microbiol.* **65**, 12–20 (2007)
94. Sikora A., Sikora R.: Mikrobiologiczne ogniwa paliwowe (Microbial fuel cells). *Biotechnologia Monografie*, **2(2)**, 68–77 (2005)
95. Slobodkin A.I.: Thermophilic microbial metal reduction. *Microbiology*, **74**, 501–514 (2005)
96. Suzuki Y., Kelly S.D., Kemner K.M., Banfield J.F.: Direct microbial reduction and subsequent preservation of uranium in natural near-surface sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1790–1797 (2005)
97. Tender L.M., Reimers C.E., Stecher H.A., Holmes D.E., Bond D.R., Lowy D.A., Pilobello K., Fertig S.J., Lovley D.R.: Harnessing microbially generated power on the seafloor. *Nature Biotechnol.* **20**, 821–825 (2002)
98. Vandieken V., Muâmann M., Niemann H., Jorgensen B.B.: *Desulfuromonas svalbardensis* sp. Nov. And *Desulfuromusa ferrireducens* sp. Nov., psychrophilic, Fe(III)-reducing bacteria isolated from Arctic sediments, Svalbard. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* **56**, 1133–1139 (2006)
99. Yanke L.J., Bryant R.D., Laishley E.J.: Hydrogenase I of *Clostridium pasteurianum* functions as a novel selenite reductase. *Anaerobe*, **1**, 61–67 (1995)
100. Ye Q., Roh Y., Carroll S.L., Blair B., Zhou J., Zhang C.L., Fields M.W.: Alkaline anaerobic respiration: isolation and characterization of a novel alkaliphilic and metal-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5595–5602 (2004)

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

Magdalena Skóra\*, Jadwiga Witalis, Paweł Krzyściak, Anna B. Macura

Zakład Mykologii Katedry Mikrobiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Wpłynęło w styczniu 2009 r.

1. Wstęp. 2. Taksonomia. 3. Występowanie. 4. Morfologia. 5. Fizjologiczne i biochemiczne właściwości. 6. Chorobotwórczość. 7. Wrażliwość na leki i leczenie. 8. Podsumowanie

### Fungal genus *Geotrichum*: an opportunistic pathogen of humans

**Abstract:** Fungi belonging to *Geotrichum* genus are widespread in nature. They have been used in food industry and biotechnological research for many years. However, a lack of definite answer to the question concerning their position in taxonomy is intriguing, as well as their role in the pathogenesis of diseases in humans. Even morphology of these fungi is of interest because they are located on the borderline between typical yeast-like fungi and moulds.

Our overview of literature is focused mainly on the medical aspect because the fungi deserve thorough attention as opportunistic human pathogens, even though their low pathogenicity has been reported.

*Geotrichum* sp. is a causative agent of geotrichosis. The foci of infection are localized mainly in lungs and bronchi, however they also may appear in the skin and gastrointestinal tract. Cases of septicemia and disseminated infections were also reported. *G. candidum* is the species most often identified as the cause of geotrichosis. The disease most often develops in immunocompromised persons: patients with haemopoietic system malignancies under chemotherapy, under long lasting antibiotic and steroid therapy and in diabetics. *In vitro* investigations gave evidence that *G. candidum* is susceptible to amphotericin B, clotrimazole, 5-fluorocytosine and miconazole, however, some strains are highly resistant to azoles as well as to amphotericin B and nystatin. Now that there are no guidelines concerning the treatment of *Geotrichum* infections, the choice of a proper treatment should be based on the drug susceptibility of the fungal strain isolated and on clinical condition of the patient.

1. Introduction. 2. Taxonomy. 3. Occurrence. 4. Morphology. 5. Physiology and biochemical properties. 6. Pathogenicity. 7. Drugs susceptibility and treatment. 8. Summary

---

**Słowa kluczowe:** geotrichoza, *Geotrichum*, *Geotrichum candidum*, grzybnice oportunistyczne

**Key words:** geotrichosis, *Geotrichum*, *Geotrichum candidum*, opportunistic mycoses

---

## 1. Wstęp

Wśród setek publikacji z ostatnich lat, dotyczących grzybów z rodzaju *Geotrichum*, zdecydowanie dominuje tematyka biotechnologiczna. Informacje na temat roli tych grzybów jako patogenów człowieka, są nieliczne. Dodatkowo, po reklasyfikacji takich gatunków, jak *Geotrichum clavatum* (obecnie *Saprochaete clavata*) i *G. capitatum* (obecnie *Magnusiomyces capitatus*), wydawać by się mogło, że pozostałe gatunki, w tym najpowszechniej występujący *Geotrichum candidum*, nie odgrywają w patologii większej roli. Tymczasem lekarze praktycy spotykają się z problemem interpretacji wyników badań mykologicznych w wypadkach izolacji *G. candidum*. Czy zawsze uznawać ten gatunek za składnik flory fizjologicznej, czy za kontaminację, czy jednak za gatunek patogenny? Treścią artykułu jest przedstawienie stanu wiedzy na temat chorobotwórczości tych grzybów oraz zwięzła charakterystyka ich właściwości.

## 2. Taksonomia

Rodzaj *Geotrichum* znany jest od prawie 200 lat. W 1809 roku H. F. Link na łamach *Magazin der Gesellschaft Naturforschenden Freunde* użył nazwy *G. candidum* (*geo* = ziemia i *trichus* = włosy, *candidum* = czysto biały) do opisanego izolowanych z ziemi grzybów, które scharakteryzował: *Sporidia magna, extremitatibus truncatis genus designant* (w wolnym tłumaczeniu: wielkie zarodniki, ze ściętymi końcami są charakterystyczne dla rodzaju). Od tego czasu opisano szereg gatunków w wielu rodzajach wykazujących podobieństwo morfologiczne do *Geotrichum*. Powstało w ten sposób około setki synonimowych opisów, z których najczęstszym jest podany przez Fresenius w 1950 r. *Oidium lactis*.

Klasyfikacja grzybów drożdżopodobnych wytwarzających artrokonidia przez długi czas pozostawała problematyczna. Szczepy pączkujące wytwarzające pseudogrzybnię i grzybnię z artrokonidiami były

---

\* Autor do korespondencji: Zakład Mykologii Katedry Mikrobiologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, ul. Czysza 18, 31-212 Kraków; tel.: 012 633 08 77 wewn. 231, fax: 012 423 39 24, e-mail: bohnia@gmail.com

włączone w rodzaj *Trichosporon*, a niepączkujące i bez pseudogrzybni w rodzaj *Geotrichum* [11, 28]. W badaniach wykazano pokrewieństwo *Trichosporon* z podstawczakami ze względu na skład ściany komórkowej grzybów tego rodzaju. Na tej podstawie *W e i j m a n* zasugerował podział gatunków grzybów wytwarzających artrokonidia na podstawczaki i workowce klasyfikując je odpowiednio jako *Trichosporon* i *Geotrichum* [61]. Mimo, że pączkowanie okazało się nieistotną taksonomiczną cechą, w 1984 roku w *The Yeast, a taxonomic study* workowce i podstawczaki pozostały w rodzaju *Trichosporon* [21]. Taki stan rzeczy budził wątpliwości naukowców. *D e H o o g* zaakceptował zaproponowany przez *W e i j m a n* podział i dokonał pierwszej rewizji taksonomicznej wszystkich gatunków workowców wytwarzających artrokonidia [8]. Od tego czasu powstało szereg prac analizujących relacje filogenetyczne w obrębie tej grupy grzybów. Badania oparte były i są o cechy morfologiczne, fizjologiczne i ekologiczne grzybów, charakterystykę hodowli oraz badania molekularne: reasocjacji jądrowego DNA, zawartości molowo-procentowej zasad G+C DNA genomowego, krzywą termicznej denaturacji DNA i krzywą topnienia DNA; obecnie wykorzystuje się również metody ogólnie zwane PCR-fingerprinting, czy wieloogniskową elektroforezę enzymów.

W 2000 roku ukazała się praca analizująca relacje w obrębie rodzaju *Geotrichum* w oparciu o porównanie sekwencji całego genomu [51].

Stwierdzono jednoznacznie, że *Geotrichum*, *Galactomyces* i *Dipodascus* są związane z drożdżami workowcowymi i powinny być umieszczone w rzędzie *Saccharomycetales*. Analiza genów rDNA dla dużej podjednostki (26S) [24], a także dla małej podjednostki 18S [56] wykazały podział wśród tych gatunków na wyraźne 2 klady, które jednak nie znajdują odzwierciedlenia w różnicowaniu w cechach morfologicznych i ekologii tych mikroorganizmów. Nie odpowiadają też podziałowi *Dipodascus / Galactomyces*.

W 2004 roku *d e H o o g* i *S m i t h* w pracy dokonującej rewizji rodzaju *Geotrichum* wymieniali 6 gatunków (formy anamorfiniczne i teleomorfiniczne uznano jako jeden gatunek) w kladzie *Galactomyces* (dla *G. europaeum* teleomorf nie jest znany), 9 w kladzie *Dipodascus* oraz 17 w dołączonym kladzie *Magnusiomyces* (do którego należy m.in. *Blastoschizomyces capitatus*, wcześniej *Geotrichum capitatum*, przeklasyfikowany jako *Magnusiomyces capitatus* z formą anamorfiniczną *Saprochaete capitata*) [8]. W tabeli I przedstawiono relacje anamorf/teleomorf.

Od tego czasu opisano 5 nowych gatunków *Geotrichum* (głównie z przewodu pokarmowego owadów), a także teleomorfy *Galactomyces britannicum* i *Dipodascus tetrasporus* [25, 34, 42, 52, 62].

Analizując taksonomię i pokrewieństwa filogenetyczne w rodzaju *Geotrichum* należy mieć świadomość, że badania definiujące nowe gatunki oraz porównujące pokrewieństwo międzygatunkowe i międzyrodzajowe oparte są na ograniczonej liczbie szczepów oraz publikowanych sekwencji genetycznych. Dlatego też prawdopodobnym jest, że kolejne odkrycia mogą zmienić obecną systematykę nie tylko na poziomie rodzaju, ale także rodziny, czy rzędów. Wszak jeszcze 30 lat temu łączono ze sobą w obrębie rodzaju *Trichosporon* gatunki należące obecnie do dwóch typów grzybów (*Ascomycetes* i *Basidiomycetes*), a więc taksonów bardzo odległych w kryteriach systematyki organizmów żywych.

### 3. Występowanie

Gatunek *G. candidum*, najpowszechniejszy z rodzaju *Geotrichum*, jest izolowany z różnych materiałów i środowisk. Grzyby te znaleźć można w powietrzu [2] oraz w glebie, szczególnie zanieczyszczonej ściekami miejskimi [1], jak również w wodzie rzecznej [50]. W organizmach ludzi stanowią naturalny składnik flory przewodu pokarmowego, choć są rzadziej izolowane niż grzyby z rodzajów *Candida*, *Rhodotorula* i *Trichosporon* [58]. Występują też w organizmach zwierząt [29], w roślinach, w paszy kiszzonej [38] i artykułach żywnościowych [5, 33, 27, 57]. Na przykład w badaniach cytowanych przez *B o u t r o u*, grzyby tego gatunku znaleziono w 17–40% próbek surowego mleka, ale w stosunkowo niedużych ilościach, bo tylko w 6% próbek były wykryte w ilości większej od 102 cfu/ml (colony forming unit/ml – jednostka tworząca kolonię/ml), niezależnie od pochodzenia: w krowim, kozim i owczym mleku [5]. Jeśli są obecne w surowym mleku, występują też w surowych twarogach, rzadko w pasteryzowanych – wtedy jako kontaminacja, której źródłem jest głównie powietrze. Jednak w produktach mlecznych występują nie tylko jako naturalny składnik. We Francji na przykład od około 30 lat dodawane są celowo do mleka przy produkcji serów jako czynnik przyspieszający dojrzewanie („ripening agent”) [32]. Takie komercyjne szczepy *G. candidum* znalazły zastosowanie w procesach technologicznych przy produkcji miękkich serów, typu Camembert oraz serów półtwardych kozich i owczych. Są istotnym komponentem ich mikroflory – przez wydzielanie lipolitycznych i proteolitycznych enzymów, mają udział w dojrzewaniu serów i tworzeniu ich smaku oraz zapachu [5]. Choć uważa się, że w stanach obniżonej odporności *G. candidum* może powodować oportunistyczne zakażenia, co szczegółowo omówiono w części dotyczącej chorobotwórczości, to retrospektywnie nie stwierdzono chorób pochodzenia pokarmowego związanych z konsumpcją produktów zawierających *G. candidum* [44].



Tabela I

Relacje anamorf/teleomorf (de Hoog 2004) [9]

Klad	Lp.	Teleomorf	Anamorf	Ważniejsze synonimy i bazonimy
<i>Galactomyces</i>	1	<i>Galactomyces geotrichum</i>	nienazwany <i>Geotrichum</i> sp.	<i>Endomyces geotrichum</i> , <i>Dipodascus geotrichum</i>
	2	<i>Galactomyces reessii</i>	nienazwany <i>Geotrichum</i> sp.	<i>Endomyces reessii</i> , <i>Galactomyces reessii</i> , <i>Dipodascus reessii</i>
	3	<i>Galactomyces citriaurantii</i>	<i>Geotrichum citri-aurantii</i>	–
	4	n/n	<i>Geotrichum europaeum</i>	–
	5	<i>Galactomyces pseudocandidus</i>	<i>Geotrichum pseudocandidus</i>	–
	6	<i>Galactomyces candidus</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Geotrichum candidum</i> , <i>Botrytis geotricha</i> , <i>Oidium lactis</i> , <i>Endomyces lactis</i>
<i>Dipodascus</i>	1	<i>Dipodascus albidus</i>	nienazwany <i>Geotrichum</i> sp.	–
	2	<i>Dipodascus australiensis</i>	nienazwany <i>Geotrichum</i> sp.	–
	3	<i>Dipodascus aggregatus</i>	nienazwany <i>Geotrichum</i> sp.	–
	4	<i>Dipodascus geniculatus</i>	brak	–
	5	n/n	<i>Geotrichum fermentas</i>	<i>Trichosporon fermentas</i> , <i>Fermentotrichon fermentas</i>
	6	<i>Dipodascus armillariae</i>	<i>Geotrichum decipiens</i>	–
	7	n/n	<i>Geotrichum restrictum</i>	–
	8	n/n	<i>Geotrichum klebahnii</i>	<i>Trichosporon klebahnii</i> , <i>Endomyces lactis</i> , <i>Trichosporon penicillatum</i> , <i>Geotrichum penicillatum</i>
	9	<i>Dipodascus macrosporus</i>	brak	–
<i>Magnusiomyces</i>	1	<i>Magnusiomyces starmeri</i>	nienazwany <i>Saprochaete</i> sp.	–
	2	<i>Magnusiomyces ovetensis</i>	<i>Saprochaete sericea</i>	<i>Endomyces ovetensis</i> , <i>Dipodascus ambrosiae</i> , <i>Trichosporon sericeum</i> , <i>Geotrichum sericeum</i>
	3	<i>Magnusiomyces tetrasperma</i>	brak	<i>Endomyces tetrasperma</i> , <i>Dipodascus tetrasperma</i>
	4	<i>Magnusiomyces magnusii</i>	<i>Saprochaete ludwigii</i>	<i>Endomyces magnusii</i> , <i>Dipodascus magnusii</i> , <i>Oidium ludwigii</i>
	5	<i>Magnusiomyces spicifer</i>	nienazwany <i>Saprochaete</i> sp.	<i>Dipodascus spicifer</i>
	6	<i>Magnusiomyces capitatus</i>	<i>Saprochaete capitata</i>	<i>Dipodascus capitatus</i> , <i>Trichosporon capitatum</i> , <i>Geotrichum capitatum</i> , <i>Blastoschizomyces capitatus</i> , <i>Geotrichum linkii</i>
	7	n/n	<i>Saprochaete suaveolens</i>	<i>Oidium suaveolens</i> , <i>Geotrichum suaveolens</i> , <i>Endomyces lactis</i>
	8	n/n	<i>Saprochaete gigas</i>	<i>Oospora gigas</i> , <i>Geotrichum gigas</i> , <i>G. magnum</i> , <i>G. rectangulatum</i>
	9	n/n	<i>Saprochaete chiloensis</i>	<i>Schizoblastosporion chiloense</i>
	10	n/n	<i>Saprochaete clavata</i>	<i>Geotrichum clavatum</i>
	11	n/n	<i>Saprochaete saccharophila</i>	–
	12	<i>Magnusiomyces ingens</i>	<i>Saprochaete ingens</i>	<i>Dipodascus ingens</i>
	13	n/n	<i>Saprochaete quercus</i>	–
	14	n/n	<i>Saprochaete japonica</i>	–
	15	n/n	<i>Saprochaete fungicola</i>	–
	16	n/n	<i>Saprochaete psychrophila</i>	–
	17	n/n	<i>Saprochaete ingens</i>	<i>Candida ingens</i> , <i>Geotrichum ingens</i> , <i>Pichia humboldtii</i>

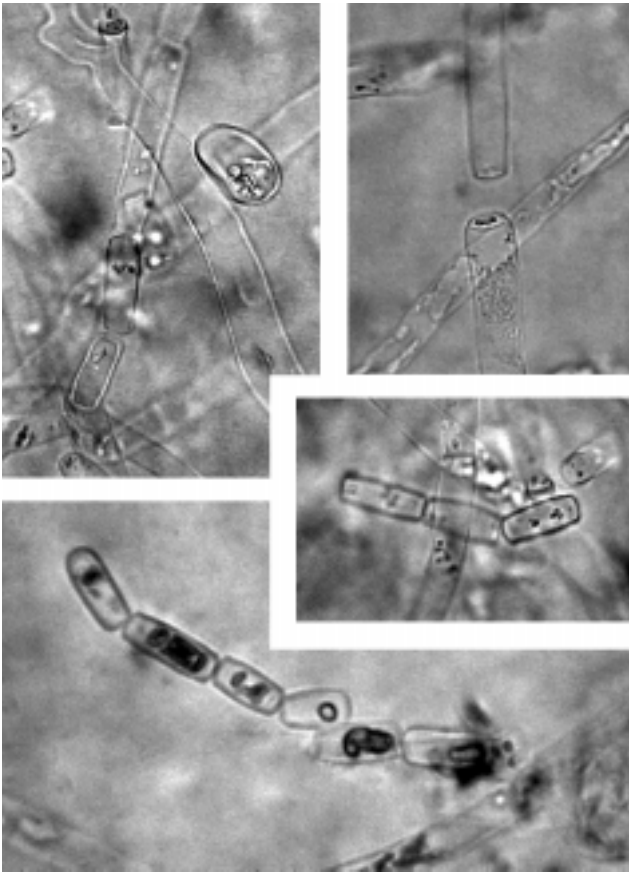
n/n – nieznan

Bazonim – nazwa podstawowa (bazowa) – nazwa pod którą grzyb został po raz pierwszy opisany

#### 4. Morfologia

Szczepy *G. candidum* wykazują morfologiczny polimorfizm, stojąc na granicy pomiędzy typowymi grzybami drożdżopodobnymi i pleśniami, co ma odbicie

w określeniach typu: nitkowaty grzyb drożdżopodobny (*filamentous yeast-like fungus*) [5, 44]. Opiswane są dwa zróżnicowane morfotypy. Jeden charakteryzuje się tworzeniem kolonii drożdżopodobnych o kremowej barwie, które produkują obficie artrospory i generalnie



Rys. 1. Obraz mikroskopowy *Geotrichum* sp. (pow. 1000x). Widoczne prostokątne artrospory. (Autor: Paweł Krzyściak)

wykazują słaby wzrost i aktywność proteolityczną, a optymalna temperatura ich wzrostu to 22–25°C. Ponadto te szczepy zakwaszają podłoże. Drugi morfotyp tworzy podobne do pleśni białe filcowate kolonie, w których dominują wegetatywne strzępki, z nielicznymi artrosporam. Ta postać ma wysoką aktywność proteolityczną, cechuje się szybkim wzrostem w optymalnej temperaturze 25–30°C i alkalinizuje podłoże. Pomiędzy opisanymi dwoma granicznymi morfotypami o cechach form drożdżopodobnych i pleśni są też szczepy o cechach pośrednich [44].

W opisie morfologicznym *G. candidum* Kurnatowska i Kwasińska wyróżniają oprócz artrospor także blastospory i endospory. Wg tych autorek komórki wegetatywne czasem tworzą pseudostrzępki (*pseudomycelium*) i blastospory, zawsze wytwarzają strzępki właściwe (*mycelium*) i z ich rozpadu artrospory, mogą też formować w strzępkach zarodniki wewnętrzne – endospory. Grzybnia zbudowana jest ze strzępek złożonych z długich komórek, rozgałęziających się na końcach dychotomicznie, o wymiarach 8–12 × 30–100 μm, rozpadających się na artrospory, które są wielokątne lub cylindryczne, o wymiarach 3–7 × 5–8 μm [23] (rys. 1).

Stadium doskonałe, rozmnażające się płciowo, wytwarza worki o wymiarach 6–9 × 7–9 μm. Zarodniki

workowe są żółtawo-brązowe, okrągłe lub elipsoidalne, o wymiarach 6–9 × 7–10 μm, z kolczastą ścianą wewnętrzną i nieregularną zewnętrzną, często ze szklistymi równikowymi bruzdami [23].

## 5. Fizjologiczne i biochemiczne właściwości

*G. candidum* cechuje krótki czas generacji (podwojenia biomasy), tj. 1,1 godz. w 30°C w płynnej pożywce, natomiast długa jest faza spoczynkowa lag, która wynosi około 10 godzin [5]. Może wzrastać w szerokim zakresie pH od 3 do 11 wg Garrison i Holder [14], a optymalne pH to wg Lecocq 6,0–7,0 [5], a wg Wyder 5,0–5,5 [5]. W warunkach hodowli *in vitro* wzrasta szybko w temperaturze 25°C i słabo w temp. 37°C, nie rośnie w temp. 40°C [23], natomiast w procesie technologicznym produkcji serów może wzrastać na ich powierzchni w granicach temperatury 5–38°C, z optimum ok. 25°C [5].

*G. candidum* fermentuje glukozę, asymiluje glukozę, galaktozę, D-ksylozę, glicerol i kwas bursztynowy. Większość szczepów przyswaja też sorbitol i te same cukry, które fermentuje oraz glicerol i L-arabinozę, niektóre szczepy przyswajają też sorbitol. Ściana komórkowa tych grzybów nie zawiera ksylozy i fruktozy [23].

Porównując wrażliwość *G. candidum* na naturalne środki grzybobójcze, Mehra i wsp. [30] zbadali barwniki roślinne, używane w przemyśle tekstylnym i przy produkcji dywanów (jako że grzyby, które dostają się do tych materiałów z powietrza, mogą mieć potencjalnie działanie alergizujące). Okazało się, że w stosunku do *G. candidum* działanie grzybobójcze miał wyciąg z krokosza barwierskiego *Carthamus tinctorius*, brak takiego działania stwierdzono w wypadku ekstraktów z orzecha włoskiego *Juglans regia* i mazzany barwierskiej *Rubia tinctorum*.

*G. candidum*, ze względu na możliwość wykorzystania w biotechnologii, jest – poza wspomnianym już serowarstwem – przedmiotem zainteresowania w zastosowaniach między innymi: w produkcji biomasy [37], w biodegradacji plam ropy naftowej [3], w rozkładzie celulozy [26, 46], w procesach słodowania [41], w produkcji mlecznych napojów fermentowanych [53], w przemyśle farmaceutycznym [15, 39] oraz jako źródło enzymów, np. lipazy [31].

## 6. Chorobotwórczość

Grzyby z rodzaju *Geotrichum* cechują się niską chorobotwórczością. W opisanym przypadku zakażeń, gatunkami najczęściej izolowanymi z materiałów klinicznych jako czynnik etiologiczny, były *G. candidum* oraz *G. capitatum* (dawniej *B. capitatus*, obecnie

*Magnusiomyces capitatus* / *Saprochaete capitata*). W niniejszej pracy, z powodu rewizji i reklasyfikacji rodzaju *Geotrichum* w 2004 roku przez zespół de Hoog, ograniczyliśmy się do przedstawienia chorobotwórczości wyłącznie gatunku *G. candidum*.

*G. candidum* należy do fizjologicznej mikroflory skóry i przewodu pokarmowego ludzi. Nie został włączony w Polsce do wykazu szkodliwych czynników biologicznych i nie jest uznawany jako potencjalny patogen spożywczy czy źródło mikotoksyn w produktach spożywczych [12, 44]. Pomimo, że wiele osób, zwłaszcza pracowników przemysłu mleczarskiego, jest narażonych na kontakt ze sporami *G. candidum*, do dnia dzisiejszego nie odnotowano choroby zawodowej związanej z tym gatunkiem [44]. Zakażenia *G. candidum* są bardzo rzadkie. Pottier i wsp. podają, iż w okresie od 1842 roku do 2006 roku stwierdzono mniej niż 100 przypadków infekcji tym gatunkiem [44]. Badacze ci sugerują, iż liczba opisanych przypadków zakażeń *G. candidum* może być zawyżona z powodu nieprawidłowej identyfikacji patogenu (zwłaszcza w starszych publikacjach) oraz problemów związanych z interpretacją wyników badań mikrobiologicznych, gdy zakażeniom *G. candidum* towarzyszyły inne grzyby, bakterie lub wirusy [44]. Do potwierdzenia zakażenia gatunkiem *G. candidum* niezbędna jest kilkukrotna izolacja grzyba z miejsca zmienionego chorobowo, zwłaszcza w przypadku materiałów, w których grzyb ten występuje naturalnie.

*G. candidum* jest mikroorganizmem oportunistycznym. Głównym czynnikiem predysponującym do zakażeń jest stan odporności organizmu. Infekcje dotyczą przede wszystkim pacjentów z chorobami nowotworowymi układu krwiotwórczego, poddawanych chemioterapii, zakażonych HIV, stosujących antybiotyki o szerokim spektrum działania, długotrwanie przyjmujących kortykosteroidy oraz chorych na cukrzycę [44, 48]. W obliczu narastającej liczby osób z defektami immunologicznymi, rola *G. candidum* w zakażeniach grzybiczych może nabierać coraz większego znaczenia, podobnie jak w przypadku innych mikroorganizmów oportunistycznych takich jak: *Rhodotorula* sp., *Fusarium* sp. czy *Scopulariopsis* sp. [4, 13, 22].

*G. candidum* powoduje u ludzi geotrichozę – zakażenie miejscowe, obejmujące różne tkanki i narządy, lub zakażenie rozsiane. Do infekcji może dojść na drodze pokarmowej, a także poprzez inhalację zarodników oraz urazy tkanek [44, 48].

*G. candidum* najczęściej atakuje oskrzela i płuca [44, 45, 47, 60]. Najwięcej doniesień o przypadkach geotrichozy oskrzelowo-płucnej pochodzi z Ameryki Południowej, przy czym zakażenia te odnotowywano również w Ameryce Północnej, Skandynawii, Francji i Wielkiej Brytanii [47]. Objawy geotrichozy oskrzelowo-płucnej są niepatognomiczne i mogą przypominać

nać przewlekłe zapalenie oskrzeli, gruźlicę płuc lub ropień płuc. Odkrztuszenie charakterystycznej, jasno zabarwionej, śluzowatej plwociny, zawierającej szarawe plamy, może sugerować zakażenie *G. candidum* [47, 60]. Forma oskrzelowa jest częstsza i cechuje się stałym kaszlem. Ogólny stan zdrowia jest dobry, a temperatura, puls i oddechy rzadko podwyższone. W badaniu fizykalnym mogą być słyszalne rżenia grubobańkowe. Geotrichozie płucnej z reguły towarzyszą gorączka, szybki puls i oddechy oraz leukocytoza. Plwocina może być podbarwiona krwią, natomiast krwioplucie pojawia się rzadko. Mogą wystąpić: stłumione odgłosy opukowe, zmienione odgłosy oddechowe oraz świsty powyżej miejsca objętego zmianą chorobową. Rentgenogramy klatki piersiowej w obu przypadkach nie są charakterystyczne. Geotrichozę oskrzelowo-płucną należy różnicować z: kandydozą, kryptokokozą, kokcidioidomykozą, histoplazmozą, nocardiozą, bakteryjnym zapaleniem płuc, atypowym zapaleniem płuc, zwłóknieniem płucnym, brucellozą płucną i gruźlicą [60]. Stwierdzano przypadki zakażeń układu oddechowego, w których gatunkowi *G. candidum* towarzyszyły inne mikroorganizmy m.in. *Mycobacterium tuberculosis* oraz wirusy *Herpes simplex* [10, 43]. Ross i wsp. opisali ostre zapalenie oskrzeli i astmę wywołane *G. candidum* u 46-letniej ogólnie zdrowej kobiety [47].

Zmiany patologiczne będące wynikiem zakażenia *G. candidum* mogą dotyczyć układu pokarmowego – jamy ustnej, żołądka i jelit [44, 48]. Heinic i wsp. stwierdzili ustną geotrichozę u pacjenta zarażonego HIV [16], natomiast Vasei i Imanieh opisali inwazję dwunasticy przez *G. candidum* u pacjenta z niskim surowiczym poziomem przeciwciał w klasach IgA i IgM [58]. *G. candidum* był przyczyną izolowanego wrzodu przełyku u pacjenta chorego na AIDS [54] oraz zapalenia jelita cienkiego i okrężnicy [35], a także końcowego odcinka krętnicy [18]. Stwierdzono przypadki ropnia mózgu (*brain abscess*) [19], zapalenia rogówki (*keratitis*) [40] oraz pourazowego zapalenia stawów na skutek infekcji *G. candidum* [17]. U pacjentów z upośledzonym układem immunologicznym gatunek ten powodował posocznice i infekcje rozsiane obejmujące wiele narządów i tkanek: serce, płuca, wątrobę, śledzionę, okołotrzustkową tkankę miękką, węzłowe i zaotrzewnowe węzły chłonne, szpik kostny, nerki [20, 48, 49, 60].

Rola *G. candidum* w zakażeniach powierzchniowych nie jest do końca jasna. Sfa k i a n a k i s i wsp. opisali przypadek inwazyjnej infekcji skórnej wywołanej przez *G. candidum* u 80 letniego pacjenta z cukrzycą. Zmiany obejmowały dystalny paliczek palca środkowego prawej dłoni i szerzyły się na prawą dłoń [48]. B u s l a u i wsp. zaobserwowali, iż częstość występowania *G. candidum* w przewodzie pokarmowym

Tabela II

Minimalne stężenia leków przeciwgrzybiczych hamujące wzrost *G. candidum*

MIC poszczególnych leków [ $\mu\text{g/ml}$ ]							Piśmiennictwo
AMB	5FC	ITR	FLU	KTZ	VCZ	CSP	
0,2–1,6	–	0,01–6,3	–	0,2–3,1	0,1–0,8	–	de Hoog i wsp. [7]
1	<0,03	0,03	1	0,03	<0,008	1	Ross i wsp. [47]
–	–	–	0,25–2	–	–	–	Nenoff i wsp. [36]
2,5	–	–	–	–	–	–	Vasei i Imanieh [58]

AMB – amfoterycyna B, 5FC – 5-fluorocytozyna, ITR – itraconazol, FLU – flukonazol, KTZ – ketokonazol, VCZ – vorikonazol, CSP – kaspofungina

pacjentów z łuszczycą i pacjentów z atopowym zapaleniem skóry jest wyższa niż u pacjentów zdrowych. Badacze izolowali ten gatunek z kału u 22% pacjentów z łuszczycą, 10% z atopowym zapaleniem skóry i u 3% zdrowych osób [6].

## 7. Wrażliwość na leki i leczenie

Dane dotyczące wrażliwości *G. candidum* na leki przeciwgrzybicze są nieliczne. W badaniach *in vitro* wykazano, iż amfoterycyna B, klotrimazol, 5-fluorocytozyna i mikonazol są aktywne w stosunku do *G. candidum* [45]. Niektóre szczepy są wysoce odporne na leki z grupy azoli, zwłaszcza flukonazol i itraconazol, a także amfoterycynę B i nystatynę [44]. Dostępne w pracach naukowych dane o minimalnych stężeniach leków hamujących wzrost *G. candidum* (MIC) przedstawiono w tabeli II.

Nie istnieją schematy leczenia geotrichozy. W zakażeniu jamy ustnej grzybami z rodzaju *Geotrichum* zalecano miejscową aplikację 2% roztworu fioletu genjany (fioletu goryczkowego), płukanie jamy ustnej nadboranem sodu oraz zażywanie witamin z grupy B [60].

W leczeniu geotrichozy oskrzelowo-płucnej powszechnie stosowano jodki – dożylnie jodek sodu oraz doustnie nasycony roztwór jodku potasu, oraz nystatynę – doustnie lub w inhalacjach [44, 60]. Wykorzystywano również radioterapię promieniami X [60]. Ross i wsp. u pacjentki z oskrzelowo-płucną geotrichozą i astmą zastosowali odczulanie serią roztworów o rosnącym stężeniu ekstraktu *G. candidum* oraz terapię prednizolonem i kolistyną – domięśniowo oraz w inhalacjach [47].

U pacjenta z inwazyjną infekcją skórną *G. candidum* zastosowano 4-tygodniową terapię liposomalną amfoterycyną B (w ostatnich dwóch tygodniach włączono 5-fluorocytozynę), następnie 6-tygodniową doustną terapię vorikonazolem i drugi cykl liposomalnej amfoterycyny B podawanej dożylnie [48].

Parentin i wsp. u 3-letniego dziecka cierpiącego na zapalenie rogowki w wyniku inwazji *Candida parapsilosis*, *Candida lusitanae* i *Geotrichum can-*

*didum* zastosowali skuteczną terapię miejscową i ogólną flukonazolem [40].

Geotrichoza, w przypadku braku głębokiej immunosupresji, nie jest chorobą śmiertelną, prognoza jest dobra i choroba może ustąpić nawet bez stosowania terapii przeciwgrzybiczej [60]. *G. candidum* z reguły wykazuje wrażliwość na systemowe leki przeciwgrzybicze, jednakże dobór odpowiedniego leku powinien zawsze opierać się na wynikach testów lekooporności oraz ocenie stanu klinicznego pacjenta. Mimo iż terapia amfoterycyną B jest powszechna w ciężkich zakażeniach grzybiczych, również w geotrichozie, stosowanie tego leku jest ograniczone, ze względu na sposób podania oraz wysoką nefrotoksyczność [48].

## 8. Podsumowanie

Grzyby z rodzaju *Geotrichum* znalazły zastosowanie w przemyśle spożywczym i są również częstym przedmiotem badań biotechnologów. Wywołują u ludzi geotrichozę – zakażenie miejscowe lub rozsiane, którego najczęstszym czynnikiem etiologicznym jest gatunek *G. candidum*. Do tej pory nie zbadano determinant patogenności tego gatunku w testach *in vitro* i na modelach zwierzęcych, jednakże grzyb ten jest uznawany jako mało chorobotwórczy, o czym świadczą niska częstość występowania geotrichozy. Zakażenia dotyczą przede wszystkim pacjentów z obniżoną sprawnością układu odpornościowego. W dobie powszechnie stosowanej antybiotykoterapii i kortykosteroidoterapii, coraz częściej wykonywanych zabiegów chirurgicznych, wczesnej diagnostyki chorób nowotworowych i ich skutecznego leczenia, a w konsekwencji – zwiększającej się populacji ludzi z upośledzoną funkcją układu immunologicznego – należy lekceważyć mikroorganizmów oportunistycznych, w tym również rodzaju *Geotrichum*. Należy pamiętać, iż ważnym aspektem w epidemiologii zakażeń tym grzybem, podobnie jak w przypadku zakażeń innymi drobnoustrojami, stanowi właściwa diagnostyka do poziomu gatunku. Znajomość czynnika etiologicz-

nego choroby umożliwia opracowanie metod zapobiegania zakażeniom w oparciu o właściwości danego patogenu oraz ułatwia wdrożenie celowanego leczenia.

## Piśmiennictwo

1. Ali-Shtayeh M.S., Jamous R.M., Abu-Ghdeib S.I.: Ecology of cycloheximide-resistant fungi in field soils receiving raw city wastewater or normal irrigation water. *Mycopathologia*, **144**, 39–54 (1999)
2. Awad A.H.A.: Vegetation: A source of air fungal bio-contaminant. *Aerobiologia*, **21**, 53–61 (2005)
3. Benka-Coker M.O., Ekundayo J.A.: Applicability of evaluating the ability of microbes isolated from an oil spill site to degrade oil. *Environ. Monit. Assess.* **45**, 259–272 (1997)
4. Bochenek M., Witalis J., Macura A.B.: Występowanie i chorobotwórczość grzybów z rodzaju *Scopulariopsis*. *Mikol. Lek.* **15**, 104–108 (2008)
5. Boutrou R., Guéguen M.: Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *Int. J. Food Microbiol.* **102**, 1–20 (2005)
6. Buslau M., Menzel I., Holzmann H.: Fungal flora of human faeces in psoriasis and atopic dermatitis. *Mycoses*, **33**, 90–94 (1990)
7. de Hoog G.S., Guarro J., Gene J., Figueras M.J.: Atlas of Clinical Fungi, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Hiszpania, 2000, s. 227–233
8. de Hoog G. S., Smith M. T., Gueho E.: A revision of the genus *Geotrichum* and its teleomorphs. *Stud. Mycol.* **29**, 1–131 (1986)
9. de Hoog G.S., Smith M.T.: Ribosomal gene phylogeny and species delimitation in *Geotrichum* and its teleomorphs. *Stud. Mycol.* **50**, 489–515 (2004)
10. Depagne C., Louerat C., Nesme P.: Herpes simplex and *Geotrichum candidum* pneumonia in a patient with moderate renal failure. *Rev. Pneumol. Clin.* **59**, 297–300 (2003)
11. do Carmo-Sousa L.: The genus *Trichosporon* Behrend (w) The Yeasts, a taxonomic study, red. J. Lodder, North-Holland, Amsterdam, 1970, s. 1309–1352
12. Dziennik Ustaw 05.81.716 – Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 22 kwietnia 2005 r. w sprawie szkodliwych czynników biologicznych dla zdrowia w środowisku pracy oraz ochrony zdrowia pracowników zawodowo narażonych na te czynniki
13. Garczewska B., Patogeny grzybicze zakażeń szpitalnych (w) Patogeny zakażeń szpitalnych, red. D. Dzierżanowska,  $\alpha$ -medica press, Bielsko-Biała, 2007, s.140–143.
14. Garrison E. R., Holdar M. A.: Variation in cultures of *G. candidum* isolated from cream. *J. Dairy Sci.* **44**, 972 (1961)
15. Hamada H., Miura T., Kumobayashi H., Matsuda T., Harada T., Nakamura K.: Asymmetric synthesis of (R)-2-chloro-1-(m-chlorophenyl)ethanol using acetone powder of *Geotrichum candidum*. *Biotechnol. Lett.* **23**, 1603–1606 (2001)
16. Heinic G.S., Greenspan D., MacPhail L.A., Greenspan J.S.: Oral *Geotrichum candidum* infection associated with HIV infection. A case report. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **73**, 726–728 (1992)
17. Hrdy D.B., Nassar N.N., Rinaldi M.G.: Traumatic joint infection due to *Geotrichum candidum*. *Clin. Infect. Dis.* **20**, 468–469 (1995)
18. Jagirdar J., Geller S.A., Bottone E.J.: *Geotrichum candidum* as a tissue invasive human pathogen. *Hum. Pathol.* **12**, 668–671 (1981)
19. Kasantikul V., Chamsuwan A.: Brain abscesses due to *Geotrichum candidum*. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, **26**, 805–807 (1995)
20. Kassamali H., Anaissie E., Ro J., Rolston K., Kantarjian H., Fainstein V., Bodey G.P.: Disseminated *Geotrichum candidum* infection. *J. Clin. Microbiol.* **25**, 1782–1783 (1987)
21. Kreger-van Rij N.J.W.: *Trichosporon* Behrend (w) The Yeasts, a taxonomic study, red. N.J.W. Kreger-van Rij, Elsevier, Amsterdam, 1984, s. 933–962
22. Krzyściak P., Halska A., Macura A.B.: Występowanie i chorobotwórczość grzybów *Rhodotorula* spp. *Post. Mikrobiol.* **46**, 291–300 (2007)
23. Kurnatowska A., Kwaśniewska J. (w) Zarys Mikologii Lekarskiej, red. E. Baran, Volumed, Wrocław, 1998, s. 277–279
24. Kurtzman C.P., Robnett C.J.: Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, **73**, 331–371 (1998)
25. Kwasna H., Bateman G.: A new species of *Galactomyces* and first reports of four fungi on wheat roots in the United Kingdom. *Sydowia*, **60**, 69–92 (2007)
26. Lapin V.V., Rodionova N.A., Zagustina N.A., Kapanchan A.T., Dubovaya N.V., Bezborodov A.M.: The use of cellocandin, an enzymatic preparation from *Geotrichum candidum* 3C–106, for defibring waste paper and desiccation of cellulose suspension. *Appl. Biochem. Microbiol.* **38**, 390–391 (2002)
27. Larpin S., Mondoloni C., Goerges S., Vernoux J.P., Guéguen M., Desmasures N.: *Geotrichum candidum* dominates in yeast population dynamics in Livarot, a French red-smear cheese. *FEMS Yeast Res.* **6**, 1243–1253 (2006)
28. Lodder J., Kreger-van Rij N. J. W.: The yeasts, a taxonomic study. North-Holland, Amsterdam, 1967
29. Mancianti F., Nardoni S., Ceccherelli R.: Occurrence of yeasts in psittacines droppings from captive birds in Italy. *Mycopathologia*, **153**, 121–124 (2002)
30. Mehrabian S., Majd A., Majd I.: Antimicrobial effects of three plants (rubia tinctorum, carthamus tinctorius and juglans regia) on some airborne microorganisms. *Aerobiologia*, **16**, 455–458 (2000)
31. Mendieta-Taboada O., Kamimura E.S., Maugeri F.: Modelling and simulation of the adsorption of the lipase from *Geotrichum* sp. on hydrophobic interaction columns. *Biotechnol. Lett.* **23**, 781–786 (2001)
32. Mogensen G., Bianchi Salvadori B. i wsp.: Health benefits and safety evaluation of certain food components. *Bull. Intern. Dairy Fed.* **377**, 4–9 (2002)
33. Montagna M.T., Santacroce M.P., Spilotros G., Napoli C., Minervini F., Papa A., Dragoni I.: Investigation of fungal contamination in sheep and goat cheeses in southern Italy. *Mycopathologia*, **158**, 245–249 (2004)
34. Nagahama T., Abdel-Wahab M.A., Nogi Y., Miyazaki M., Uematsu K., Hamamoto M., Horikoshi K.: *Dipodascus tetrasporus* sp. nov., an ascosporegenous yeast isolated from deep-sea sediments in the Japan Trench. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 1040–1046 (2008)
35. Neagoe G., Neagoe M.: Enterocolitis due to *Geotrichum candidum* following treatment with glutamic acid. *Dtsch. Z. Verdau. Stoffwechselkr.* **27**, 205–208 (1967)
36. Nenoff P., Oswald U., Hausteil U.F.: *In vitro* susceptibility of yeasts for fluconazole and itraconazole. Evaluation of a microdilution test. *Mycoses*, **42**, 629–639 (1999)
37. Nigam J. N.: Cultivation of *Candida langeronii* in sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate for the production of single cell protein. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 367–372 (2000)

38. O'Brien M., O'Kiely P., Forristal P.D., Fuller H.T.: Fungi isolated from contaminated baled grass silage on farms in the Irish Midlands. *FEMS Microbiol. Lett.* **247**, 131–135 (2005)
39. Pahwa S., Roy N.: Cloning and characterization of *Geotrichum candidum* histidinol dehydrogenase: a new antifungal target. *Intern. J. Integrative Biol.* **3**, 1–8 (2008)
40. Parentin F., Liberali T., Perissutti P.: Polymicrobial keratomycosis in a three-year-old child. *Ocul. Immunol. Inflamm.* **14**, 129–131 (2006)
41. Piegza M., Stempniewicz R., Witkowska D.: Wpływ metabolitów *Geotrichum candidum* na wzrost *Fusarium*. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* **3** Supl., 175–183 (2004)
42. Pimenta R.S., Alves P.D.D., Correa Jr A., Lachance M.A., Prasad G.S., Rajaram, B.R.R.P. Sinha, Rosa C.A.: *Geotrichum silvicola* sp. nov., a novel asexual arthroconidial yeast species related to the genus Galactomyces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 497–501 (2005)
43. Popescu L., Verescu O., Crișan E., Vlădescu A.: Secondary active-evolutive cavitary pulmonary tuberculosis of the apicodorsal segment of the left upper lobe associated with bronchial tuberculosis and bronchial geotrichosis. *Pneumofiziologia*, **46**, 127–130 (1997)
44. Pottier I., Gente S., Vernoux J. P., Guéguen M.: Safety assessment of dairy microorganisms: *Geotrichum candidum*. *Int. J. Food Microbiol.* **126**, 327–332 (2008)
45. Ramani R., Rao P.V., Kumari G.R., Shivananda P.G.: Pulmonary geotrichosis. *Postgrad. Med. J.* **68**, 150–150 (1992)
46. Rodionova N.A., Dubovaia N.V., Martinovich L.I., Bezborodov A.M.: Formation of an extracellular system of enzymes during growth of *Geotrichum candidum* 3C on cell walls isolated from cereal grain capsules. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **37**, 562–565 (2001)
47. Ross J.D., Reid K.D., Speirs C.F.: Bronchopulmonary geotrichosis with severe asthma. *Br. Med. J.* **1**, 1400–1402 (1966)
48. Sfakianakis A., Krasagakis K., Stefanidou M., Maraki S., Koutsopoulos A., Kofteridis D., Samonis G., Tosca A.: Invasive cutaneous infection with *Geotrichum candidum*: sequential treatment with amphotericin B and voriconazole. *Med. Mycol.* **45**, 81–84 (2007)
49. Sheehy T.W., Honeycutt B.K., Spencer J.T.: *Geotrichum* septicemia. *JAMA*, **235**, 1035–1037 (1976)
50. Sláviková E., Vadkertiová R.: Seasonal occurrence of yeasts and yeast-like organisms in the river Danube. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **72**, 77–80 (1997)
51. Smith M.T., Poot G.A., de Cock A.W.A.M.: Re-examination of some species of the genus *Geotrichum* Link: Fr. *Antonie van Leeuwenhoek*, **77**, 71–81 (2000)
52. Suh S.O., Blackwell M.: Three new asexual arthroconidial yeasts, *Geotrichum carabidarum* sp. nov., *Geotrichum histe-ridarum* sp. nov., and *Geotrichum cucujoidarum* sp. nov., isolated from the gut of insects. *Mycol. Res.* **110**, 220–228 (2006)
53. Teniola O.D., Odunfa S.A.: Microbial assessment and quality evaluation of ogi during spoilage. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 731–737 (2002)
54. Tricerri R., Oppezzi M., Dodero M., Piersantelli N., Guida B., Cassola G.: Esophageal ulcer caused by *Geotrichum candidum* in a case of AIDS. *Pathologica*, **82**, 187–191 (1990)
55. Trinci A.J.P.: Culture turbidity as a measure of mold growth. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **58**, 467–473 (1972)
56. Ueda-Nishimura K., Mikata K.: Two distinct 18S rRNA secondary structures in dipodascus (Hemiascomycetes). *Microbiology, Reading*, **146**, 1045–1051 (2000)
57. Vasdinyei R., Deák T.: Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. *Int. J. Food Microbiol.* **86**, 123–130 (2003)
58. Vasei M., Imanieh M.H.: Duodenal colonization by *Geotrichum candidum* in a child with transient low serum levels of IgA and IgM. *APMIS*, **107**, 681–684 (1999)
59. Watanabe M., Hiratani T., Uchida K., Ohtsuka K., Watabe H., Inouye S., Kondo S., Takeuchi T., Yamaguchi H.: The *in vitro* activity of an antifungal antibiotic benanomycin A in comparison with amphotericin B. *J. Antimicrob. Chemother.* **38**, 1073–1077 (1996)
60. Webster B. H.: Bronchopulmonary geotrichosis: a review with report of four cases. *Dis. Chest.* **35**, 273–281 (1959)
61. Weijman A.C.M.: Carbohydrate composition and taxonomy of *Geotrichum*, *Trichosporon* and allied genera. *Antonie van Leeuwenhoek*, **45**, 119–127 (1979)
62. Wuczkowski M., Bond C., Prillinger H.: *Geotrichum vulgare* sp. nov., a novel asexual arthroconidial yeast. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 301–303 (2006)

**Joanna Puławska<sup>1\*</sup>, Krzysztof Kielak<sup>2\*</sup>, Piotr Sobiczewski<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa, ul. Pomologiczna 18, 96-100 Skierniewice

<sup>2</sup>Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, Departament Hodowli i Ochrony Roślin, ul. Wspólna 30, 00-930 Warszawa

Wpłynęło w styczniu 2009 r.

1. Wstęp. 2. Analiza cech fenotypowych. 2.1 Rośliny-gospodarze i wirulencja *E. amylovora*. 2.2. Biochemiczne i fizjologiczne właściwości *E. amylovora*. 2.3. Analiza kwasów tłuszczowych i białek. 2.4. Oporność na streptomycynę. 3. Analiza kwasów nukleinowych. 3.1. Analiza plazmidowego DNA. 3.2. Analiza chromosomalnego DNA. 3.2.1. Analiza sekwencji powtarzalnych – Rep-PCR. 3.2.2. Rybotypowanie. 3.2.3. Analiza restrykcyjna – RFLP. 3.2.4. Losowo wzmożone polimorficzne DNA – RAPD. 3.2.5. Polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów – AFLP. 3.2.6. Elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym – PFGE. 4. Podsumowanie

#### **Biodiversity of *Erwinia amylovora* – the causal agent of fire blight**

**Abstract:** Strains of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight of *Rosaceae* plants, form very homogenous species, regarding both biochemical and genotypic characters. However, they show diversity of virulence. The differences in phenotype and genotype of this bacterium have been observed only between strains originating from *Rubus* and those from *Maloidae* plants. In regions where streptomycin was used to control fire blight, the presence of streptomycin resistant strains was found. However strains highly and moderately resistant to streptomycin can be distinguished depending on their mechanism of resistance. Strains originating from North America, where fire blight was described for the first time, are generally more genetically heterogeneous than those from Europe. It was found that *E. amylovora* isolates can differ in plasmid content. Moreover, some of plasmids, like pEI70 discovered in Spain, can possess genes essential for pathogenicity and different than presently known ones – responsible for synthesis of siderophores, exopolysaccharides and proteins eg. harpin.

1. Introduction. 2. Analysis of phenotypic properties. 2.1. Host-plants and virulence of *E. amylovora*. 2.2. Biochemical and physiological properties of *E. amylovora*. 2.3. Analysis of fatty acids and protein patterns. 2.4. Resistance to streptomycin. 3. Nucleic acid based methods. 3.1. Analysis of plasmid DNA. 3.2. Analysis of chromosomal DNA. 3.2.1. Analysis of repetitive extragenic palindromic elements. 3.2.2. Ribotyping. 3.2.3. Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP. 3.2.4. Random Amplified Polymorphic DNA – RAPD. 3.2.5. Amplified Fragment Length Polymorphism – AFLP. 3.2.6. Pulsed-Field Gel Electrophoresis – PFGE. 4. Summary

---

**Słowa kluczowe:** DNA chromosomalny, DNA plazmidowy, *Erwinia amylovora*, wirulencja, zróżnicowanie genetyczne i fenotypowe  
**Key words:** chromosomal DNA, plasmid DNA, *Erwinia amylovora*, genotypic and phenotypic diversity, virulence

---

## **1. Wstęp**

Bioróżnorodność bakteryjnych patogenów roślin jest efektem ich zmienności spowodowanej zarówno warunkami środowiskowymi, prowadzącymi do niedziedzicznych zmian fenotypu, jak i zmiennością w materiale genetycznym, przekazywaną na kolejne pokolenia. Zmiany genotypu mogą prowadzić do zmian patogeniczności bakterii np. zmniejszenia lub wzrostu ich wirulencji, w tym uzyskania zdolności porażania odmian czy gatunków roślin uprawnych dotychczas odpornych na chorobę, której dana bakteria jest sprawcą. Stanowi to główną przeszkodę w wyhodowaniu odmian odpornych. Zmienność patogenów może być również przyczyną powstawania oporności na środki ochrony roślin, zwłaszcza antybiotyki.

Ocena genetycznego zróżnicowania patogenów jest ważna w badaniach epidemiologicznych, m.in. nad ich rozprzestrzenianiem się, w hodowli odporno-

ciowej roślin na choroby, ochronie roślin i kwarantanie, w tym selekcji grup patogenów do oceny efektywności różnych czynników biologicznej ochrony roślin przed chorobami. Dane pochodzące z badań nad genetycznym zróżnicowaniem mogą być wykorzystywane do monitorowania występowania szczepów patogenicznych, wykrywania i identyfikacji możliwych źródeł infekcji pierwotnej, mapowania genów bakterii i roślin, identyfikacji poszczególnych szczepów w badaniach nad genetyką populacji i studiach filogenetycznych czy fizjografią chorób. Techniki używane w badaniach nad genetycznym zróżnicowaniem mają dać informacje pomocne w rozróżnianiu szczepów, jak i o ich pokrewieństwie.

Rozwój technik molekularnych pozwolił na ujawnienie zmienności w materiale genetycznym bakterii patogenicznych dla roślin i to zarówno w ich chromosomalnym, jak plazmidowym DNA. Prowadzone są intensywne prace w tym zakresie nad *Erwinia*

---

\* Autor korespondencyjny: 1) Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa, ul. Pomologiczna 18, 96-100 Skierniewice; e-mail: jpulaw@insad.pl; 2) Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, Departament Hodowli i Ochrony Roślin, ul. Wspólna 30, 00-930 Warszawa

*amylovora*, patogenem powodującym straty o znaczeniu gospodarczym w wielu rejonach uprawy jabłoni i gruszy oraz innych roślin.

## 2. Analiza cech fenotypowych

### 2.1. Rośliny-gospodarze i wirulencja *E. amylovora*

Bakteria *E. amylovora* jest patogenem ponad 130 gatunków roślin, zaliczanych do 40 rodzajów, głównie z rodziny *Rosaceae* [75]. W Polsce, poza gruszą (*Pyrus*), jabłonią (*Malus*) i pigwą (*Cydonia*) chorobę stwierdzono dotychczas na głogu (*Crataegus*), jarządzie (*Sorbus*), irdze (*Cotoneaster*), świdośliwie (*Amelanchier*) oraz ogniku (*Pyracantha*). Generalnie uważa się, że *E. amylovora* jest gatunkiem jednorodnym i nie wykazuje specjalizacji patogenicznej co oznacza, że potencjalnie każdy z izolatów tego patogena jest w stanie zakazić każdą z dotychczas poznanych roślin-gospodarzy [53]. Jednak De L e y i wsp. [13] na podstawie badań z zastosowaniem sztucznej inokulacji roślin udowodnili, że poszczególne izolaty mogą wykazywać pewne różnice w zakresie porażanych roślin. Na uwagę zasługują izolaty wyosobnione z roślin rodzaju *Rubus*, niezdolne do porażania jabłoni i gruszy [1, 13, 17, 62, 71]. Jednocześnie większość izolatów pochodzących z drzew ziarnkowych okazała się niepatogeniczna w stosunku do maliny i jeżyny [13, 62]. Jedynie E v a n s [17] donosił o udanej inokulacji pędów malin izolatem *E. amylovora* z jabłoni. Ze względu na wymienione różnice S t a r r i wsp. [71] postulowali utworzenie dla izolatów porażających krzewy z rodzaju *Rubus*, odrębnego taksonu – *Erwinia amylovora* f.sp. *rubi*.

Poszczególne izolaty *E. amylovora* mogą natomiast różnić się znacznie między sobą wirulencją w stosunku do tego samego genotypu rośliny [7, 26, 59, 67]. O patogeniczności tej bakterii decyduje głównie jej zdolność do biosyntezy egzopolisacharydu (EPS) oraz białek, zwłaszcza harpiny. EPS jest związkiem kompleksowym i może zawierać amyloworan, lewan i glukan [22]. Stanowi on główny składnik wycieku bakteryjnego, towarzyszącego często nekrozom i zgorzelom na porażonych roślinach. Wokół komórki bakteryjnej EPS tworzy otoczkę chroniącą ją przed niekorzystnym wpływem otoczenia, a także przed rozpoznaniem patogena przez system obronny zaatakowanej rośliny. Utrata tej otoczki wpływa także na aktywność harpiny – białka zbudowanego głównie z glicyny, które jest induktorem reakcji nadwrażliwości, a ponadto, co jest najważniejsze, działa jako cząsteczka sygnałowa indukująca zaprogramowaną śmierć komórki rośliny-gospodarza [24].

Badane przez N o r e l l e g o i wsp. [56] szczepy *E. amylovora* wykazywały różne zdolności cho-

robotwórcze wobec kilku odmian jabłoni. Z kolei S c h w a r t z i wsp. [68] wykazali, że tylko niektóre izolaty tej bakterii hamowały wzrost komórek gruszy w pożywce agarowej, co wiązało się z ich zdolnością do wytwarzania toksycznej dla roślin dihydrofenyloalaniny (DPH). Poszczególne izolaty mogą się również różnić patogenicznością na zawiązkach owoców gruszy oraz zdolnością indukowania reakcji nadwrażliwości na tytoniu. Jakkolwiek dla większości z nich otrzymuje się na ogół pozytywny wynik obu testów, w niektórych przypadkach uzyskiwano wynik negatywny jednego lub obu z nich [13, 77].

### 2.2. Biochemiczne i fizjologiczne właściwości *E. amylovora*

Izolaty *E. amylovora* stanowią dość jednorodną grupę pod względem właściwości biochemicznych i fizjologicznych [15, 27, 50, 58]. Pewne różnice mogą jednak występować między poszczególnymi izolatami w zdolności wykorzystania niektórych węglowodanów jako źródła węgla. Analiza numeryczna profili metabolicznych różnych izolatów *E. amylovora* wykonana w oparciu o system BIOLOG, umożliwiający określenie zdolności utylizacji 95 organicznych związków węgla, pozwoliła na odróżnienie, tworzących jednorodną grupę izolatów wyosobnionych z roślin należących do podrodziny *Pomoideae*, od izolatów pochodzących z roślin należących do rodzaju *Rubus*. Wśród tych ostatnich wyróżniono dwie podgrupy: *Rubus* I i *Rubus* II [33]. Nasze badania nad opracowaniem charakterystyki fenotypowej polskich izolatów *E. amylovora* z zastosowaniem zestawów API 50CH, API ZYM i API 20NE wykazały, że na 87 badanych cech, niektóre z testowanych izolatów różniły się tylko w zdolności utylizacji melibiozy, celobiozy, sorbitolu, D-glukozy i L-arabinozy [59].

### 2.3. Analiza kwasów tłuszczowych i białek

Komórki większości izolatów *E. amylovora*, niezależnie od ich pochodzenia geograficznego i rośliny-gospodarza, mają podobną procentową zawartość kwasów tłuszczowych, reprezentujących poszczególne klasy. Jedynie izolaty wyosobnione z roślin rodzaju *Rubus* posiadają nieznacznie więcej kwasów cyklopropanowych. Natomiast izolaty odporne na streptomycynę mają mniej tych kwasów, a więcej kwasów nasyconych, niż izolaty wrażliwe na ten antybiotyk [76]. Zdaniem Ż a r n o w s k i e g o i wsp. [85] różnice obserwowane w profilach kwasów tłuszczowych poszczególnych izolatów *E. amylovora* są wystarczające do ich rozróżniania, a G a r r e t t i wsp. [21] stwierdzili nawet pewną korelację między uzyskiwanymi profilami, a wirulencją badanych izolatów. Szersze



zastosowanie analizy kwasów tłuszczowych w badaniach epidemiologicznych i taksonomicznych wymaga jednak bardzo ścisłego przestrzegania procedur, gdyż na uzyskiwane profile może mieć wpływ między innymi wiek kolonii bakteryjnych oraz skład pożywki, na jakiej zostały wyhodowane [8]. Natomiast profile, uzyskane w wyniku rozdziału białek bakteryjnych w żelu poliakrylamidowym, wskazują na dużą jednorodność europejskich izolatów *E. amylovora*, wyosobnionych z roślin należących do podrodziny *Pomoideae*. Wśród obserwowanych sporadycznie różnic wśród izolatów nie stwierdzono korelacji z ich wirulencją, pochodzeniem geograficznym i rośliną gospodarzem [13, 77].

## 2.4. Oporność na streptomycynę

Streptomycyna, zaledwie 8 lat po jej odkryciu przez Schatza i wsp. [65] w 1944 roku, została w USA zarejestrowana jako środek ochrony roślin. Jej skuteczność w zwalczaniu zarazy ogniowej potwierdzono w szeregu badaniach na różnych kontynentach. Również w Polsce, w latach 2002–2004, zarejestrowany był środek przeciwko zarazie ogniowej środek o nazwie Hortocyna 18 SP, bazujący na siarczanie streptomycyny [70]. Szczepy *E. amylovora*, odporne na streptomycynę wykryto po raz pierwszy w USA. Pierwsze doniesienie na ten temat pochodzi z Kaliforni z roku 1971 [51], niedługo później pojawiły się podobne informacje ze stanów Oregon i Waszyngton [12], a w kolejnych latach z innych rejonów USA, w których również stosowano streptomycynę, jako środek przeciw zarazie ogniowej. Ostatnio szczepy *E. amylovora* odporne na ten antybiotyk odkryto również poza Ameryką Północną m.in. w Egipcie [16], Nowej Zelandii [73], Izraelu [45], Libanie [64]. Wśród szczepów opornych wyróżniono dwa główne fenotypy – o wysokiej i o średniej oporności [11, 12, 47]. Szczepy o niskim poziomie oporności występują w naturze bardzo rzadko [69]. Oporność na streptomycynę u bakterii może mieć dwojakie podłoże: jako wynik punktowej mutacji w genie *rpsL* kodującym rybosomalne białko S12 lub też poprzez nabycie genów związanych z opornością zlokalizowanych na mobilnych elementach genetycznych, jak np. na plazmidach lub transpozonach. Stwierdzono, że u *E. amylovora* o wysokiej oporności na streptomycynę występuje mutacja chromosomalna w genie *rpsL* uniemożliwiająca przyłączenie się antybiotyku do rybosomu, a co za tym idzie inhibicji syntezy białek. Natomiast u szczepów średnio opornych cecha ta jest często związana z nabyciem genów *strA-strB* zlokalizowanych na plazmidach lub transpozonach umożliwiających syntezę enzymów modyfikujących aminoglikozydy, które tak zmieniają strukturę streptomycyny, że nie może ona blokować miejsca przyłączenia antykodonu w tRNA do rybosomu, czyli nie

może hamować syntezy białek [9]. Geny *strA-strB* znaleziono na plazmidzie RSF1010 występującym u różnych bakterii, znalezionym w klinicznych szczepach bakterii Gram-ujemnych. Dalsze badania wykazały, że geny te również znaleziono na transpozonie Tn5393 zlokalizowanym na koniugacyjnym plazmidzie pEA34 występującym u bakterii *E. amylovora* [10]. Do roku 1994, oporność na streptomycynę związana z genami *strA-strB* była obserwowana wśród szczepów izolowanych tylko w stanie Michigan w USA. Później znaleziono szczepy *E. amylovora* zawierające plazmid pEa8.7 z tymi genami w Kaliforni [57].

## 3. Analiza kwasów nukleinowych

### 3.1. Analiza plazmidowego DNA

Zastosowanie technik molekularnych w badaniach nad zmiennością *E. amylovora* pozwoliło m.in. na wykazanie różnej wielkości charakterystycznego dla gatunku plazmidu pEA29, która waha się od ok. 27,6 do ok. 34,9 kbp [46]. Analiza restrykcyjna tego plazmidu ujawniła natomiast dość dużą jednorodność izolatów pochodzących z drzew owocowych, umożliwiając jednocześnie łatwe ich odróżnienie od izolatów z malin oraz izolatów *Erwinia pyrifoliae* – gatunku, do którego zaklasyfikowano bakterie powodujące objawy podobne do zarazy ogniowej na azjatyckich odmianach gruszy [34]. Bakterie te różnią się od typowych szczepów m.in. patogenicznością i zakresem roślin-gospodarzy. Pierwotnie istniała wśród badaczy zgodność, co do tego, że plazmid pEA29 jest obecny we wszystkich izolatach *E. amylovora* [4, 18]. Brak genów odpowiedzialnych za transfer i mobilizację w obrębie sekwencji tego plazmidu w powiązaniu z jego wysoką stabilnością wywołało przekonanie, że powinien on występować u wszystkich dzikich szczepów *E. amylovora*. W związku z tym pierwsze próby zastosowania analizy DNA do identyfikacji i wykrywania patogena były oparte na analizie DNA plazmidu pEA29 [4, 38, 48]. Jednak z czasem zaczęło pojawiać się przypuszczenie, że bakterie *E. amylovora* mogą łatwo zgubić pEA29 nie tracąc przy tym patogeniczności [3]. Brown i wsp. [6] nie otrzymali żadnego produktu z 5 izolatami wyosobnionymi z maliny, gruszy i jabłoni po przeprowadzeniu amplifikacji ze starterami komplementarnymi do tego plazmidu, co ich zdaniem, świadczyło o jego braku. Co więcej, jeden z pozyskanych Gram-dodatnich, niezidentyfikowanych izolatów także reagował z tymi starterami, co może świadczyć o wcześniejszym pozyskaniu pEA29 od bakterii *E. amylovora*. Natomiast w Hiszpanii, Lopez i wsp. [39] wyizolowali z głogu izolat *E. amylovora* pozbawiony plazmidu pEA29. Stwierdzili także,

występowanie u tego izolatu innego plazmidu o wielkości około 70 kbp (pEI70) nie wykazującego homologii z pEA29. Na podstawie analizy składu plazmidowego europejskich szczepów *E. amylovora* stwierdzono, że plazmid pEI70 występuje dość powszechnie u *E. amylovora* na naszym kontynencie. W niektórych rejonach, np. w Polsce stwierdzono go u ok. 10% spośród ponad 100 badanych szczepów, a w innych np. w Belgii plazmid ten znaleziono we wszystkich testowanych izolatach. Przypuszcza się, że plazmid pEA29 może nieść geny istotne dla wirulencji *E. amylovora* [40].

Spośród starterów komplementarnych do plazmidowego DNA najpowszechniej stosowane są startery A i B, zaprojektowane przez Bereswillla i wsp. [4], pozwalające na amplifikację odcinka o długości 0,9 kbp powstałego po trawieniu plazmidu pEA29 restryktazą *Pst*I lub też inne startery w obszarze tego fragmentu DNA [38, 48]. Niektórzy badacze otrzymywali jednak z niektórymi z tych starterów produkty o innej długości [6, 33, 37]. Poddanie produktów amplifikacji analizie restrykcyjnej wykazało, że w omawianym fragmencie pojawia się insercja wielkości od 30 do 90 bp [37]. Sekwencjonując amplifikowany fragment, Schnabel i Jones [66] oraz Kim i Geider [35] opisali równolegle ośmionukleotydom, powtarzającą się sekwencję (Short Sequence Repeats – SSR), która może występować u różnych izolatów w liczbie od 4 do 15 kopii. Opisywana cecha oceniona jednak została jako niestabilna, na przykład w warunkach stresowych [31]. W związku z tym analiza SSR nie jest polecana w badaniach epidemiologicznych i diagnostycznych [31, 35, 66]. Odmienne obserwacje zostały odnotowane przez Ruppitscha i wsp. [63]. Analizowali oni 104 austriackie szczepy *E. amylovora* pod kątem stabilności liczby powtórzeń wcześniej opisanych ośmionukleotydom sekwencji, w warunkach laboratoryjnych po wielokrotnym pasażowaniu oraz w warunkach stresowych. W zdecydowanej większości badań liczba powtórzeń badanych SSR była niezmienna. W zależności od rejonu Austrii izolowano szczepy o różnej liczbie SSR i na podstawie wyników wyciągnięto wniosek, że zaraza ognio-wa nie rozprzestrzeniła się z jednego źródła, lecz na przestrzeni kilku lat od pierwszego pojawienia się tej choroby w 1993 roku, nastąpiło wielokrotne wprowadzenie źródła infekcji do tego kraju.

Intensywne badania nad genomem *E. amylovora* wykazały obecność również innych plazmidów w komórkach niektórych izolatów tego gatunku. Foster i wsp. [19] określili sekwencję nukleotydom oraz dystrybucję plazmidów pEU30 wielkości 30,314 kbp i pEL60 wielkości 60,145 kbp. Obecność plazmidu pEU30 stwierdzono u izolatów pochodzących z zachodniej części USA, natomiast pEL60 u izolatów

z Libanu. Sekwencje plazmidów i rodzaj genów w nich zlokalizowanych sugerują, że mniejszy z nich jest podobny do innych plazmidów izolowanych z bakterii związanych z roślinami, natomiast większy – do plazmidów występujących u ludzkich bakterii jelitowych.

## 3.2. Analiza chromosomalnego DNA

### 3.2.1. Analiza sekwencji powtarzalnych – Rep-PCR

Jedną z pierwszych prób zastosowania analizy genomowego DNA w badaniach zmienności genetycznej *E. amylovora* opierała się na amplifikacji obszarów położonych między sekwencjami powtarzalnymi typu REP (ang. Repetitive Extragenic Palindromic sequences), ERIC – (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) oraz sekwencjami repetetywnymi BOX [49]. Technika ta jest wykorzystywana obecnie zarówno w diagnostyce bakteriologicznej, jak i badaniach epidemiologicznych [41, 42, 74, 78]. Zastosowanie metody na bazie sekwencji powtarzalnych pozwoliło McManus i Jones [49] na łatwe odróżnienie izolatów pochodzących z malin i jeżyn od izolatów pochodzących z roślin należących do podrodziny *Pomoideae*. Te ostatnie okazały się mało zróżnicowane. Amplifikacja DNA ponad 170 izolatów, pochodzących głównie z kontynentu północnoamerykańskiego, pozwoliła na uzyskanie jedynie od 2 do 3 profili, w zależności od zastosowanych starterów (największe zróżnicowanie uzyskano stosując startery komplementarne do sekwencji typu ERIC). Warto przy tym zaznaczyć, że niezależnie od zastosowanych starterów, zawsze jeden z otrzymanych profili był dominujący. Dla większości izolatów pochodzących z roślin należących do rodzaju *Rubus* otrzymano inne profile niż dla izolatów pochodzących z drzew owocowych. Wyjątek stanowił 1 izolat, dla którego otrzymano profile typowe dla izolatów wyosobnionych z drzew owocowych. Rico i wsp. [60] również stwierdzili małą użyteczność techniki rep-PCR do określenia związków filogenetycznych między szczepami *E. amylovora*. Zróżnicowanie uzyskanych produktów amplifikacji było niewielkie, lecz nieliczne obserwowane produkty polimorficzne pozwoliły na opracowanie starterów amplifikujących markerowe fragmenty DNA. Mogą one posłużyć jako narzędzie w badaniach epidemiologicznych – np. do śledzenia dróg rozprzestrzeniania się patogena z określonego ogniska choroby.

### 3.2.2. Rybotypowanie

McManus i Jones [49] amplifikowali również obszar DNA leżący w operonie *rnm*, pomiędzy genami kodującymi 16S rRNA i 23S rRNA (rybotypowanie – ribotyping) [25]. Amplifikacja obszaru między genami 16S rDNA i 23S rDNA izolatów *E. amylovora* pozwoliła na łatwe wyróżnienie tworzących jednolitą

grupę izolatów wyosobnionych z roślin należących do rodzaju *Rubus*. Również izolaty pochodzące z drzew owocowych okazały się mało zróżnicowane – amplifikacja DNA około 170 izolatów umożliwiła uzyskanie jedynie 3 różnych profili [49]. Podobne wyniki rybotypowania uzyskali J e n g i wsp. [28] – izolaty wyosobnione z krzewów z rodzaju *Rubus*, oraz izolaty pochodzące z roślin podrodziny *Pomoideae* tworzyły dwie jednorodnie grupy. M o m o l i wsp. [55] zastosowali modyfikację rybotypowania, polegającą na dodatkowym trawieniu otrzymanych produktów za pomocą enzymów restrykcyjnych – ARDREA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Enzyme Analysis). Umożliwiło to jedynie odróżnienie izolatów pochodzących z malin i jeżyn od izolatów wyosobnionych z innych roślin-gospodarzy. Natomiast G a r b e v a i wsp. [20], stosując tę samą technikę, wykazali zróżnicowanie również wśród izolatów z drzew owocowych. Odmienne profile uzyskali jednak dla tylko 2 izolatów, spośród 14 badanych.

### 3.2.3. Analiza restrykcyjna – RFLP

K i m i wsp. [33] trawili genomowy DNA wybranych izolatów *E. amylovora* wykorzystując w tym celu enzym *EcoRI*, a następnie przeprowadzili hybrydyzację otrzymanych produktów z sondą, obejmującą grupę genów *hrp*. Dla wszystkich izolatów pochodzących z drzew owocowych otrzymali jeden profil, podczas gdy dla izolatów wyosobnionych z krzewów należących do rodzaju *Rubus* otrzymali dwa odmienne profile. Technikę RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) stosowali również W a l e r o n i wsp. [81], amplifikując gen *recA* kodujący rekombinazę A dziesięciu izolatów *E. amylovora*, wyosobnionych z drzew owocowych w różnych rejonach świata. Produkty amplifikacji poddano następnie trawieniu czterema enzymami restrykcyjnymi. Dla wszystkich izolatów otrzymano jednak jednakowe profile. Podobne wyniki uzyskano stosując analizę RFLP *recA* i dodatkowo 2 innych genów: *gyrA* i *rpoS*. Tylko jeden z siedmiu enzymów restrykcyjnych zastosowanych do trawienia fragmentu genu *recA* pozwolił na odróżnienie 5 od pozostałych 12 testowanych szczepów *E. amylovora*. Wszystkie pozostałe wzory restrykcyjne były identyczne dla *E. amylovora*, ale umożliwiały odróżnienie tego gatunku od bakterii *Erwinia* wyizolowanych z podobnych do zarazy ogniowej symptomów na gruszkach w Japonii [80].

### 3.2.4. Losowo wzmacnione polimorficzne DNA – RAPD

Do badania zmienności genetycznej *E. amylovora* M o m o l i wsp. [54] zastosowali technikę RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) [43, 82]. Profile, uzyskane w wyniku amplifikacji DNA 16 izolatów *E. amylovora* pochodzących z różnych rejonów

geograficznych, z sześcioma przypadkowymi starterami pozwoliły na odróżnienie każdego z izolatów. Jednocześnie izolaty wyosobnione z roślin z rodzaju *Rubus* i drzew z podrodziny *Pomoideae* tworzyły dwie grupy, przy czym podobieństwo między nimi, określone metodą UPGMA i wyrażone za pomocą współczynnika Nei-Li wynosiło około 0,7 [54]. Te same startery zastosowali B r e n n a n i wsp. [5] do badania izolatów pochodzących głównie z Irlandii. Wprawdzie podobieństwo większości uzyskanych profili wynosiło powyżej 0,9 (współczynnik Nei-Li, metoda UPGMA), to jednak niektóre z nich znacznie różniły się od pozostałych. Technika RAPD wykazała także wysoką jednorodność izolatów *E. amylovora*, pochodzących z innych rejonów geograficznych [32, 44, 72].

Technikę RAPD zastosowano również do badania zróżnicowania izolatów *E. amylovora* pochodzących z Polski. Badaniem objęto 64 izolaty, spośród których 50 izolowano w latach 1983–2002 z odmiennych roślin gospodarzy (jabłoń, grusza, pigwa, ognik, głóg i irga) z różnych rejonów kraju. Pozostałe 12 izolatów pochodziło z innych krajów europejskich, w tym 2 z Bliższego Wschodu. We wstępnych badaniach DNA wzorcowego izolatu 691 amplifikowano w reakcjach z 87 różnymi starterami RAPD (OPERON). Do dalszych badań wybrano 3 startery: U19, W20 i AR03, które w wyniku reakcji amplifikacji pozwalały na uzyskanie największej liczby produktów. Dodatkowo wykorzystano 2 startery CUGEA 1 i CUGEA 5, które zostały wcześniej opisane przez innych autorów jako umożliwiający różnicowanie izolatów *E. amylovora*. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że różnicowanie izolatów *E. amylovora* umożliwiły jedynie startery AR03, CUGEA 1 i CUGEA 5, podczas gdy profile uzyskane w reakcji ze starterami W20 i U19 były jednakowe dla wszystkich izolatów. Przeprowadzone badania potwierdziły wysoką jednorodność testowanych izolatów *E. amylovora*, choć część z nich wykazywała znaczne różnice w wirulencji badanej zarówno na liściach jabłoni, jak i na pędach jabłoni, gruszy i głogu. Nie znaleziono również korelacji między zróżnicowaniem genetycznym izolatów a ich pochodzeniem geograficznym lub rośliną, z której zostały wyosobnione. Brak zróżnicowania badanych szczepów stwierdzono również na podstawie analizy restrykcyjnej fragmentu genu *amsB* (biorącego udział w produkcji specyficznego dla *E. amylovora* polisacharydu – amyloworanu) o długości około 1600 pz z użyciem gęsto tnących enzymów *BsuRI* i *HpaII*, [59].

### 3.2.5. Polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów – AFLP

W prowadzonych we Włoszech badaniach epidemiologicznych posłużono się techniką AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) [79]. Zastosowanie

tej techniki pozwoliło na stwierdzenie, że wystąpienie zarazy ogniowej w prowincjach Modena i Ferrara, było spowodowane jednym szczepem *E. amylovora* [52]. Podobnie, analiza austriackich i węgierskich izolatów tej bakterii, wykonana w oparciu o technikę AFLP, nie wykazała między nimi żadnych różnic [32].

W Hiszpanii podjęto próbę rozróżnienia izolatów *E. amylovora* pochodzących z różnych krajów zarówno technikami tzw. odcisku palca (fingerprinting) ze starterami komplementarnymi do sekwencji powtarzalnych (tzw. Rep-PCR): ERIC, BOX, IS50 i starterem M13 oraz techniką AFLP. Spośród 23 testowanych izolatów 18 nie było rozróżnialnych z zastosowaniem rep-PCR. Na ich rozróżnienie pozwoliło natomiast zastosowanie AFLP z 6 kombinacjami starterów posiadających po 1 nukleotydzie różnicującym. Dla wszystkich, oprócz 2 szczepów, otrzymano unikalne kombinacje profili AFLP [61]. Poszerzone badania nad charakterystyką zarówno fenotypową, jak i genotypową 63 szczepów wyizolowanych w różnych rejonach Hiszpanii potwierdziły, że spośród wszystkich technik największe rozróżnienie uzyskano przy zastosowaniu AFLP. Technika ta pozwoliła na rozróżnienie bakterii w zależności od ich pochodzenia geograficznego. Uzyskane wyniki wskazują, że nowe ogniska zarazy ogniowej w Hiszpanii są efektem wielokrotnego wprowadzenia zakażonego materiału roślinnego lub innych źródeł inokulum z różnych państw Europy [14].

### 3.2.6. Elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym – PFGE

Obiecujące wyniki uzyskano stosując technikę PFGE [36] (Pulsed Field Gel Electrophoresis) [2, 29, 83, 84]. Technika ta pozwoliła na wyróżnienie wśród europejskich izolatów *E. amylovora* 6 typów i przedstawienie hipotetycznych dróg rozprzestrzeniania się choroby: z Wysp Brytyjskich do Europy Środkowej; z Wysp Brytyjskich do Francji i dalej, na Półwysep Iberyjski oraz do północnych Włoch, z zachodniej Francji do północno-wschodniej Hiszpanii, z Egiptu, przez Bliski Wschód do Azji Mniejszej i na Bałkany [2, 29, 83, 84].

W przeciwieństwie do szczepów europejskich, profile PFGE szczepów pochodzących z Ameryki Północnej były dużo bardziej zróżnicowane. Europejskie izolaty można zaklasyfikować do 6 różnych grup na podstawie profili restrykcyjnych, natomiast wśród północnoamerykańskich izolatów tylko część miała profil identyczny, jak izolaty *E. amylovora* pochodzące z północy Hiszpanii, zachodniej Francji i Anglii. Inna grupa była identyczna jak izolaty z Europy Centralnej, a pozostałe charakteryzowały się profilami o dużym stopniu zróżnicowania, niespotykanymi w Europie. Ta obserwacja doprowadziła do hipotezy, że zaraza ogniowa rozprzestrzeniła się po świecie „uciekając” z Ameryki Płn. tylko kilka razy [29]. Na jeszcze większe rozróżnienie bakterii pozwoliło badanie liczby SSR plazmidu pEA29. Liczba tych

Tabela I

Zróżnicowanie izolatów *E. amylovora* na podstawie analizy ich DNA chromosomalnego

Metoda	Wynik	Piśmiennictwo
Rep-PCR	Odróżnienie izolatów z roślin rodzaju <i>Rubus</i> od izolatów z rodziny <i>Pomoidae</i>	[49]
	Nieliczne produkty polimorficzne posłużyły do opracowania starterów amplifikujących markerowe fragmenty DNA	[60]
	18 z 23 izolatów z Hiszpanii nie było rozróżnialnych	[61]
Rybotypowanie	Odróżnienie izolatów z roślin rodzaju <i>Rubus</i> od izolatów z rodziny <i>Pomoidae</i>	[25, 28, 55]
	Niewielkie zróżnicowanie wśród izolatów z drzew owocowych	[20]
RFLP genomu + hybrydyzacja z sondą komplementarną do genów <i>hrp</i>	Odróżnienie izolatów z roślin rodzaju <i>Rubus</i> od izolatów z rodziny <i>Pomoidae</i> . Jednorodny izolaty z drzew owocowych, natomiast z <i>Rubus</i> – 2 grupy	[33]
RFLP genomu + PFGE	Wyróżnienie wśród europejskich izolatów <i>E. amylovora</i> 6 typów i przedstawienie hipotetycznych dróg rozprzestrzeniania się choroby do różnych krajów	[2, 29, 83, 84]
	Duże zróżnicowanie wśród izolatów z Ameryki Północnej	[29]
RFLP <i>recA</i> , <i>gyr</i> , <i>rpoS</i>	5 izolatów spośród 12 zostało odróżnionych tylko na podstawie genu <i>recA</i>	[80]
RFLP <i>amsB</i>	Brak zróżnicowania wśród 14 izolatów pochodzących z Polski	[59]
RAPD	Rozróżnienie wszystkich spośród 16 badanych izolatów. Odróżnienie izolatów z roślin rodzaju <i>Rubus</i> od izolatów z rodziny <i>Pomoidae</i> .	[54]
	Duża jednorodność wśród badanych izolatów	[5, 32, 44, 59, 72]
AFLP	Brak rozróżnienia wśród izolatów pochodzących z Modeny i Ferrary (Włochy)	[52]
	Brak różnic wśród izolatów pochodzących z Węgier	[32]
	Rozróżnienie izolatów, zależnie od ich pochodzenia geograficznego w Hiszpanii	[14, 61]

powtórzeń była dużo bardziej zróżnicowana niż profile PFGE lecz z nimi nie korelowała. Również analiza sekwencji genu *hrpN* kodującego harpinę, jak i sekwencji aminokwasowej tego białka wydedukowanej na podstawie sekwencji nukleotydów, potwierdziła większą różnorodność szczepów amerykańskich niż europejskich, których sekwencje tego genu były prawie identyczne [30]. Badania przeprowadzone przez Giorgi i Scortichini [23] z izolatami europejskimi, jak i pochodzącymi spoza Europy, również potwierdziły większe zróżnicowanie genu *hrpN* u bakterii wyizolowanych w Ameryce Północnej, gdzie zaraza ogniowa była wykryta i opisana po raz pierwszy na świecie. Zarówno w przypadku analizy genu *hrpN*, jak i rejonu genów *dspA/E* kodujących czynniki wirulencji, obserwowano znaczne różnice w profilach RFLP oraz sekwencjach między szczepami izolowanymi z roślin rodzajów *Amelanchier* i *Rubus*, a bakteriami pochodzącymi z roślin należących do rodziny *Maloidae* [23].

#### 4. Podsumowanie

Szczepy bakterii *Erwinia amylovora*, chociaż zróżnicowane pod względem wirulencji, należą do jednego z bardziej homogennych pod względem biochemicznym i genetycznym gatunków. Wyraźne różnice zaobserwowano jedynie między izolatami pochodzącymi z malin i jeżyn, a izolatami wyisobnionymi z jabłoni i grusz oraz innych roślin-gospodarzy (Tabela I). W rejonach, gdzie stosowano środki na bazie streptomycyny przeciwko zarazie ogniowej, u części szczepów zaobserwowano pojawienie się oporności na ten antybiotyk. Zależnie od rodzaju mechanizmu odpowiedzialnego za oporność, bakterie podzielono na szczepy o wysokiej i średniej oporności. Badania nad zróżnicowaniem genetycznym *E. amylovora* wykazały większą różnorodność wśród szczepów pochodzących z Ameryki Północnej, gdzie zarazę ogniową opisano po raz pierwszy, niż wśród szczepów europejskich. Najnowsze badania wykazują, że bakterie *E. amylovora* mogą się różnić zawartością DNA plazmidowego. Co więcej, niektóre plazmidy, jak odkryty w Hiszpanii pEI70, mogą nieść ze sobą geny istotne dla patogeniczności bakterii inne niż dotychczas poznane odpowiedzialne za syntezę: egzopolisacharydów, sideroforów, białek np. harpiny. Pomimo znacznego postępu w badaniach funkcji poszczególnych genów ich całościowe znaczenie nie zostało dotychczas rozpoznane. Wykorzystywane coraz powszechniej nowoczesne techniki, np. Real-time PCR, powinny dostarczyć więcej informacji na temat genów *E. amylovora* związanych z patogenicznością i wirulencją bakterii.

#### Piśmiennictwo

- Asselin J.E., Yip K.N., Beer S.V.: *eopI* differs in strains of *Erwinia amylovora* that differ in host specificity. *Acta Hort.* **793**, 213–214 (2008)
- Bazzi C., Merighi M., Lopez M.M., Zhang Y., Jock S., Geider K.: Differentiation of *Erwinia amylovora* strains isolated in southern Europe by PFGE analysis. *Acta Hort.* **489**, 197–200 (1999)
- Bereswill S., Bugert P., Bruchmüller I., Geider K.: Identification of fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*, by PCR assays with chromosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2636–2642 (1995)
- Bereswill S., Pahl A., Bellemann P., Zeller W., Geider K.: Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3522–3526 (1992)
- Brennan J.M., Doohan F.M., Egan D., Scanlan H., Hayes D.: Characterisation and differentiation of Irish *Erwinia amylovora* isolates. *J. Phytopathology*, **150**, 414–422 (2002)
- Brown E.W., Janisiewicz W., Van der Zwet T.: Preliminary phenotypic and genetic differentiation of the fire blight bacterium, *Erwinia amylovora*. *Acta Hort.* **411**, 199–203 (1996)
- Cabrefiça J., Montesinos E.: Analysis of aggressiveness of *Erwinia amylovora* using disease-dose and time relationships. *Phytopath.* **95**, 1430–1437 (2005)
- Casano F.J.: Effect of growth medium and physiological age on the fatty acid analysis of *Erwinia amylovora*. *Acta Hort.* **217**, 41–42 (1986)
- Chiou Ch-S., Jones A.L.: The analysis of plasmid-mediated streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. *Phytopath.* **81**, 710–714 (1991)
- Chiou C.S., Jones A.L.: Nucleotide sequence analysis of a transposon (Tn5393) carrying streptomycin resistance genes in *Erwinia amylovora* and other gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **175**, 732–740 (1993)
- Chiou C-S, Jones A.L.: Molecular analysis of high-level streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. *Phytopath.* **85**, 324–328 (1995)
- Coyier D.L., Covey R.P.: Tolerance of *Erwinia amylovora* to streptomycin sulphate in Oregon and Washington. *Plant Disease Report*, **59**, 849–852 (1975)
- De Lay J., Vantomme R., Swings J., Kersters K., Rijckaert C., Goor M., Mergaert J., Green J.: Research report on *Erwinia amylovora*. *Acta Hort.* **151**, 241–248 (1984)
- Donat V., Biosca E.G., Peñalver J., López M.M.: Exploring diversity among Spanish strains of *Erwinia amylovora* and possible infection sources. *J Appl Microbiol.* **103**, 1639–1649 (2007)
- Dye D.W.: A numerical taxonomic study of the genus *Erwinia*. *New Zealand J. Agric. Res.* **24**, 223–229 (1981)
- El-Goorani M.A., El-Kasheir H.M.A., Shoeib A.A., Hasanein F.M.: Distribution of Streptomycin Resistant Strains of *Erwinia amylovora* in Egypt during 1988. *J. Phytopath.* **127**, 69–74 (1989)
- Evans I.R.: Fire blight of raspberries in Alberta. *Acta Hort.* **411**, 69–72 (1996)
- Falkenstein H., Bellemann P., Walter S., Zeller W., Geider K.: Identification of *Erwinia amylovora*, the fireblight pathogen, by colony hybridisation with DNA from plasmid pEA29. *Appl. Env. Microbiol.* **54**, 2798–2802 (1988)
- Foster G.C., McGhee G.C., Jones A.L., Sundin G.W.: Nucleotide sequences, genetic organization, and distribution of pEU30 and pEL60 from *Erwinia amylovora*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 7539–7544 (2004)

20. Garbeva P., Crepel C., Maes M.: Genomic variation within the *Erwinia amylovora* species. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.* **62/3b**, 937–942 (1997)
21. Garrett C.M.E., Blake P.S., Fletcher D.A., Austin D.J.: Preliminary discrimination of *Erwinia amylovora* strains by fatty acid profiling. *Acta Hort.* **217**, 63–69 (1987)
22. Geider K.: Exopolysaccharides of *Erwinia amylovora*: structures, biosynthesis, regulation, role in pathogenicity of amylovoran and levan (w) Fire blight. The disease and its causative agent, *Erwinia amylovora* red. Vanneste J.L. CABI Publ., Wallingford, U.K., 2000, s. 141–162
23. Giorgi S., Scortichini M.: Molecular characterization of *Erwinia amylovora* strains from different host plants through RFLP analysis and sequencing of *hrpN* and *dspA/E* genes. *Plant Pathol.* **54**, 789–798 (2005)
24. Greenberg J.T.: Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12094–12097 (1996)
25. Gürtler V., Stanisich V.A.: New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, **142**, 3–16 (1996)
26. Hevesi M., Papp J., Jámbor-Benczúr E., Kaszáné-Csizsár K., Pozsgai I., Gazdag G., Balla I.: Testing the virulence of some Hungarian *Erwinia amylovora* strains on *in vitro* cultured apple rootstocks. *Int. J. Hort. Sci.* **6**, 52–55 (2000)
27. Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Stanley J.T., Williams S.T.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA 1994, s. 787
28. Jeng R.S., Belivera L., Hubbes M., Svircev A.M., Myers A.L.: The use of 16S and 16S-23S rRNA internal transcribed spacers to detect and differentiate *Erwinia amylovora*. *Acta Hort.* **489**, 49–54 (1999)
29. Jock S., Donat V., López MM., Bazzi C., Geider K.: Following spread of fire blight in Western, Central and Southern Europe by molecular differentiation of *Erwinia amylovora* strains with PFGE analysis. *Environ. Microbiol.* **4**, 106–114 (2002)
30. Jock S., Geider K.: Molecular differentiation of *Erwinia amylovora* strains from North America and of two Asian pear pathogens by analyses of PFGE patterns and *hrpN* genes. *Environ. Microbiol.* **6(5)**, 480–490 (2004)
31. Jock S., Jacob T., Kim W.-S., Hildebrand M., Vosberg H.-P., Geider K.: Instability of short-sequence DNA repeats of pear pathogenic *Erwinia* strains from Japan and *Erwinia amylovora* fruit tree and raspberry strains. *Mol. Gen. Genomics*, **268**, 739–749 (2003).
32. Keck M., Hevesi M., Ruppitsch W., Ströger A., Richrer S.: Spread of fire blight in Austria and Hungary – variability of *Erwinia amylovora* strains. *Plant Prot. Sci.* **38**, Special Issue, **1**, 49–55 (2002)
33. Kim J.H., Beer S.V., Zumoff C.H., Laby H.L., Gustafson H.L., Aldwinckle H.S.: Characterization of *Erwinia amylovora* strains from different hosts and geographical areas. *Acta Hort.* **411**, 183–185 (1996)
34. Kim, W.S., Rhim, S.L., Völksch, B., Gardan, L., Paulin, J.P., Jock, S., Geider, K.: Characterization of a new *Erwinia* species affecting Asian pear trees. *Acta Hort.* **489**, 201–205 (1999)
35. Kim W.S., Geider K.: Analysis of variable short-sequence DNA repeats on the 29kb plasmid of *Erwinia amylovora*. *Europ. J. Plant Path.* **103**, 703–713 (1999)
36. Kur J.: *Podstawy inżynierii genetycznej. Teoria, ćwiczenia, testy.* Wyd. Politechniki Gdańskiej, Gdańsk, 1994, s. 227
37. Lecomte P., Manceau Ch., Paulin J-P., Keck M.: Identification by PCR analysis on plasmid pEA29 of isolates of *Erwinia amylovora* responsible of an outbreak in Central Europe. *Europ. J. Plant. Path.* **103**, 91–98 (1997)
38. Llop P., Bonaterra A., Peñalver J., López M.M.: Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Appl. Env. Microbiol.* **66**, 2071–2078 (2000)
39. Llop P., Donat V., Rodríguez M., Cabrefiga J., Ruz L., Palomo J.L., Montesinos E., López M.M.: An indigenous virulent strain of *Erwinia amylovora* lacking the ubiquitous plasmid pEA29. *Phytopath.* **96**, 900–907 (2006)
40. Llop P., González R., Pulawska J., Bultreys A., Dreo T., López M.M.: The new plasmid pEI70 is present in *Erwinia amylovora* European strains. *Acta Hort.* **793**, 131–136 (2008)
41. Louws F.J., Rademaker J.L.W., Bruijn F.J.: The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: Diversity, Detection, and Disease Diagnosis. *Ann. Rev. Phytopath.* **37**, 81–125 (1999)
42. Lupski J.R., Weinstock G.M.: Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. Bacteriol.* **174**, 4525–4529 (1992)
43. Łojkowska E.: *Diagnostyka molekularna roślin (w) Biotechnologia Roślin*, red. S. Malepszy, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2001, s. 462–485
44. Manulis S., Kleitman F., Dror O., Davis I., Zutra D.: Characterisation of *Erwinia amylovora* population in Israel. *Phytoparasitica*, **26**, 39–46 (1998)
45. Manulis S., Zutra D., Ga'ash D., Kleitman F., Dror O., Elisha S., David I., Rav-David D., Zilberstaine M., Herzog Z., Shabi E.: Streptomycin resistance of *Erwinia amylovora* in Israel and occurrence of blossom blight in the autumn. *Phytoparasitica*, **24**, 161 (1996)
46. McGhee G.C., Jones A.L.: Complete nucleotide sequence of ubiquitous plasmid pEA29 from *Erwinia amylovora* strain ea88: gene organisation and interspecies variation. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4897–4907 (2000)
47. McManus P.S., Jones A.L.: Epidemiology and genetic analysis of streptomycin resistant *Erwinia amylovora* from Michigan and evaluation of oxytetracycline for control. *Phytopath.* **84**, 627–633 (1994)
48. McManus P.S., Jones A.L.: Detection of *Erwinia amylovora* by nested PCR, PCR-dot-blot and reverse-blot hybridisation. *Phytopath.* **85**, 618–623 (1995)
49. McManus P.S., Jones A.L.: Genetic fingerprinting of *Erwinia amylovora* strains isolated from tree-fruit crops and *Rubus* spp. *Phytopath.* **85**, 1547–1553 (1995)
50. Mergaret J., Verdonock L., Kersters K., Swings J., Boeufgras J-M., de Lay J.: Numerical taxonomy of *Erwinia amylovora* species using API systems. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 1893–1910 (1984)
51. Miller T.D., Schroth M.N.: Monitoring the epiphytic population of *Erwinia amylovora* on pear with selective medium. *Phytopath.* **62**, 1175–1182 (1972)
52. Minardi T.F., Stefani P., Mazzucchi U.: *Erwinia amylovora* isolates associated with 1997 fireblight epidemic in the Po Valley derived from the same clone (w) Book of Abstracts 9<sup>th</sup> Congress Europ. Foundation for Plant Pathology, “Biodiversity in Plant Pathology”, Taromina, 18 September 2000, s. 37
53. Momol M.T., Aldwinckle H.S.: Genetic diversity and host range of *Erwinia amylovora* (w) Fire blight. The disease, and it's casual agent *Erwinia amylovora*. CABI Publ. Wallingford UK, 2000, s. 55–72.
54. Momol M.T., Momol E.A., Lamboy W.F., Norelli J.L., Beer S.V. Aldwinckle H.S.: Characterisation of *Erwinia*

- amylovora* strains using random amplified polymorphic DNA fragments (RAPDs). *J. Appl. Microbiol.* **82**, 339–398 (1997)
55. Momol E.A., Momol M.T., Norelli J.L., Beer S.V., Burr T.J., Aldwinckle H.S.: Relatedness of *Erwinia amylovora* strains based on amplified 16S-23S ribosomal DNA restriction enzyme analysis-ARDREA. *Acta Hort.* **489**, 55–59 (1999)
  56. Norelli J.L., Aldwinckle H.S., Beer S.V.: Differential susceptibility of *Malus* spp. Robusta 5, Novole, and Ottawa 523 to infection by *Erwinia amylovora*. *Plant Dis.* **70**, 1017–1019 (1986)
  57. Palmer E. L., Teviotdale B. L., Jones A. L.: A relative of the broad-host-range plasmid RSF1010 Detected in *Erwinia amylovora*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4604–4607 (1997)
  58. Paulin J.P.: *Erwinia amylovora*: general characteristic (w) Fire blight. The disease, and its casual agent *Erwinia amylovora*. CABI Publ. Wallingford UK, 2000, s. 87–115.
  59. Puławska J., Kielak K., Sobiczewski P.: Study of phenotypic and genetic diversity of selected Polish *Erwinia amylovora* strains. *Acta Hort.* **704**, 439–444 (2006)
  60. Rico A., Fuhrer M.E., Ortiz-Barredo A., Murillo J.: Polymerase Chain Reaction Fingerprinting of *Erwinia amylovora* has a Limited Phylogenetic Value but Allows the Design of Highly Specific Molecular Markers. *Phytopath.* **98**, 260–269 (2008)
  61. Rico A, Ortiz-Barredo A, Ritter E, Murillo J.: Genetic characterization of *Erwinia amylovora* strains by amplified fragment length polymorphism. *J. Appl. Microbiol.* **96**, 302–210 (2004)
  62. Ries S.M., Otterbacher A.G.: Occurrence of fire blight on thornless blackberry in Illinois. *Plant Dis. Rep.* **61**, 232–235 (1977)
  63. Ruppitsch W., Stoeger A., Keck M.: Stability of short sequence repeats and their application for the characterization of *Erwinia amylovora* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **234**, 1–8 (2004)
  64. Saad A.T., Hana L., Choueiri E.: Evaluation of streptomycin and oxytetracycline resistance of *Erwinia amylovora* populations in Lebanon. *Phytopath.* **90**, S68 (2000)
  65. Schatz A., Bugie E., Waksman S.A.: Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **55**, 66–69 (1944)
  66. Schnabel E.L., Jones A.L.: Instability of pEA29 marker in *Erwinia amylovora* previously used for strain classification. *Plant Dis.* **82**, 1334–1336 (1998)
  67. Sholberg P.L., Bedford K.E., Haag P., Randall P.: Survey of *Erwinia amylovora* isolates from British Columbia for resistance to bactericides and its virulence on apple. *Can. J. Pl. Path.* **23**, 60–67 (2001)
  68. Schwartz T., Brenhard F., Theiler R., Geider K.: Diversity of the fire blight pathogen in production of dihydrophenylalanine, a virulence factor of some *Erwinia amylovora* strains. *Phytopath.* **81**, 873–878 (1991)
  69. Schroth M.N., Thomson S.V., Moller W.J.: Streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. *Phytopath.* **69**, 565–568 (1979)
  70. Sobiczewski P., Berczynski S., Streptomycin for control of fire blight (*Erwinia amylovora*) in Poland. *Phytopath. Pol.* **20**, 171–174 (2000)
  71. Starr M.P., Cardona C., Folsom D.: Bacterial fire blight of raspberry. *Phytopath.* **41**, 915–919 (1951)
  72. Taylor R.K., Hale C.N.: Identification and characterisation of isolates of *Erwinia amylovora* from cotoneaster in Australia. *Austr. Biotechnol.* **6**, 353–356 (1998)
  73. Thomson S.V., Gouk S.C., Vanneste J.L., Hale C.N., Clark R.G.: The presence of streptomycin resistant strains of *Erwinia amylovora* in New Zealand. *Acta Hort.* **338**, 223–230 (1993)
  74. Ugorski M., Chmielewski R.: Powtórzone sekwencje DNA typu REP i ERIC u bakterii – znaczenie diagnostyczne. *Post. Hig. Med. Doś.* **54**, 3–15 (2000)
  75. Van der Zwet T., Keil H.L.: Fire blight – a bacterial disease of rosaceous plants. Agric. Handbook 510, U.S. Dept. of Agriculture, Washington D.C., 1979, s. 200.
  76. Van der Zwet T., Wells J.M.: Application of fatty acid class analyses for the detection and identification of *Erwinia amylovora*. *Acta Hort.* **338**, 233 (1993)
  77. Vantomme R., Swings J., Goor M., Kersters K., De Ley J.: Phytopathological, serological, biochemical and protein electrophoresis characterisation of *Erwinia amylovora* strains isolated in Belgium. *Phytopath. Z.* **103**, 349–360 (1982)
  78. Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R.: Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **19**, 6923–6831 (1991)
  79. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M.: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **23**, 4407–4414 (1995)
  80. Waleron M., Waleron K., Geider K., Łojkowska E.: Application of RFLP analysis of *recA*, *gyrA* and *rpoS* gene fragments for rapid differentiation of *Erwinia amylovora* from *Erwinia* strains isolated in Korea and Japan. *Eur. J. Plant Pathol.* **121**, 161–172 (2008)
  81. Waleron M., Waleron K., Podhajska A.J., Łojkowska E.: Molecular comparison of pathogenic bacteria from pear trees in Japan and the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Microbiology* **147**, 2951–2959 (2002)
  82. Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V.: DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.* **18**, 6531–6535 (1990)
  83. Zhang Y., Geider K.: Differentiation of *Erwinia amylovora* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microb.* **63**, 4421–4426 (1997)
  84. Zhang Y., Merighi M., Bazzi C., Geider K.: Genomic analysis by pulsed-field gel electrophoresis of *Erwinia amylovora* strains from the Mediterranean region including Italy. *J. Plant Path.* **80**, 225–232 (1998)
  85. Żarnowski R., Lewicka T., Ellis R.J.: Evaluation of natural diversity among *Erwinia amylovora* isolates on the basis of total cellular protein and fatty acid patterns. *Acta Hort.* **590**, 185–192 (2002)





**Jowita Samanta Niczyporuk\*, Elżbieta Samorel-Salmonowicz, Hanna Czekaj**

Zakład Chorób Wirusowych Drobiu, Państwowy Instytut Weterynaryjny  
– Państwowy Instytut Badawczy, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Wpłynęło w lipcu 2009 r.

1. Ogólna charakterystyka rodziny *Reoviridae*. 2. Morfologia. 2.1. Wirion. 2.2. Genom. 2.3. Białka wirusowe (białka strukturalne, białka niestrukturalne). 3. Właściwości onkolityczne reowirusów. 4. Występowanie zakażeń u ludzi. 5. Zakażenia u trzody chlewnej. 6. Reowirusy u drobiu. 7. Diagnostyka zakażeń. 8. Immunoprofilaktyka. 9. Podsumowanie

#### **Reoviruses – structure and pathogenicity for human and animals**

**Abstract:** Avian reoviruses have icosahedral symmetry and a capsid with a diameter of 75–80 nm enclosing segmented double – stranded RNA and are non-enveloped. The members of the *Orthoreovirus* genus have been classified into mammalian and avian origin groups. Both groups have a genome consisting of 10–12 segments encoding eight structural proteins and four non-structural proteins separated into three size classes: large ( $\lambda$ ), medium ( $\mu$ ), and small ( $\sigma$ ). Avian reoviruses have failed to replicate in most of the mammalian cell lines tested.

Four of *Reoviridae* genera – *Orthoreovirus*, *Coltivirus*, *Rotavirus*, and *Orbivirus* are cause of human diseases, in most cases symptomless. Human rotaviruses cause inflammation, mainly of the upper gastrointestinal tract, which affects usually children of 6 to 24 months of age. Reoviruses carried by thick *D. andersoni* are frequently responsible for Colorado tick fever in USA.

Reoviruses of types 1 and 3, rotaviruses, and orbiviruses can infect porcine by respiratory or oral route. Most of the infections are symptomless or manifested by fever and diarrhea.

Avian reoviruses have been isolated from chickens without any clinical signs of disease, but also are associated with poultry disease conditions such as tenosynovitis, gastrointestinal malabsorption syndrome, growth retardation, and sudden death. They infect wild and farm-raised birds. Vaccination is most important to control reoviruses.

1. General characteristic of *Reoviridae* family. 2. Morphology. 2.1. Virion. 2.2. Genome. 2.3. Reovirus proteins (structural and non-structural proteins). 3. Oncolytic proteins. 4. Infections in humans. 5. Porcine infections. 6. *Reoviruses* in poultry. 7. Diagnostics of reovirus infection. 8. Immunoprophylaxis. 9. Summary

---

**Słowa kluczowe:** budowa, chorobotwórczość, *Reowirusy*

**Key words:** pathogenicity, *Reoviruses*, structure

---

## **1. Ogólna charakterystyka rodziny *Reoviridae***

Wirusy należące do rodziny *Reoviridae* są szeroko rozpowszechnione w populacjach wielu gatunków zwierząt oraz u człowieka. Nazwa tej rodziny pochodzi od angielskiego określenia wirusów występujących w układzie oddechowym i pokarmowym (Respiratory, Enteric, Orphan) zwanych również wirusami sierocymi, gdyż początkowo nie przypisywano im możliwości wywoływania chorób. Po raz pierwszy izolowano reowirusy w 1951 roku z wymazu odbytniczego pochodzącego od zdrowego dziecka [8, 32, 37]. W roku 1954 reowirusy wyizolowano od kurcząt wykazujących objawy ze strony układu oddechowego [25]. W następnych latach wykryto je u wielu gatunków ptaków. Najczęściej występowały one u kur i indyków, izolowano je również od gęsi, kaczek, perliczek, przepiórek i gołębi, a także od ptaków dzikich i egzotycznych [38].

Wirusy zaliczone do rodziny *Reoviridae*, są wirusami RNA, nie posiadają otoczki lipidowej, charakteryzują się sferycznym kapsydem zawierającym genom w postaci 10–12 segmentów ds. RNA. W skład rodziny

wchodzi 12 rodzajów, które można podzielić na dwie główne grupy: tworzące „wieżyczki” (np. ortoreowirusy, aquareowirusy, cypowirusy) oraz nie tworzące „wieżyczek” (np. rotawirusy, orbivirusy, phytoreowirusy). Wieżyczki są to wypustki kapsydu tworzone wzdłuż dwunastu pięciobocznych osi wirusa. Wieżyczki zbudowane są z pentamerów tworzonych przez wirusowy enzym  $\lambda$ C tworzący „czapeczki” oraz białko  $\sigma$ C odpowiedzialne za wiązanie receptora komórki. Orto-reowirusy można dalej podzielić na pięć podgrup: reowirusy ssaków (MRV), reowirusy ptasie (ARV), reowirusy pawianów (BRV), wirus Nelson Bay (zakażający nietoperze z rodzaju *Pteropus*) oraz grupa izolowana od gadów [14, 36, 37, 41].

## **2. Morfologia**

Wiriony reowirusów zawierają kapsyd, rdzeń i kompleks nukleoproteidowy. Podczas cyklu życiowego w fazie zewnątrzkomórkowej wiriony tracą wewnątrzkomórkową osłonkę pochodzącą z retikulum endoplazmatycznego. Wiriony mogą być oddzielone w kulistych

---

\* Autor korespondencyjny: Adres autora: Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: [jowita.niczyporuk@piwet.pulawy.pl](mailto:jowita.niczyporuk@piwet.pulawy.pl)

ciałach wtretowych i najczęściej zawierają pojedynczy nukleokapsyd. Wirus inicjujący zakażenie jest otoczony przez krystaliczną macierz białkową o wielościennym kształcie, zawierającą najczęściej po kilka wirionów [3, 32, 41].

### 2.1. Wirion

Bezotoczkowy wirion ortoreowirusów ma średnicę około 850 Å, posiada podwójny kapsyd zbudowany z dwóch koncentrycznych warstw białkowych osłaniających genom. Na powierzchni wirionu występuje 600 wypustek ułożonych heksametrycznie wokół pięciościennych wierzchołków. W ten sposób pentametryczne wieżyczki rdzenia uczestniczą w tworzeniu zewnętrznej powierzchni. Wirion pozbawiony zewnętrznej osłony tworzy cząsteczki infekcyjne (ISVP – Infections SubViral Particle) o średnicy 800 Å. Po usunięciu zewnętrznego kapsydu zostaje rdzeń o guzkowatej powierzchni wyróżniający się wieżyczkami wystającymi z 12 pięciobocznych wierzchołków. Rdzeń składający się z pięciu białek i 10 fragmentów genomu jest w stanie przeprowadzać transkrypcję i produkować wirusowe mRNA w trakcie replikacji.

Zewnętrzny kapsyd tworzony jest przez białko  $\sigma B$ . Jest to białko o masie 41 kDa tworzące wypustki pośredniczące w kontakcie z zakażoną komórką. Poniżej zewnętrznego kapsydu znajduje się 200 trimerów białka  $\mu B$  o masie 76 kDa, oraz 12 trimerów białka  $\sigma C$  (49 kDa), odpowiadającego za wiązanie z receptorami komórki gospodarza. W zewnętrznej warstwie wyróżnić można także trzy rodzaje kanałów P1, P2 oraz P3. Kiedy rdzeń jest pozbawiony zewnętrznych osłon białko  $\sigma C$  nie blokuje kanałów P1. 60 kanałów P2 jest utworzonych przez 4 jednostki  $\sigma B$ , a 6 takich jednostek białka tworzy 60 kanałów P3. Mimo, że białka  $\sigma B$  występują w kanałach jako osobne jednostki to przypuszcza się, że jest możliwe tworzenie pomiędzy nimi połączeń. Większość połączeń kapsydu utworzona jest przez trimery białka  $\mu B$ , z którymi łączą się  $\sigma B$  tworząc heteroheksameryczne struktury. Kanały P1, P2 oraz P3 służą do transportu substratów oraz wydostawania się nowych nici mRNA [3, 13, 32].

Podwójny białkowy kapsyd zapewnia reowirusom oporność na działanie czynników środowiskowych, rozpuszczalników tłuszczowych, kwaśnego pH i wielu środków odkażających [31].

Rdzeń zbudowany jest z osłony tworzonej przez 120 kopii białka  $\lambda A$  o masie 142 kDa, a także z 150 monomerów białka  $\sigma A$  (47 kDa) oraz 12 pentamerów  $\lambda C$  (144 kDa) białka tworzącego wypustki. Pozostałe białka błonowe,  $\lambda B$  – zależna od RNA polimeraza RNA oraz przypuszczalnie  $\mu A$  są umieszczone wewnątrz rdzenia pod wieżyczkami  $\lambda C$ . Pentamery białka  $\lambda C$  wystają promieniście ponad powierzchnią kapsydu na

odległość około 80 Å wzdłuż jego osi symetrii. Pojedyncze kopie białka  $\lambda B$  (142 kDa) mieszczą się pod pentametrami  $\lambda C$ , jednak nie są ułożone w osi wieżyczki [3, 30, 36, 48, 44, 41]

### 2.2. Genom

Reowirusy posiadają segmentowany genom, który składa się z 10–12 odcinków dsRNA, stanowi on 15–20% masy wirionu. Fragmenty te są rozróżniane na podstawie wielkości. Podzielono je na 3 segmenty duże (L1, L2, L3), 3 segmenty średnie (M1, M2, M3) oraz 4 segmenty małe (S1, S2, S3, S4). Każdy genom zawiera po jednej kopii każdego z segmentów, a każdy z nich łączy się z osobną polimerazą RNA zależną od RNA (białko  $\lambda B$ ). Sekwencjonowanie segmentów dsRNA wykazało, że wszystkie zawierają po jednej otwartej ramce odczytu (ORF) z wyjątkiem segmentu S1, który ma ich trzy. Dodatnia nić jest identyczna z kodowanym mRNA, i zawiera czapkę typu-1 (type-1 cap, 5'-m7GpppAmG-), natomiast nić ujemna ma w analogicznym miejscu grupę pirofosfatową. U wszystkich ptasich reowirusów nić dodatnia RNA zawiera na swym końcu 5' sekwencję GCUUUU natomiast na końcu 3' sekwencję UCAUC oraz brak ogona poli-A. Sekwencje te prawdopodobnie związane są z procesami transkrypcji, replikacji lub kapsydacji genomu. Tak jak w przypadku innych wirusów z rodziny *Reoviridae* w przypadku zakażenia komórki jednocześnie przez dwa odmienne szczepy wirusa może dochodzić do powstania nowego szczepu zawierającego segmenty losowo pochodzące od obu zakażających szczepów [3, 22, 36, 41].

### 2.3. Białka wirusowe

W trakcie ekspresji genomu reowirusów ptasich powstaje 12 głównych produktów białkowych, z których 8 to białka strukturalne, tworzące w późniejszych etapach wiriony potomne, natomiast pozostałe 4 białka są niestrukturalne. Nazwy białek reowirusów tworzone są przez połączenie greckiej litery oznaczającej z której klasy segmentów genomu pochodzi dany transkrypt (L- $\lambda$ , M- $\mu$ , S- $\sigma$ ) oraz arabskiej litery oznaczającej miejsce w czasie elektroforezy w odwrotnej kolejności do mobilności segmentów ( $\lambda A$ ,  $\lambda B$  itd.), w odróżnieniu do reowirusów ssaków gdzie oznaczenia tworzy się analogicznie przez połączenie litery greckiej z cyfrą. Białka strukturalne tworzące kapsyd ( $\lambda A$ ,  $\lambda B$ ,  $\lambda C$ ,  $\mu A$ ,  $\mu B$ ,  $\sigma A$ ,  $\sigma B$ ,  $\sigma C$ ) powstają bezpośrednio w czasie translacji. Białko  $\mu B$  może ulegać cięciu potranslacyjnemu i tworzyć dwa kolejne białka:  $\mu BN$  oraz  $\mu BC$  [3, 22, 30, 36]. Reowirusy tworzą także kilka białek niestrukturalnych ( $\mu NS$ ,  $\mu NSN$ ,  $\mu NSC$ , p10, p17,  $\sigma NS$ ). Białka  $\mu NS$  oraz  $\sigma NS$  kodowane są przez segmenty

odpowiednio M3 oraz S4. Komórki ptaków po zakażeniu reowirusami produkują także białko  $\mu$ NSC, które jest modyfikowanym białkiem  $\mu$ NS. Białko to powstaje przez hydrolityczny rozkład  $\mu$ NS, a nie przez transkrypcję zaczynającą się od wewnętrznego kodonu AUG w segmencie M3. Białka p10 i p17 będące kolejnymi białkami niestrukturalnymi są kodowane przez dwa pierwsze cistrony segmentu S1. Wykazano bliskie powiązania pomiędzy rozmiarami wirusowych genów i rozmiarami kodowanych przez nie protein, za wyjątkiem segmentu S1. Gen ten jest największym genem z klasy S kodującym najmniejszą strukturalną proteinę  $\sigma$ C. Sekwencja tego genu posiada unikalny układ cistronów zawierający trzy przesunięte w fazie ORF, a  $\sigma$ C jest kodowane przez cistron najbliższy końcowi 3'. Zastosowanie specyficznych przeciwciał dla każdej z protein kodowanych przez te cistrony dowiodło, że gen S1 ptasich reowirusów koduje dwie niestrukturalne proteiny p10 i p17 oraz strukturalną proteinę  $\sigma$ C w zakażonych komórkach, a to świadczy, że S1 funkcjonalnie jest genem tricistronowym [12, 22, 36].

**Białka strukturalne.** Białko  $\lambda$ A, kodowane jest przez gen L1, formuje wewnętrzny rdzeń osłonki zamykającej segmenty wirusowego genomu i wirusową polimerazę RNA oraz jest podstawą do późniejszego budowania rdzenia wirusa. Proteina  $\lambda$ A bardzo szybko łączy się z centrami produkującymi wiriony w zakażonych komórkach. Jest rozproszona w cytoplazmie gdyż tylko ona jest produkowana w komórce. W przypadku wspólnej ekspresji  $\lambda$ A z białkiem  $\mu$ NS łączy się w postaci globularnych wtretów, co sugeruje aktywność  $\mu$ NS we wprowadzaniu  $\lambda$ A do centrów produkcji wirionów [30].

Kodowane przez segment L2 białko  $\lambda$ B jest mniej liczny składnikiem wirusowego rdzenia. Jest jedyną reowirusową proteiną, której sekwencja nie jest do dzisiaj poznana. Mimo że nie ma eksperymentalnych dowodów na aktywność polimerazy RNA u któregoś z reowirusowych polipeptydów, wydaje się, że taka sytuacja zachodzi w przypadku  $\lambda$ B, ponieważ jego wielkość i liczba kopii jest podobna do analogicznych polimeraz RNA u reowirusów ssaczy [30].

Gen L3 koduje białko  $\lambda$ C będące wirusowym enzymem modyfikującym mRNA przez dodanie tzw. „czapeczki”. Białko to jest więc jedyną strukturalną proteiną wirusa, która łączy się z GMP przez wiązanie fosfoamidowe i może przenosić je na akceptory GDP lub GTP tworząc czapeczki czyli metyloguanozydowe zakończenia ochronne mRNA na ich końcu 5' [3]. Zdolność tą posiada 42 aminokwasowa domena na końcu N białka. Wydaje się także, że pozostały 100 aminokwasowy fragment jest całkowicie zbędny dla tej aktywności. Jednakże badania porównawcze sekwencji  $\lambda$ C i jego odpowiedników u reowirusów ssaków i ryb

wykazały, że fragment 100-aa białka  $\lambda$ C prawdopodobnie posiada aktywność metylazy tak jak jego odpowiedniki u innych rodzajów reowirusów [29, 30].

Białko  $\mu$ A kodowane przez fragment M1 jest jednym z białek tworzących wewnętrzny kapsyd. Nie przeprowadzono jednak jak dotąd szczegółowych badań funkcji i aktywności tego polipeptydu. U reowirusów ssaków, białko  $\mu$ 2 wchodzi w interakcje z mikrotubulami oraz z białkiem  $\mu$ NS. Aktywności te mają prawdopodobnie związek z łączeniem wirusowych „fabryk” do mikrotubuli, stąd większość reowirusów ssaków tworzy centra produkujące wiriony w układzie liniowym. Reowirusy ptasie natomiast w układzie globularnym nie są związane z mikrotubulami, co sugeruje, że  $\mu$ A nie wykazuje aktywności wiązania mikrotubuli [6, 30, 49].

Białko  $\mu$ B (segment M2) jest modyfikowane na końcu N przez dodanie grupy mirystylowej. Większość produkowanych w zakażonej komórce polipeptydów  $\mu$ B ulega rozpadowi w pobliżu końca N tworząc mały mirystylowany polipeptyd  $\mu$ BN oraz duży fragment  $\mu$ BC. Wszystkie trzy białka (prekursor i produkty) są składnikami zewnętrznego kapsydu. W procesie rozpadu  $\mu$ B na dwa produkty prawdopodobnie uczestniczy dodatkowo inne białko wirusowe na co wskazuje fakt, że białko  $\mu$ B jest rozkładane w komórce tylko w obecności pozostałych białek wirusa. Mimo, że nie zidentyfikowano jak dotąd, które białko uczestniczy w tym procesie, najprawdopodobniej jest to  $\sigma$ B, tworzące kompleks z  $\mu$ B i  $\mu$ BC w cytoplazmie gospodarza. Ponadto  $\mu$ BC uczestniczy we wprowadzeniu wirionu do wnętrza komórki, ulega ono dwukrotnie hydrolizie blisko końca C tworząc dwa polipeptydy  $\delta$  i  $\delta'$ . Modyfikacja ta umożliwia przełamanie przez winion bariery lizosomu i wniknięcie do cytoplazmy komórki [30, 47, 49].

Wewnętrzna osłona rdzenia jest tworzona przez białko  $\sigma$ A, kodowane przez gen S2. Wykazuje ono aktywność wiązania dsRNA niezależnie od sekwencji, natomiast z dużym powinowactwem.  $\sigma$ A ma zdolność rozkładania trójfosfonukleotydów do mono- i difosfonukleotydów i reszty fosforanowej. Dzięki zdolności do hamowania aktywacji zależnej od dsRNA kinazy białkowej PKR,  $\sigma$ A jest w stanie ograniczać skuteczność interferonu, a więc może grać główną rolę w ochronie reowirusów przed jego działaniem. Ponadto  $\sigma$ A wspomaga morfogenezę reowirusów przez stabilizację osłony rdzenia budowanej przez  $\lambda$ A [1, 17, 20, 50].

Kodowane przez S3 białko  $\sigma$ B jest głównym składnikiem zewnętrznego kapsydu. Bardzo szybko ulega spontanicznej asocjacji z  $\mu$ B i  $\mu$ BC w cytozolu zakażonych komórek tworząc heterooligomeryczny kompleks zawierający równe ilości poszczególnych białek, który włączany jest do budowanego kapsydu [30, 50].

Białko  $\sigma$ C, kodowane przez cistron segmentu S1 bliski końcowi 3', jest odpowiedzialne za przyłączenie

do zakażanej komórki. Jest to jedyne białko reowirusów zdolne do wiązania się do błony komórek [16]. W stanie natywnym występuje ono jako homotrimer i w takiej postaci wykazuje zdolność do przyłączania do struktur błony komórkowej. Koniec C białka  $\sigma C$  zawiera globularną domenę wiążącą receptor komórkowy. Fragment ten jest bardzo podobny do swego odpowiednika u reowirusów ssaków z dodatkowymi dwoma powtórzeniami potrójnej spirali. Wykazano także, że  $\sigma C$  może indukować apoptozę zakażonych komórek jednak mechanizm tego procesu nie został w pełni zbadany [5, 12, 21, 26, 27, 30, 50].

**Białka niestrukturalne.** Na matrycy reowirusowego genu M3 powstaje 70 kDa niestrukturalne białko  $\mu NS$ . Białko to jest cięte przez komórkową proteazę na dwa potomne polipeptydy  $\mu NSN$  i  $\mu NSC$ , jednak funkcja tej hydrolizy nie została poznana. Spośród wszystkich wirusowych białek tylko  $\mu NS$  jest zdolne do samodzielnego tworzenia ciał inkluzyjnych, co oznacza prawdopodobnie, że jest ono niezbędne we wczesnych etapach morfogenezy wirusa. Białko to wspomaga włączanie do ciał inkluzyjnych białek  $\sigma NS$  oraz  $\lambda A$  [1, 30, 33, 49].

Pierwszy cistron fragmentu S1 koduje niestrukturalne białko p10, będące białkiem transbłonowym typu 1, którego środkowa domena transmembranowa oddziela zewnętrzną i wewnętrzną domenę. Ekspresja p10 w transfekowanych komórkach wykazała, że białko to wpływa na fuzję komórkową, wywoływaną przez reowirusy ptasie. Domena wewnętrzna jest połączona z transmembranowym motywem dwucysteinowym, który jest palmitylowany, co jest niezbędne do aktywności fuzyjnej. Dla tej zdolności białka p10 istotna też jest hydrofobowa domena końca N oraz motyw trójglicynowy w domenie transmembranowej. Białko p10 ma właściwości permeazy błon bakteryjnych i eukariotycznych [5, 12, 27, 30, 40, 50].

Druga otwarta ramka odczytu segmentu S1 koduje białko p17, które nie wykazuje homologii z żadnym innym białkiem wirusowym lub komórkowym. Białko to gromadzi się w jądrze komórkowym i tam służy jako pośrednik pomiędzy jądrem a cytoplazmą. Wykazano związek pomiędzy obecnością p17 w jądrze a aktywnością transkrypcji w komórce, ponadto białko to posiada zdolność wiązania DNA, ciągle jednak nie wykazano jaką rolę odgrywa w cyklu życiowym reowirusów. Prawdopodobnie p17 wpływa na proliferację komórek przez aktywację białka p53 i p21<sup>cip1/waf1</sup> [5, 9, 12, 27, 28, 30, 50].

Fragment genomu S4 koduje niestrukturalne białko  $\sigma NS$ , które wiąże jednoniciowe RNA niezależnie od sekwencji i występuje w dużych kompleksach rybonukleinowych w zakażonych komórkach. Pozbawione RNA białko  $\sigma NS$  tworzy homodimery i homo-

trimery. Minimalna długość wiążanego odcinka RNA mieści się pomiędzy 10 a 20 nukleotydów. Sekwencja aminokwasowa odpowiedzialna za wiązanie RNA jest rozproszona w całej sekwencji białka  $\sigma NS$ , co wskazuje na zależność wiązania od konformacyjnego ukształtowania białka. Jako niestrukturalne białko wiążące RNA kumulujące się w wirusowych fabrykach spełnia ono rolę przy pakowaniu RNA oraz replikacji, jednak hipoteza ta wymaga dalszych badań [1, 3, 11, 30, 33, 36, 44–46, 50].

### 3. Właściwości onkolityczne reowirusów

Badania przeprowadzone z wykorzystaniem reowirusów ludzkich jako czynnika antynowotworowego dały pozytywne rezultaty. Reowirusy bowiem zakażają komórki z nadaktywnym szlakiem sygnalizacyjnym, w którym istotną rolę odgrywa białko c-RAS. Replikacje reowirusów w komórkach fizjologicznie zdrowych hamuje kinaza białkowa [2] aktywowana przez ds RNA. Natomiast aktywność PKR jest osłabiona w komórkach z nadaktywnym szlakiem sygnalizacyjnym c-RAS, dzięki czemu wirus przechodzi pełny cykl lityczny. Istotnym jest fakt, że u ponad 30% ludzkich nowotworów, mutacje zachodzą w genie c-RAS. Te specyficzne i unikalne właściwości reowirusów do tego typu komórek, stały się podstawą dalszych testów nad wirusem jako czynnikiem onkolitycznym. Doświadczalnie wykazano, że reowirusy, oprócz szlaku sygnalizacyjnego c-RAS potrzebują do przeprowadzania replikacji aktywności RalGEF i p38. Wykazano zbieżność aktywności szlaków RalGEF i p38 oraz c-RAS w wielu ludzkich nowotworach. Sądzi się, że właśnie one mogą brać znaczny udział w terapii przeciwnowotworowej. Proponowane jest zastosowanie reowirusów w terapii medulloblastomy (MB), nowotworu trzustki, jelita grubego, jajnika i piersi. Niezbędne są jednak dalsze badania nad mechanizmami właściwości onkolitycznych tych wirusów [4, 15, 24, 35].

### 4. Występowanie zakażeń u ludzi

Spośród 9 rodzajów rodziny *Reoviridae*, cztery z nich – orthoreowirusy, coltiwirusy, rotawirusy oraz orbivirusy powodują zakażenia u ludzi. Większość z nich może przebiegać bezobjawowo, czego wynikiem jest powszechność występowania przeciwciał przeciwko reowirusom w surowicy u ludzi dorosłych. U dzieci wszystkie serotypy reowirusów stwierdzano w przebiegu infekcji górnych dróg oddechowych, stanach zapalnych jelit, biegunce, stanach gorączkowych, a także u dzieci zdrowych. Nie udało się potwierdzić ścisłej relacji pomiędzy występowaniem objawów choroby a zakażeniem reowirusami [2, 23]

Częstym schorzeniem wywoływanym przez reowirusy jest kleszczowa gorączka Kolorado, najczęściej notowana na terenie USA. Choroba jest przenoszona przez kleszcza drzewnego *D. andersoni*. Replikacja wirusa przebiega w gruczołach limfoidalnych, śledzionie, sercu i wątrobie. Przebieg choroby jest zazwyczaj łagodny, często nawet nie dochodzi do zdiagnozowania jej przez lekarza lub jest mylona z innymi jednostkami chorobowymi. Przypadki o ciężkim przebiegu są niezwykle rzadkie, natomiast do śmierci może dojść jedynie w wyniku powikłań [2, 23].

Ludzkie rotawirusy powodują głównie zapalenia żołądka i jelit u dzieci w wieku od 6 do 24 miesięcy życia. Wirus rozprzestrzenia się drogą doustną prowadząc do infekcji w górnych odcinkach przewodu pokarmowego. Po krótkim okresie inkubacji dochodzi do szeregu zmian w fizjologicznym funkcjonowaniu narządów. Rotawirusy zakażają przede wszystkim komórki kosmków jelita cienkiego prowadząc do silnych biegunek, natomiast nie stwierdza się ich w błonie śluzowej. Namnażając się w enterocytach zaburzają ich funkcje transportowe. Wirus wydalany jest w kale przez okres 2–12 dni. Rekonwalescencja może trwać do 8 tygodni. Śmiertelność w przebiegu zakażeń rotawirusowych wynosi 10–20%. U osób dorosłych zakażenie przebiega bardzo łagodnie lub bezobjawowo. W celu zabezpieczenia przed zachorowaniem stosowane są szczepienia profilaktyczne u dzieci w pierwszych 24 tygodniach życia [2, 23].

## 5. Zakażenia u trzody chlewnej

U świń zidentyfikowano reowirusy typu 1 oraz typu 3 jak również infekcje wywołane przez rotawirusy oraz orbiwirusy. Wirusy te były izolowane od zdrowych zwierząt jak i z objawami klinicznymi ze strony przewodu pokarmowego. Przeciwciała przeciwko reowirusom przekazywane przez matkę swemu potomstwu chronią je przez około 11 tygodni, po czym zwierzęta stają się wrażliwe na zakażenie. Do zakażenia dochodzi głównie przez przewód pokarmowy i oddechowy, są to główne miejsca replikacji tych wirusów. Próby wywołania choroby w warunkach laboratoryjnych przez zakażenie donosowe lub dootrzewnowe prosiąt szczepami reowirusów pochodzącymi od świń lub człowieka najczęściej powodowały jedynie krótkotrwałą gorączkę bez innych objawów klinicznych. Wirusy wydalane są z kałem i z wydzieliną z jamy nosowej od 24 godziny po zakażeniu. Siewstwo wirusa trwa przez około 2 tygodnie. Zakażenie przebiega najczęściej łagodnie z objawami gorączki oraz zaburzeniami łaknienia powoduje miejscową atrofię kosmków jelita krętego i czczego. Przy zakażeniu dróg oddechowych obserwuje się agregację limfocytów i makrofagów w pęcherzy-

kach płucnych oraz nacieki limfocytów w grudkach okołoskrzelikowych. Zakażenia reowirusami u świń nie stanowią znaczącego problemu ekonomicznego, nie opracowano metod ich leczenia i zapobiegania [42].

## 6. Reowirusy u drobiu

U ptaków zakażenia wywoływane są przez wirusy należące do rodzaju *Orthoreovirus*. ARV posiadają cechy morfologiczne i fizykochemiczne zbliżone do reowirusów ssaków. Różnice pomiędzy nimi polegają na braku zdolności aglutynowania krwinek przez reowirusy ptasie oraz typie efektu cytopatycznego indukowanego w hodowlach komórkowych. ARV w odróżnieniu od MRV wywołują fuzję komórek [32, 36, 37, 39]. Brak aktywności fuzogenicznej reowirusów ssaków wynika z różnic w segmencie S1. Reowirusy ptasie zawierają w tym segmencie trzy otwarte ramki odczytu kodujące białka p10, p17 oraz  $\sigma C$ , natomiast MRV kodują białko  $\sigma 1$  pełniące podobną funkcję do  $\sigma C$ , nie posiadają jednak genu dla białka p10 wywołującego fuzję komórek gospodarza [39, 40].

Zakażenia reowirusami występują najczęściej u kur. U kurecząt są przyczyną zapalenia stawów, zapalenia osierdzia i mięśnia sercowego, syndromu złego wchłaniania, stanów zapalnych jelit, zapalenia wątroby, atrofii bursy Fabrycjusza i grasicy, ostrych i chronicznych chorób układu oddechowego. Są one immunosupresorami. Obecność reowirusów stwierdzono także w narządach wewnętrznych ptaków klinicznie zdrowych [19, 25, 31].

Zakażenia ARV mogą rozprzestrzeniać się na drodze poziomej i pionowej. Transmisja pozioma odbywa się przez kontakt bezpośredni z zakażonymi ptakami oraz pośredni poprzez zakażoną ściółkę, wodę i paszę [43]. Do przeniesienia zakażeń dochodzi również drogą pionową poprzez jaja wylęgowe jeżeli nioski zostały zakażone przed nieśnością lub już w czasie jej trwania. Odsetek jaj zakażonych wynosi od kilku do kilkunastu procent, ale wylężone pisklęta już w czasie klucia mogą zakażać pisklęta zdrowe drogą poziomą. Jest to istotna droga rozprzestrzeniania wirusa, gdyż najbardziej wrażliwe na zakażenie są pisklęta w pierwszych dniach życia. Wrażliwość na zakażenie zmniejsza się wraz z wiekiem ptaków i rozwojem układu immunologicznego, podobnie jest w przypadku wielu innych wirusów [31]. Przebieg zakażenia reowirusami u ptaków zależy od wielu czynników, do których można zaliczyć: wiek ptaków i ich wrażliwość, patogenność szczepu zakażającego, drogę zakażenia, obecność swoistych przeciwciał, występowanie innych zakażeń oraz warunki utrzymania. Nabłonki jelit cienkich oraz bursy Fabrycjusza odgrywają ważną rolę w patogenezie zakażeń. Są one miejscem pierwotnej replikacji reowirusów, po czym

wirus rozprzestrzenia się w ciągu 24–48 godzin do innych tkanek i narządów, zakażenie ma charakter pantropowy [25, 31, 32].

Wirusowe zapalenie stawów i pochewek ścięgowych u kur dotyczy głównie ptaków ras mięsnych w wieku 4–7 tygodni. Okres wylegania choroby wynosi od kilku do kilkunastu dni, zależy on od drogi zakażenia, wieku zainfekowanych ptaków jak również patogenności wirusa. W trakcie rozwoju choroby dochodzi głównie do zapalenia w obrębie stawu skokowego, zapalenia błon maziowych manifestującego się obecnością płynu wysiękowego z domieszką krwi wewnątrz torebki stawowej oraz zgrubienia ścięgien ze zmianami nekrotycznymi. Mikroskopowo widoczne mogą być zmiany w wątrobie, śledzionie, bursie Fabrycjusza i mięśni sercowym. Głównym objawem jest jedno- lub dwustronna kulawizna. Ponadto widoczny jest obrzęk stawów i ścięgien, także poduszek stóp. Niejednokrotnie dochodzi do rozerwania ścięgna lub mięśnia brzuchatego łydki. U ptaków występuje wyraźny brak apetytu, są karłowate i apatyczne. Zachorowalność ptaków w stadzie może sięgać nawet do 100% przy kilkunastoprocentowej śmiertelności [10]. W diagnostyce różnicowej należy brać pod uwagę zapalenia stawów wywołane przez *Mycoplasma synoviae* i *Staphylococcus aureus*. Mogą to być jednocześnie patogeny wklajające zakażenie stawów na tle wirusowym [10, 25].

Kolejną jednostką chorobową związaną z zakażeniem ARV jest zespół złego wchłaniania (zakażne zahamowanie wzrostu u brojlerów). Choroba dotyczy kurcząt brojlerów w 1–3 tygodniach życia. Infekcja układu pokarmowego prowadzi do zmian nieżytowych, uszkodzenia kosmków jelitowych, wypełnienia jelit niestrawionym pokarmem, a w konsekwencji słabsze wchłanianie i zmniejszenie przyrostów masy ciała. Objawami towarzyszącymi są zapalenie mięśnia sercowego, atrofia bursy Fabrycjusza i trzustki, a także zmiany w główce kości udowej. U zakażonych ptaków widoczne są ubytki w upierzeniu, zahamowanie wzrostu, trudności w poruszaniu się, biegunka. We krwi chorych ptaków stwierdza się wysoki poziom karotenoidów i wzrost aktywności fosfatazy alkalicznej [19, 25, 31].

W Polsce od końca lat 90-tych XX w notowano w stadach kurcząt brojlerów liczne przypadki zakażenia ARV o ostrym przebiegu połączone ze znaczną śmiertelnością ptaków. Reowiroza ma najczęściej przebieg gwałtowny u 6–14 dniowych kurcząt. Okres inkubacji choroby wynosi od kilku do kilkunastu dni i jest on krótszy u kurcząt zakażonych pionowo poprzez jaja wylęgowe. W pierwszym stadium choroby, tzw. fazie ostrej obserwuje się apatię, obniżone łaknienie, kulawiznę. Sekcyjnie stwierdza się zmiany w wątrobie i śledzionie, które są powiększone i przekrwione z ogniskami nekrotycznymi. Widoczne są również wybroczyny w sercu, atrofia bursy Fabrycjusza i grasicy oraz przekrwienie płuc i nerek. Faza chroniczna wy-

stępuje u ptaków, które przeżyły fazę ostrą. Notowane wówczas są objawy przypominające wirusowe zapalenie stawów jak: obrzęki stawów, zaburzenia motoryczne oraz zahamowanie wzrostu. Pogrubieniu ulega torebka wątroby i worek osierdziowy. Notuje się także rozległą martwicę nerek, wątroby i śledziony. W grasicy i bursie Fabrycjusza zanikają komórki limfoidalne. W przebiegu reowirozy śmiertelność może wynosić nawet 80% ptaków w stadzie, przy czym ptaki padają głównie w ostrej fazie choroby [25, 31, 32, 34].

ARV mogą powodować u zakażonych ptaków znacznego stopnia immunosupresję komórkową jak i humoralną. Działanie to jest związane z miejscem ich pierwotnej replikacji odbywającej się w bursie Fabrycjusza. Upośledzeniu ulega produkcja limfocytów B, obniżeniu ulega również odsetek subpopulacji limfocytów T we krwi obwodowej ptaków. Takie działanie może być przyczyną obniżenia skuteczności szczepień profilaktycznych stosowanych u ptaków [10, 38].

## 7. Diagnostyka zakażeń

Obecność zakażeń reowirusami można wykazać bezpośrednio poprzez stwierdzenie obecności wirusa w narządach wewnętrznych oraz płynach ustrojowych jak też pośrednio poprzez wykrycie swoistych przeciwciał. Izolację wirusa wykonuje się materiałem uzyskanym od padłych lub chorych ptaków w hodowlach komórkowych bądź w zarodkach kurzych. Obecność wirusa w tkankach zmienionych narządów wewnętrznych można stwierdzić także metodą immunofluorescencji (IF). Coraz powszechniej do wykrywania patogenów zarówno wirusowych jak i bakteryjnych są stosowane techniki biologii molekularnej pozwalające na stwierdzenie obecności materiału genetycznego w tkankach pobranych od ptaków. Zastosowanie znalazł test polimerazowej reakcji amplifikacji (RT-PCR) wykrywający najczęściej sekwencje segmentów S1 i S4. Białko  $\sigma C$  kodowane jest przez cistron segmentu S1 i jest odpowiedzialne za przyłączanie do zakażonej komórki natomiast białko  $\sigma NS$  kodowane przez segment S4 spełnia istotną rolę w pakowaniu RNA oraz procesie replikacji wirusa. Są to najlepiej poznane białka reowirusów pod względem ich sekwencji oraz funkcji [7].

Do wykrywania obecności przeciwciał przeciwko reowirusom w surowicy ptaków powszechnie stosuje się test immunoenzymatyczny ELISA oraz odczyn immunodyszufy w żelu agarowym (AGID) [31].

## 8. Immunoprofilaktyka

Ze względu na powszechne występowanie, łatwość rozprzestrzeniania zakażeń poprzez transmisję pionową i poziomą reowirusów nie jest możliwa pełna ochrona

stad ptaków przed kontaktem z tym patogenem. Jedyną skuteczną formą ograniczania i zapobiegania skutkom zakażeń reowirusami są szczepienia profilaktyczne. Swoista immunoprofilaktyka stad rodzicielskich oraz kurcząt brojlerów stymuluje produkcję swoistych przeciwciał. Wysoki poziom przeciwciał przeciwko reowirusom w stadzie rodzicielskim przekazywany jest z matki na potomstwo. Na rynku dostępne są szczepionki żywe oparte na szczepach atentowanych jak i inaktywowane jedno lub wiele ważne. Program szczepień profilaktycznych uzależniony jest od sytuacji epidemiologicznej na danym terenie, obejmuje on szczepienie szczepionką żywą a następnie szczepionką inaktywowaną [18, 31].

## 9. Podsumowanie

Reowirusy po raz pierwszy zostały wyizolowane w 1951 roku. Są one bezotoczkowymi wirusami DNA charakteryzujące się sferycznym kapsydem o średnicy ok. 850 Å. Kapsyd jest zbudowany z dwóch koncentrycznych warstw co zapewnia znaczną odporność wirusa na czynniki fizykochemiczne. Genom występuje w postaci 10–12 segmentów dsRNA. Segmenty podzielono na 3 klasy: S, M oraz L w zależności od ich wielkości. Segmenty te zawierają po jednej otwartej ramce odczytu oprócz segmentu S1, który zawiera ich 3 lub 2 w zależności od rodzaju reowirusów. Genom koduje białka strukturalne tworzące kapsyd ( $\lambda$ A,  $\lambda$ B,  $\lambda$ C,  $\mu$ A,  $\mu$ B,  $\sigma$ A,  $\sigma$ B,  $\sigma$ C), które powstają bezpośrednio w czasie translacji oraz białka niestrukturalne: białka  $\mu$ NS,  $\sigma$ NS, p10 i p17.

Wykazano powinowactwo reowirusów do komórek nowotworowych. Sądzi się, że możliwe jest zastosowanie reowirusów w terapii nowotworowej medulloblastomy (MB), nowotworu trzustki, jelita grubego, jajnika i piersi. Niezbędne są jednak dalsze badania nad mechanizmami właściwościami onkolitycznymi tych wirusów.

Cztery rodzaje reowirusów – *Orthoreovirus*, *Coltivirus*, *Rotavirus* oraz *Orbivirus* powodują zakażenia u ludzi, z których większość przebiega bezobjawowo. Ludzkie rotawirusy powodują najczęściej zapalenia żołądka i jelit u dzieci od 6 do 24 miesięcy przez infekcję górnych odcinków przewodu pokarmowego.

Świnie zakażane są przez reowirusy typu 1 i 3 oraz rotawirusy i orbivirusy. Infekcja przebiega głównie drogą pokarmową i wziewną. Zakażenia przebiegają głównie bezobjawowo lub łagodnie z krótkotrwałą gorączką i biegunką.

Orthoreowirusy powodują zakażenia u ptaków. Najczęściej zakażenia reowirusami występują u kur objawiając się zapaleniem stawów, osierdza, mięśnia sercowego, jelit i wątroby. Powodują atrofię bursy Fabrycjusza i grasicy. Wywołują syndrom złego wchła-

niania, reowirozę kurcząt i wirusowe zapalenie stawów i pochewek ścięgowych.

Diagnostyka zakażeń reowirusami oparta jest zazwyczaj na izolacji wirusa, stwierdzeniu obecności wirusa metodami immunofluorescencji, stwierdzeniu obecności przeciwciał testem immunoenzymatycznym ELISA. Ponadto stosuje się reakcje łańcuchowej amplifikacji (RT-PCR).

Jedynym skutecznym sposobem walki z reowirusami jest immunoprofilaktyka oraz wdrożenie i przestrzeganie zasad bioasekuracji, dezynfekcja sprzętu i pomieszczeń.

## Piśmiennictwo

1. Becker M.M., Peters T.R., Dermody T.S.: Reovirus  $\sigma$ NS and  $\mu$ NS Proteins Form Cytoplasmic Inclusion Structures in the Absence of Viral Infection. *J. Virol.* **77**, 5948–5963 (2003)
2. Becker Y., Hadar J.: Molecular Virology: Molecular and Medical Aspects of Disease-causing Viruses in Man and Animals, Springer-Verlag, Heidelberg, 1983, s. 139–144
3. Benavente J., Martinez-Costas J.: Avian reovirus: Structure and biology. *Virus Res.* **123**, 105–119 (2007)
4. Błażejska P., Goździcka-Józefiak A.: Wirusowa terapia przeciwnowotworowa. *Współ. Onkol.* **9**, 279–283 (2005)
5. Bodelon G., Labrada L., Martinez-Costas J., Benavente J.: The avian reovirus genome segment S1 is a functionally tricistronic gene that expresses one structural and two non-structural proteins in infected cells. *Virol.* **290**, 181–191 (2001)
6. Brentano L., Noah D.L., Brown E. G., Sherry B.: The Reovirus Protein  $\mu$ 2, Encoded by the M1 Gene, Is an RNA-Binding Protein. *J. Virol.* **72**, 1998 8354–8357 (1998)
7. Bruhn S., Bruckner L., Ottiger H. P. Application of RT-PCR for the detection of avian reovirus contamination in avian viral vaccines. *J. Virol. Methods*, **123**, 179–186 (2005)
8. Chua K.B., Wang L.-F. i wsp.: A previously unknown reovirus of bat origin is associated with an acute respiratory disease in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 11424–11429 (2007)
9. Costas C., Martı́nez-Costas J., Bodelon G., Benavente J.: The second open reading frame of the avian reovirus S1 gene encodes a transcriptiondependent and CRM1-independent nucleocytoplasmic shuttling protein. *J. Virol.* **79**, 2141–2150 (2005)
10. Czekaj H., Samorek-Salamonowicz E., Kozdruń W.: Charakterystyka szczepu reowirusa wyizolowanego z przypadku reowirozy brojlerów. *Med. Wet.* **58**, (2002)
11. Dawe S., Boutilier J., Duncan R.: Identification and Characterization of a Baboon Reovirus-Specific Nonstructural Protein Encoded by the Bicistronic S4 Genome Segment. *Virol.* **304**, 44–52 (2002)
12. Day M.J., Pantin-Jackwood M.J., Spackman E.: Sequence and phylogenetic analysis of the S1 genome segment of turkey-origin reoviruses. *Virus Genes.* **35**, 235–242 (2007)
13. Dryden K.A., Wang G., Yeager M., Nibert M.L., Coombs M.K., Furlong D.B., Fields B.N., Baker T.S.: Early Steps in Reovirus infection are associated with dramatic changes in supramolecular structure and protein conformation: analysis of virions and subviral particles by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *J. Cell. Biol.* **122**, 1023–1041 (1993)

14. Duncan R., Corcoran J., Shou J., Stoltz D.: Reptilian reovirus: a new fusogenic *Orthoreovirus* species. *Viol.* **319**, 131–140 (2004)
15. Etoh T., Himeno Y., Matsumoto T., Aramaki M., Kawano K., Nishizono A., Kitano S.: Oncolytic viral therapy for human pancreatic cancer cells by reovirus. *Clin. Cancer Res.* **9**, 1218–1223 (2003)
16. Forrest J.C., Dermody T.S.: Reovirus Receptors and Pathogenesis. *J. Virol.* **77**, 9109–9115 (2003)
17. Gonzalez-Lopez C., Martínez-Costas J., Esteban M., Benavente J.: 2003. Evidence that avian reovirus  $\sigma$ A protein is an inhibitor of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J. Gen. Virol.* **84**, 1629–1639 (2003)
18. Guo Z.Y., Giambone J., Dormitorio A.T.V., Wu H.: Influence of a reovirus-antibody complex vaccine on efficacy of Marek's disease vaccine administered in ovo. *Avian Dis.* **47**, 1362–1367 (2003)
19. Guy J.S.: Virus Infections of the Gastrointestinal Tract of Poultry. *Poultry Sci.* **77**, 1166–1175 (1998)
20. Hermo-Parrado X.L., Guardado-Calvo P., Llamas-Saiz A.L., Fox G., Vazquez-Iglesias C., Martínez-Costas J., Benavente J., Raaij M.J.: Crystallization of the avian reovirus double-stranded RNA-binding and core protein sigmaA. *Acta Cryst.* **F63**, 426–429 (2007)
21. Hsu C.J., Wang C.Y., Lee L.H., Shih W.L., Chang C.I., Cheng H.L., Chulu J.L., Ji W.T., Liu H.J.: Development and characterization of monoclonal antibodies against avian reovirus  $\sigma$ C protein and their application in detection of avian reovirus isolates. *Avian Pathol.* **35**, 320–326 (2006)
22. Hsu H.W., Su H.Y., Huang P.H. Sequence and phylogenetic Analysis of P10- and P17-Encoding Genes of Avian Reovirus. *Avian Dis.* **49**, 36–42 (2005)
23. Kapikian A.Z.: Viral Infections of the Gastrointestinal Tract. *Informa Health Care*, 1994, s. 90–250
24. Kim M., Chung Y.H., Johnston R.N.: Reovirus and tumor oncolysis. *J. Microbiol.* **45**, 187–92 (2007)
25. Kozdrun W., Samorek-Salamonowicz E., Czekaj H.: Rola reowirusów w aviopatologii. *Medycyna Wet.* **62**, 974–976 (2006)
26. Liu H.J., Chen J.H., Liao M.H., Lin M.Y., Chang G.N.: Identification of the  $\sigma$ C encoded gene of avian reovirus by nested PCR and restriction endonuclease analysis. *J. Virol. Meth.* **81**, 83–90 (1999)
27. Liu H.J., Lee L.H., Hsu H.W., Kuo L.C., Liao M.H.: Molecular evolution of avian reovirus: evidence for genetic diversity and reassortment of the S-class genome segments and multiple cocirculating lineages. *Viol.* **314**, 336–349 (2003)
28. Liu H.-J., Lin P.-Y., Lee J.-W., Hsu H.-Y., Shih W.-L.: Retardation of cell growth by avian reovirus p17 through the activation of p53 pathway. *Bioch. Bioph. Res. Comm.* **336**, 709–715 (2005)
29. Maginnis M.S., Forrest C., Kopecky-Bromberg S.A., Dickson K., Santoro S.A., Zutter M.M., Nemerow G.R., Bergelson J.M., Dermody T.S.: Beta1 Integrin Mediates Internalization of Mammalian Reovirus. *J. Virol.* **80**, 2760–2770 (2006)
30. Martínez-Costas J., Grande A., Varela R., García-Martínez C., J. Benzvente.: Protein architecture of avian reovirus S1133 and identification of the cell attachment protein. *J. Virol.* **71**, 59–64 (1997)
31. Mazurkiewicz M.: Choroby drobiu. Wrocław, 2005, s. 402–407
32. McNulty M.S.: Reovirus. *Virus infections of birds*. Ed. McFerreran, McNulty. Elsevier Sci. Publ. B.V. 1993 s. 181–195
33. Miller C.L., Broering T.J., Parker J.S.L., Arnold M.M., Nibert M.L.: Reovirus  $\sigma$ NS Protein Localizes to Inclusions through an Association Requiring the  $\sigma$ NS Amino Terminus. *J. Virol.* **77**, 4566–4576 (2003)
34. Minta Z., Bugajak P., Daniel A., Mazurkiewicz M., Wieliczko A., Gaweł A., Bartczak R., Kozaczyński W., Wierciński J.: Przypadki reowirusy u kurcząt brojlerów w Polsce. *Mat. Konf. Nauk. „Rola reowirusów w patologii ptaków”*, Wrocław, 1998, s. 35–36
35. Norman K.L., Hirasawa K., An-Dao Yang, Shields M.A., Lee. Reovirus P.W.K.: The Ras\_RalGEF\_p38 pathway dictates host cell permissiveness to reovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **27**; 101(30): 11099–11104 (2004)
36. Patton J.T. *Segmented Double-stranded RNA Viruses: Structure and Molecular Biology*. Caister Academic Press, Norfolk, 2008, s. 3–25
37. Robertson M.D., Wilcox G.E.: Avian reovirus. *Vet. Bull.* **56**, 155–174 (1986)
38. Samorek-Salamonowicz E., Czekaj H., Kozdrun W.: Reowirusy jako czynniki wklajające inne zakażenia wirusowe u ptaków. *Konf. Nauk. „Rola reowirusów w patologii ptaków”*, Wrocław, 1998, s. 17–22
39. Shmulevitz M., Salsman J., Duncan R.: Palmytoylation, membrane-proximal basic residues, and transmembrane glycine residues in the reovirus p10 protein are essential for syncytium formation. *J. Virol.* **77**, 9769–9779 (2003)
40. Shmulevitz M., Yameen Z., Dawe S., Shou J., O'Hara D., Holmes I., Duncan R.: Sequential Partially Overlapping Gene Arrangement in the Tricistronic S1 Genome Segments of Avian Reovirus and Nelson Bay Reovirus: Implications for Translation Initiation *J. Virol.* **76**, 609–618 (2002)
41. Spandidos D.A., Graham A.F.: Physical and chemical characterization of an avian reovirus. *J. Virol.* **19**, 968–976 (1976)
42. Straw B.E., Zimmerman J.J., D'Allaire S., Taylor D.J.: *Diseases of Swine*. Blackwell Publishing, 2006, s. 447–448
43. Tamehiro C.Y., Fernandez-Alfieri A., Medici K.C., Alfieri A.A.: Segmented Double-stranded genomic RNA viruses in fecal samples from broiler chicken. *Braz. J. Microbiol.* **34**, 349–353 (2003)
44. Touris-Otero F., Martínez-Costas J., Vakharia V.N., Benavente J.: Characterization of the nucleic acid-binding activity of the avian reovirus non-structural protein  $\sigma$ NS. *J. Gen. Virol.* **86**, 1159–1169 (2005)
45. Wen L.S., Hsiao W.H., Ming H.L., Long H.L., Hung J.L.: Avian reovirus  $\sigma$ C protein induces apoptosis in cultured cells. *Viol.* **321**, 65–74 (2004)
46. Yin H.S., Lee L.H.: Identification and characterization of RNA-binding activities of avian reovirus non-structural protein  $\sigma$ NS. *J. Gen. Virol.* **79**, 1411–1413 (1998)
47. Zhang L., Chandran K., Nibert M.L., Harrison S.C.: Reovirus  $\mu$ 1 Structural Rearrangements That Mediate Membrane Penetration. *J. Virol.* **80**, 12367–12376 (2006)
48. Zhang X., Tang J., Walker S.B.: Structure of Avian Orthoreovirus Virion by Electron Cryomicroscopy and Image Reconstruction. *Viol.* **343**, 25–35 (2005)
49. Zhang Y., Guo D., Geng H., Liu M., Hu Q., Wang J., Tong G., Kong X., Liu N., Liu C.: Characterization of M-class genome segments of muscovy duck reovirus S14. *Virus Res.* **125**, 42–53 (2007)
50. Zhang Y., Liu M., Qu L., Xiang W., Guo D., Yuan X., Ge M., Zhang C.: Sequence and phylogenetic analysis of the S-class genome segments of a duck orthoreovirus. *Acta Virol.* **51**, 239–247 (2007)



---

# NAJNOWSZA HISTORIA POLSKIEJ MIKROBIOLOGII

---



**Professor Ludwik Hirsfeld**  
(5.08.1884 – 7.03.1954)

Ludwik Hirsfeld urodził się w Warszawie w spolonizowanej rodzinie żydowskiej, bardzo silnie związanej z tradycjami polskiej walki podziemnej. W wieku 18 lat wyjechał do Würzburga studiować medycynę. W trakcie tych studiów zdecydował się poświęcić pracy naukowej. W wieku 19 lat przeniósł się do Berlina, gdzie przez jeden semestr studiował filozofię. Oprócz medycyny interesował się bakteriologią i serologią. Mając 22 lata rozpoczął przygotowanie pracy doktorskiej, którą ukończył w 1907 roku z oceną *eximia cum Laude*. Po doktoracie zatrudnił się jako asystent w Zakładzie Badań Raka w Heidelbergu. Po pewnym czasie wraz ze współpracownikami rozpoczął pracę z zakresu serologii i genetyki grup krwi u ludzi i zwierząt.

Po wyjeździe do Zurichu Hirsfeld habilitował się na podstawie prac o związku zjawisk odpornościowych i krzepliwości krwi. W trakcie habilitacji wygłosił publiczny odczyt zatytułowany „Zagadnienia dziedziczności w świetle nauki o odporności”. Jako młody docent prowadził wykłady o chorobach zakaźnych dla studentów różnych wydziałów oraz kurs serologii dla studentów medycyny.

Na wiadomość o wybuchu epidemii duru plamistego w czasie I wojny światowej, Hirsfeld jako ochotnik wyjeżdża w 1915 roku do Serbii. Organizuje tam pracownię bakteriologiczną, jednocześnie kieruje akcjami zwalczania epidemii i prowadzi wykłady o chorobach zakaźnych. Wkrótce do Hirsfelda dołączyła jego żona Hanna. „Poznawaliśmy tam choroby, których nie zna Europa Środkowa. Widziałem tam po raz pierwszy za-

razki duru powrotnego, zimnicy podzwrotnikowej nieznane nam objawy kliniczne” napisze później Hirsfeld w „Historii jednego życia”. Wraz z cofającą się armią serbską Hirsfeldowie ewakuowani zostali do Albanii, następnie trafili na Korfu, do Włoch, Szwajcarii i do Grecji, gdzie nadal pracowali na rzecz Serbii. W tym czasie Hirsfeld zajmował się zwalczaniem epidemii czerwonki oraz działał na rzecz stosowania transfuzji krwi. Za swoją działalność wyróżniony został przez króla serbskiego honorowym obywatelstwem.

Po latach wojennej służby Hirsfeldowie w 1920 roku powrócili do Polski. L. Hirsfeld włączył się w organizowanie służby epidemiologicznej oraz zwalczanie epidemii chorób zakaźnych na terytorium Polski i w pracę Komisji Przeciwepidemicznej Ligi Narodów. W roku 1918 powstał w Warszawie Zakład Higieny, którego pierwszym dyrektorem został dr Ludwik Raichman, a Hirsfeld został dyrektorem Działu Bakteriologii i Medycyny Doświadczalnej, kierownikiem Oddziału Kontroli Surowic i zastępcą dyrektora Raichmana (był nim do 1933 roku).

Równocześnie z działalnością organizacyjną i naukową ówczesny docent Hirsfeld prowadził wykłady z nauki o odporności na Wolnej Wszechnicy Polskiej (od 1924 roku), w roku 1926 po uzyskaniu docentury (ponownej habilitacji) na Wydziale Lekarskim UW prowadził wykłady z serologii dla lekarzy. W tym samym roku na zaproszenie Wydziału Farmaceutycznego UW L. Hirsfeld rozpoczął prowadzenie zleconych wykładów z bakteriologii dla studentów farmacji. Program tych zajęć i ilość godzin całkowicie zależała od wykładowcy, który mógł jak pisze „wykładać całokształt bakteriologii”. Zajęcia te Hirsfeld prowadził do 1930 roku.

W okresie pracy Hirsfelda w PZH prowadzono badania bakteriologiczne potrzebne w akcjach zwalczania epidemii, ulepszano metody serodiagnostyki, przygotowywano odczynniki dla pracowni diagnostycznych i kontrolowano przebieg akcji szczepień. Równoległe do prac, jak to określał Hirsfeld „użytkowych” kontynuowane były badania nad serologią i genetyką grup krwi. W 1928 roku ukazała się monografia Hirsfelda „Serologia konstytucjonalna”.

Ogromną ilość szczegółowych informacji o swojej i swoich współpracowników działalności naukowej, osiągnięciach, uczestnictwie w pracy międzynarodowych organizacji oraz o wydarzeniach związanych z udziałem w zjazdach naukowych w bardzo skondensowanej formie przedstawił Hirsfeld w kilku krótkich rozdziałach „Historii jednego życia”.

W latach okupacji niemieckiej Hirsfeld został pozbawiony możliwości pracy w zarządzanym przez

Niemców Państwowym Zakładzie Higieny, a w 1941 roku został wraz z rodziną przeniesiony do Getta. Tu wraz ze współpracownikami działał przy zwalczaniu epidemii duru plamistego wykorzystując szczepionkę Wejgla, zorganizował Radę Zdrowia. W ramach legalnego Kursu Przysposobienia Sanitarnego do walki z epidemiami prowadził tajne nauczanie akademickie, w tym dla pierwszych dwóch lat studiów farmaceutycznych. W 1942 roku Hirszfelowie opuszczają Getto i ukrywają się na terenie okupowanej Polski w Kamiennej, Miłośnie, Lipce i Wesołej. Prawdopodobnie w tym czasie powstaje tekst ważnej książki Hirszfelda „Immunologia ogólne”.

Po tragicznym okresie wojny i okupacji Profesor L. Hirszfeld jest jednym z organizatorów Uniwersytetu w Lublinie, którego przez pewien czas jest prorektorem. Jak sam pisze „do Warszawy nie mogłem i nie chciałem wracać”. Mimo tego objął funkcje przewodniczącego Rady Naukowej PZH. Dyrektorem PZH został wtedy jeden z kolegów i współpracowników Hirszfelda prof. F. Przesmycki, późniejszy pierwszy kierownik Katedry i Zakładu Mikrobiologii i Higieny Wydziału Farmaceutycznego AM w Warszawie.

W sierpniu 1945 roku Ludwik Hirszfeld przyjechał do Wrocławia gdzie organizował życie naukowe, m.in. był jednym z założycieli Wydziału Lekarskiego, którego został dziekanem. W 1954 roku utworzony został we Wrocławiu Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN noszący obecnie imię Ludwika Hirszfelda.

Profesor Ludwik Hirszfeld zmarł 7 marce 1954 roku we Wrocławiu i tam, na Cmentarzu św. Wawrzyńca został pochowany.

### Piśmiennictwo

1. Górski A.: Nec Soli Cedit (artykuł poświęcony pamięci prof. Ludwika Hirszfelda). <http://www.iitd.pan.wroc.pl>
2. Hirszfeld L.: Historia jednego życia, Czytelnik – Warszawa 2000.
3. Pachecka J., Kowalski J. Tomaszewski P. (red.): Dzieje Warszawskiego Wydziału Farmaceutycznego 1926–2001, Warszawa 2001

*Bohdan J. Starościak*  
*Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej*  
*Warszawski Uniwersytet Medyczny*

## W 55 ROCZNICĘ ŚMIERCI PROFESORA LUDWIKA HIRSZFELDA

W bieżącym roku minęła 55 rocznica śmierci wybitnego polskiego naukowca, lekarza, immunologa i mikrobiologa, prof. Ludwika Hirszfelda. Redakcja *Postępów Mikrobiologii* postanowiła z tej okazji opublikować wykład L. Hirszfelda zatytułowany „Walka świata niewidzialnego z pozawidzialnym”. Jest to tekst odczytu Profesora wygłoszonego na I Dorocznym Zebraniu Publicznym Wrocławskiego Towarzystwa Naukowego w dniu 7.03.1948 roku. Ukazał się on drukiem w Sprawozdaniach Wrocławskiego Towarzystwa Naukowego (zesz. 3, 3–18, 1948) oraz jako osobna broszura.

L. Hirszfelda w swoim popularyzatorskim odczycie przedstawia podstawowe informacje o groźnych wirusach chorobotwórczych oraz poświęca dużo miejsca bakteriofagom – „virusom bakterii”. Pisze o wykorzystaniu bakteriofagów w medycynie np.: o fagotypowaniu *Salmonella* oraz o możliwościach wykorzystania bakteriofagów w terapii fagowej. Jakże aktualne jest w tekście z 1948 stwierdzenie: „Odkrycia czystej nauki mogą być obrócone dla dobra ludzkości. Z konfliktu między światem niewidzialnym a poza widzialnym możemy ukuć skuteczną broń dla ochrony zdrowia i życia człowieka”.

W tym miejscu należy zwrócić uwagę na niedocenianą na ogół rolę L. Hirszfelda we wprowadzeniu w Polsce badań nad bakteriofagami i terapią fagową,

które trwają do dnia dzisiejszego. Prace te były prowadzone w Państwowym Zakładzie Higieny w czasie, gdy Działem Bakteriologii i Medycyny Doświadczalnej i całym pionem naukowym instytutu kierował Hirszfeld. Profesor wspomina: „jedna z asystentek „ogłosiła wartościowe prace o bakteriofagach, druga zyskała sobie imię za granicą dzięki pięknym pracom o bakteriofagach”. Także z ośrodka Profesora Hirszfelda pochodziły gotowe preparaty fagowe użyte w Klinice Chirurgii UJ w Krakowie w latach 1926–1927 w pierwszym w Polsce udokumentowanym opisie terapii fagowej. Bakteriofagi „zostały sprowadzone” przez Profesora Hirszfelda do Wrocławia po II wojnie światowej – badania nad nimi i terapią fagową kontynuowane są tam do dzisiaj. W tym czasie Hirszfeld był jednym z głównych organizatorów życia naukowego oraz nauczania medycyny we Wrocławiu.

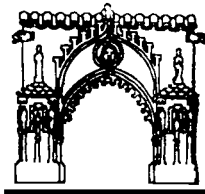
*Redakcja Postępów Mikrobiologii*

Przypominając postać Profesora L. Hirszfelda Oddział Warszawski Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej zorganizował w dniu 17.03.2009 konferencję „Profesor Ludwik Hirszfeld – wielki uczonek, lekarz humanista i patriota – w 55 rocznicę śmierci”.

LUDWIK HIRSZFELD

WALKA  
ŚWIATA NIEWIDZIALNEGO  
Z POZAWIDZIALNYM

(ODCZYT WYGŁOSZONY NA I DOROCZNYM  
ZEBRANIU PUBLICZNYM WROCŁAWSKIEGO TOWARZYSTWA  
NAUKOWEGO DNIA 7 MARCA 1948 ROKU)



W R O C Ł A W 1 9 4 8  
NAKŁADEM WROCŁAWSKIEGO TOWARZYSTWA NAUKOWEGO  

---

SKŁAD GŁÓWNY W PAŃSTWOWYM INSTYTUCIE WYDAWNICZYM

Odbitka ze Sprawozdań Wrocławskiego Towarzystwa Naukowego  
3, 1948, s. 3 - 18.

DRUKARNIA UNIwersYTETU I POLITECHNIKI  
WROCLAW, UL. GEN. K. SWIERCZEWSKIEGO 19  
Zam. Nr. 372 — F. 39029

## WALKA ŚWIATA NIEWIDZIALNEGO Z POZAWIDZIALNYM

---

Na wstępie muszę wytłumaczyć te pozornie tak tajemnicze określenia: świata niewidzialnego i pozawidzialnego. Gdy w XVII stuleciu Leeuwenhoek zbudował pierwszy prymitywny mikroskop, otworzył on okno na nowy świat, świat *niewidzialny gołym okiem*, widzialny jedynie za pomocą mikroskopu. W istocie mikroskopu leżało, że rozmiary poniżej 0,2 mikrona nie mogły być dostrzegane przy pomocy promieni, na które jest wrażliwe oko ludzkie. A zatem, poza światem niewidzialnym gołym okiem, lecz widzialnym za pomocą mikroskopu, krył się jeszcze tajemniczy *świat pozawidzialny*. Metody stworzone w ciągu ostatnich lat dwudziestu pozwoliły na uchylenie rąbka tej tajemnicy i otworzyły okno na świat pozawidzialny, niedostępny bezpośrednio dla oka ludzkiego.

Twory zamieszkujące świat niewidzialny gołym okiem, ale widzialny przy pomocy mikroskopu, grają olbrzymią rolę w przemianie materii świata. One to rozszczepiają istoty żywe na ich składniki nieżywe, one potrafią syntetyzować z prostszych składników złożone drobiny tworów żywych. W świecie niewidzialnym znajdują się bakterie, które wywołują większość chorób zakaźnych. Walka ze światem tych niewidzialnych wrogów jest podstawą naszej walki z wieloma chorobami zakaźnymi.

W czasie jednak, gdy zdawać by się mogło, że uda się rozwiązać zagadkę wszystkich chorób zakaźnych, zauważono, że liczne choroby nie miały odpowiednika przyczynowego w określonych drobnoustrojach. Czy 0,2 mikrona, stanowiące granicę rozszczepialności mikroskopu, są granicą życia? Czy w świecie, niedostępnym dla spostrzegania przez oko ludzkie, znajdują się również zarazki chorobotwórcze?

Pytania te zadali sobie w końcu XIX stulecia Iwanowski, Beijerinck (w 1897 r.), wreszcie Loeffler i Frosch (w 1898 r.). Za pomocą sączków o porach tak wąskich, że zatrzymują bakterie, oddzielili oni wszystkie twory większe od 0,2 mikrona i badali czy przesącz, który przeszedł przez pory, ma własności chorobotwórcze. Okazało się wówczas, że i przesącz zawiera czynniki zdolne do wywoływania chorób, zdolne do rozmnażania się w zakażonym ustroju zwierzęcym lub roślinnym, że — jednym słowem — owe czynniki mają znamiona życia. Twory te nazwano *zarazkami przesączalnymi* lub *virusami*, czyli jadami. Choroby, które dziesiątkowały ludzkość jak ospa, które były tak groźne jak wścieklizna lub paraliż dziecięcy, schorzenia roślin takie, jak choroba mozaikowa tytoniu i wiele innych, są wywoływane właśnie przez zarazki przesączalne. Zarazki te są na ogół dostosowane do komórki zwierzęcej lub roślinnej tak dalece, że poza nią nie potrafią żyć; są one przeto pasożytami zupełnymi.

Tak więc rozróżniamy makroorganizmy — widzialne gołym okiem, mikroorganizmy — niewidzialne, lecz uchwytnie za pomocą zwykłego mikroskopu, i zarazki przesączalne czyli wirusy — stanowiące świat pozawidzialny.

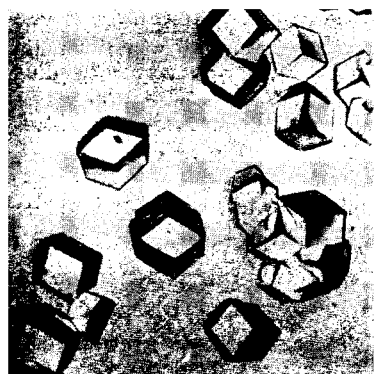
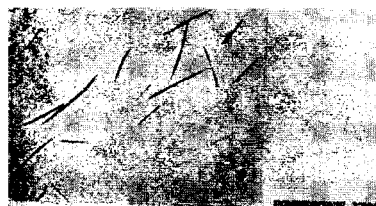
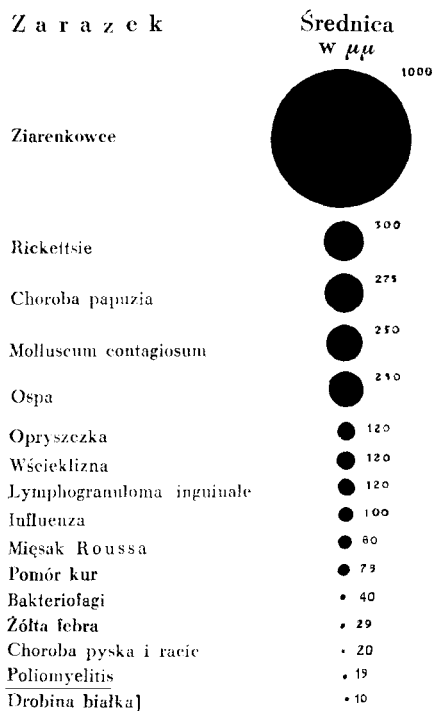
Czym są wirusy? Czy mają kształt, czy też — jak sądzili niektórzy uczeni — posiadają jedynie cechy żywego płynu?

W jaki sposób stwierdzić wielkość zarazków przesączalnych, których nie można widzieć przy pomocy mikroskopu?

Zadanie to zostało rozstrzygnięte w latach trzydziestych naszego stulecia. Zastosowano wirówki o 100 000 obrotów na minutę. Pod wpływem potężnych sił odśrodkowych udało się odwirować zarazki przesączalne. Im mniejszy jest zarazek, tym większa jest jego powierzchnia w stosunku do jego objętości, tym trudniej daje się on odwirować. Mierząc szybkość, z jaką zarazek daje się odwirować, można było określić jego wielkość. Inna metoda polegała na sączeniu przez filtry o porach różnej wielkości.

Obie te metody uzupełniały się wzajemnie i umożliwiły stwierdzenie wymiarów zarazków pozawidzialnych. Mimo, że niedostępne dla wzroku, zarazki przesączalne stały się wymierne. W świecie pozawidzialnym stwierdzono wszelkie przejścia od wirusów, nie o wiele mniejszych od bakteryj, jakie w postaci zabarwionej dostrzegamy nawet przez zwykły mikroskop, aż do postaci tak drobnych, że nie różnią się wielkością od drobinny hemoglobiny lub fibroglobuliny.

Świat pozawidzialny jest zaludniony przez twory o najróżnorodniejszych wymiarach (p. rys. 1).



Rys. 1. Wielkość zarazków przesączalnych w milimikronach (wg Topley'a). Niektóre zarazki, jak np. virus choroby papuziej lub ospy, znajdują się na granicy widzialności optycznej, inne zaś, m. in. bakteriofagi, są niewidzialne nawet przez mikroskop optyczny i leżą już na pograniczu wielkości drobin białka.

Rys. 2. Kryształy białek wirusowych (wg Stanley'a).

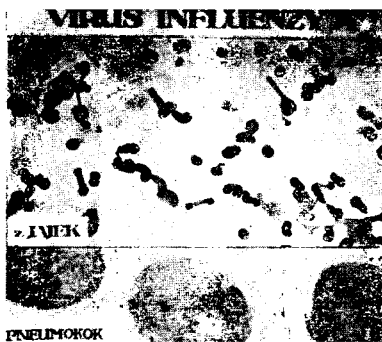
U góry zarazek choroby mozaikowej tytoniu; u dołu zarazek choroby „Bushy stunt”.

Zdjęcia w mikroskopie elektronowym.

Dyskusja, dotycząca początków życia, zapoczątkowana przez Spalanzani'ego, rozstrzygnięta pozornie przez Pasteura, odżyła na nowo już nie na pograniczu świata niewidzialnego o wymiarach powyżej 0,2 mikrona, lecz przeniosła się na inne pogranicze, na to, w którym twory pozawidzialne zbliżają się swoimi wymiarami do drobin materii martwej. Stanley'owi udało się otrzymać kryształy wysokodrobinowego białka, mającego wszelkie cechy zarazka przesączalnego (p. rys. 2).

Nie jest jednak zadaniem tego odczytu omawianie zagadnienia zaczątków życia z punktu widzenia danych o virusach.

Dalszy postęp umożliwiło odkrycie mikroskopu elektrono-



Rys. 3. Virus influenzy (według Taylora i współpr.) w porównaniu z bakterią zapalenia płuc (według Mudda i współpr.).

Zdjęcia w mikroskopie elektrono-

wego przez Ruskę (w 1938 r.). Jeśli odkrywca mikroskopu — Leewenhoek — otworzył nam okno na świat niewidzialny, to Ruska uczynił to dla świata pozawidzialnego. Zasada mikroskopu elektronnego jest prosta: zamiast odchyłania promieni przez soczewkę szklaną, potężne elektromagnesy odchylają strumień elektronów. Powiększenie może dochodzić nie do 2000 razy, jak w mikroskopie zwykłym, lecz do kilkuset tysięcy razy.

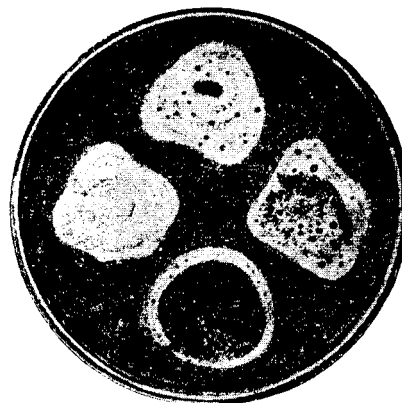
Mikroskop elektronnny uwiadczenia nie tylko różnice wielkości, lecz i kształty virusów (p. rys. 3). Mogą one być najróżniejsze: okrągłe,

kanciaste, podługne — jednym słowem, bogactwo form natury, które nas tak uderza w świecie widzialnym, istnieje również w świecie pozawidzialnym.

Przejdźmy obecnie do konfliktu między bakteriami a tworami przesączalnymi. Pierwsze stwierdzenie tego konfliktu nastąpiło w czasie Wielkiej Wojny. Badacz angielski Twort zauważył (w 1917 r.) małe nadżerki na hodowlach bakteryjnych. Nadżerki te dały się przenieść na hodowlę świeżą, co wskazywało z wielkim prawdopodobieństwem, że wywołały je twory żywe. Największa jednak zasługa w wyświetleniu tego zjawiska przypada badaczowi francuskiemu d'Hérelle'owi. Jego pierwsze doświadczenie (w 1918 r.) było proste: w przesączach kału osobników chorych na czerwonkę stwierdził on czynnik, który rozpuszczał bakterie czerwone, albo raczej nie dopuszczał do wzrostu ich hodowli. Posiane hodowle płynne pozostawały przezroczyste. Hodowle agarowe wykazywały puste miejsca, nazwane przez autora *tâches vierges* (plamami dziewiczymi), co Szymanowski spolszczył, nazywając je *lysinkami* (p. rys. 4). Czynniki ten, rozpuszczający bakterie, był od samego początku ujmowany przez odkrywcę jako zawierający żywe twory, nazwane przez niego *bakteriofagami*. Zauważono, że bakteriofagi rozmnażają się w czasie rozpuszczania



bakterii. Bakterie martwe lub stare nie zostają rozpuszczone. W początkowym okresie rozwoju, gdy bakterie znajdują się w tzw. logarytmicznej fazie wzrostu, wiążą one bakteriofagi i pod ich wpływem powstaje jak gdyby wewnątrzkomórkowa eksplozja: bakterie rozpadają się na cząsteczki tak drobne, że przechodzą one przez sączki. W przesączu rozpuszczonych bakterii stwierdzamy zatem: ułamki bakterii i ów rozpuszczający je tajemniczy czynnik, wywołujący chorobę i śmierć młodych postaci bakteryjnych: bakteriofag.



Rys. 4. Łysinki w koloniach bakterii (według d'Hérelle'a).

Cóż to są bakteriofagi? D'Hérelle stworzył wspaniały obraz walki między bakteriofagiem a bakterią, walki, której widowiskiem jest nawiedzony przez bakterie makroorganizm. Bakteriofagi działały w tak nieprawdopodobnie małej ilości, niszczyły bakterie tak doszczętnie, siła ich tak przewyższała możliwości odpornościowe makroorganizmu, że twory te według d'Hérelle'a musiały grać rolę w rozgrywce między światem widzialnym a niewidzialnym. I rzeczywiście, spostrzeżenia d'Hérelle'a wskazywały na to, że przebieg choroby zależy od współobecności bakteriofaga, że on decyduje o tym, czy woda zakażona zarazkiem cholery wywoła groźną epidemię, czy samowygasające schorzenie. Wizja walki między żywymi tworam niewidzialnymi a pozawidzialnymi jest zasługą d'Hérelle'a. Ale właśnie potęga tej wizji i jej piękno budziły zastrzeżenia. Na czym opierał się d'Hérelle twierdząc, że bakteriofag jest tworem żywym?

W latach dwudziestych wysuwano dwa dowody. Pierwszy — to sam fakt wzrostu w środowisku niejednorodnym. Wzrost w środowisku jednorodnym nie dowodzi życia — kryształki przecież rosną w przesyconym daną substancją płynie, wzrost natomiast w bulionie zawierającym młode bakterie był dla d'Hérelle'a dowodem istnienia życia. Drugiego dowodu dopatrywał się d'Hérelle w zjawisku dostosowywania się bakterio-

fagów do bakterii. Bakteriofagi, hodowane na pewnych gatunkach bakteryjnych, zmieniały swoje własności i przystosowywały się do nich tak dalece, że w końcu rozpuszczały tylko pewne gatunki drobnoustrojów. Zjawisko to było tak uderzające, że d'Hérelle wyobrażał sobie przez pewien czas istnienie jakiejś jednolitej postaci bakteriofaga, którego swoistość w stosunku do różnych gatunków bakteryjnych tłumaczy się jego wtórną adaptacją.

Nauka zajęła się przede wszystkim pierwszym zagadnieniem: czy można wytłumaczyć wzrost bakteriofaga inaczej niż faktem życia?

Wszystkie ówczesne teorie próbowały wytłumaczyć fakt wzrostu bakteriofagów, nie sięgając do fantastycznej hipotezy żywego świata pozawidzialnego. Bail wysunął hipotezę, że bakteriofagi są to ułamki ciał bakteryjnych zdolne do wszczynania procesów rozpadu, ale niezdolne do inicjowania rekonstrukcji bakterii. Bordet mówił o dziedzicznym odchyleniu metabolizmu (czyli przemiany materii) w bakteriach, Hadley dopatrywał się w bakteriofach pewnych form rozwojowych bakterii.

Może najradykałniej próbowali usunąć z nauki obraz żyjącego świata pozawidzialnego: badacz japoński Kabashima i badacz szwajcarski Dörr. Procesy chemiczne mogą przecież ulec przyspieszeniu przez katalizatory, jeśli więc katalizatory same powstają w przebiegu danej reakcji chemicznej, to szybkość tej reakcji musi się potęgować. Procesy takie nazywamy *autokatalizą* i w ich przebiegu możemy otrzymać wzrost produktów rozpadu, który nie jest życiem, choć może na życie wyglądać. Rozpuszczanie bakterii przez bakteriofag i rozmnażanie się bakteriofaga w czasie tego rozpadu mogłoby być zatem wyrazem procesów autokatalitycznych. Podobnie, jak nie możemy uważać faktu narastania lawiny za objaw życia, tak rozmnażanie się bakteriofagów w przebiegu rozpadu młodych form może, ale nie musi znamionować życia.

Na tym poziomie stanęłaby dyskusja nad istotą bakteriofaga, gdyby nie przyszedł z pomocą wspaniały rozwój badań nad zarazkami przesączalnymi. Metody, o których wspomniałem na początku, wykazały różnorodność form i wymiarów tworów świata pozawidzialnego. Gdy jednak do pomocy stanął mikroskop elek-

tronowy, określono postacie poszczególnych virusów. Zauważono też, że zagadnienia dotyczące zarazków przesączalnych mogą mieć zastosowanie również do życia bakteriofagów.

Następujące przykłady niech zilustrują głębię tych problemów, związanych z powstaniem życia w ogóle.

Istnieją nowotwory u kur, wywołane przez zarazek przesączalny o określonej wielkości (mięsak R o u s s a). Możemy jednak wywołać ten nowotwór u każdej prawie kury, wstrzykując domięśniowo miazgę embrionalną i arsen. Wywołujemy w ten sposób nowotwór przeszczepialny, zawierający zarazek przesączalny.

Jak wytłumaczyć to zjawisko? Czy zarazek ten istniał w pozornie zdrowej kurze, ale w stanie równowagi z komórką — równowagi, którą naruszyliśmy przez zabieg — czy też produkty rozpadu komórki mają zdolność wywoływania dalszych procesów destrukcyjnych drogą autokatalizy?

Inny przykład: w różnych chorobach występuje opryszczka, możemy jednak zawartość jej przenieść na oko królika, wywołując charakterystyczne schorzenie oka i mózgowia. Stajemy przed tym samym zagadnieniem: czy zarazek opryszczki istniał przedtem, ale w równowadze z komórką makroorganizmu, czy też różne czynniki zmieniły metabolizm komórki na autokatalityczny?

Za pomocą wirowania różniczkowego, ultrafiltracji i mikroskopu elektronowego oznaczono wielkość zarazków przesączalnych. Gdy zastosowano te metody do bakteriofagów, okazało się, że i tutaj można stwierdzić postacie o różnych kształtach i wielkościach (p. rys. 5 na str. następnej).

Okazało się też, że bakteriofagi zachowują swój kształt i swoją wielkość, nie zmieniając się bynajmniej w czasie różnych procesów adaptacyjnych.

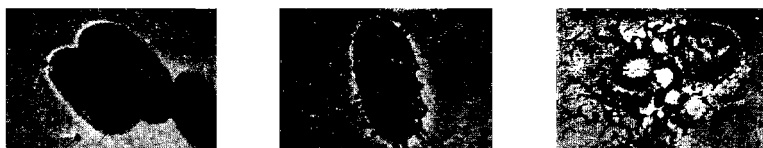
Próbowano już przedtem mierzyć ilość bakteriofagów. Gdy podziałać bakteriofagiem na kolonię bakteryjną, wyrosłą na podłożach starych, uzyskuje się różne stopnie rozpuszczenia — od zupełnej lizy aż do łysinek różnej wielkości. Liczba łysinek odpowiada liczbie bakteriofagów, a ich kształt i wielkość są charakterystyczne dla rozmaitych bakteriofagów.

Badania te, wykazujące morfotyczny, a nie płynny charakter bakteriofagów, zostały potwierdzone przez spostrzeżenia w mikroskopie elektronowym.



Rys. 5. Kształty bakteriofagów (według Ruski).  
Zdjęcia w mikroskopie elektronowym.

Wreszcie można było odtworzyć sam proces ataku. Rys. 6 ilustruje, jak bakteriofagi zbliżają się do bakterii, jak żłobią sobie drogę i jak w pewnej chwili wywołują rozpad, przypominający wewnątrzkomórkową eksplozję.



Rys. 6. Atak bakteriofaga na bakterię (według Ruski).  
Zdjęcia w mikroskopie elektronowym.

Wszystkie te badania potwierdziły pierwotną hipotezę d'Hérelle'a o żywej istocie bakteriofagów. Bliższa analiza działania bakteriofagów wskazywała również na procesy biologiczne, w których oba twory, bakterie i bakteriofagi, przejawiały nadzwyczajną zdolność wzajemnej adaptacji.

Przyjrzyjmy się procesom, jakie odbywają się w rozpuszczonej hodowli bakterii. Hodowla taka zawiera rozmnożone bakteriofagi i szczątki bakterii. Dla pewności przefiltrujmy hodowlę tak, że wszystkie twory wielkości bakterii nienaruszonej zostaną

odfiltrowane. Otóż przezroczysta hodowla po pewnym czasie mętnieje. Polega to na odrodzeniu się bakterii z ich ułamków, które widocznie posiadają własność regeneracji. Bakterie powstałe z tych ułamków są jednak niezupełnie identyczne z bakteriami wyjściowymi. Odżyły one w warunkach, gdy działał na nie bakteriofag, mogły przeto powstać tylko w postaci niewrażliwej na jego działania. Bakterie takie mają na ogół nieco inne znamiona biochemiczne. Obserwujemy zatem powstanie nowych ras bakterii o cechach odmiennych — możemy to w pewnym stopniu porównać z mutacją makroorganizmów. Ale mutacje makroorganizmów można wywoływać także sztucznie, za pomocą promieni wnikaających w głąb plazmy zarodkowej, gdzie wywołują one zmiany w genach. Tu mamy jednak do czynienia z wymiarami nie o wiele większymi niż geny, z cząsteczkami zdolnymi do regeneracji, niejako z obnażonymi genami bakteryjnymi. Nic też dziwnego, że twory pozawidzialne wywołują w starciu z bakteriami rozłupaniem na drobne cząsteczki odmiany, które musimy uznać za nowe rasy.

Na czym polega ta zdolność przeobrażania się? Pytanie to wiąże się z zagadnieniem ogólnym: jak powstają nowe cechy, jak wytłumaczyć sobie początek nowych gatunków?

Dwie teorie walczyły tu o zwycięstwo: lamarckizm, uznający bezpośredni wpływ kształtujący otoczenia, i darwinizm, tłumaczący powstawanie gatunków selekcją cech preegzystujących, korzystnych w walce o byt. Współczesna biologia wyjaśniła w dużym stopniu tę sprzeczność. Mutacje stanowią o występowaniu nowych cech, selekcja zaś dba o to, by były one życiodajne. Jeśli zmniejszają one szanse życiowe osobnika, dane odmiany giną.

Tu, w świecie mikroorganizmów, spotykamy konflikt podobny. Istnieją w naturze rasy bakterii niewrażliwych na bakteriofagi. Także w hodowlach bakteryjnych spotykamy często kolonie wrażliwe i niewrażliwe. Być może, że pod wpływem bakteriofagów następuje selekcja jedynie ras niewrażliwych. W każdym razie nie możemy wyłączyć takiego kształtującego wpływu zarazków pozawidzialnych na cechy bakterii. Równocześnie z tym obserwujemy wspomnianą już adaptację bakteriofagów do bakterii, adaptację, która wprowadziła bakteriofagi do metodyki bakteriologicznej: możemy przy pomocy bakteriofagów rozróżnić różne gatunki bakterii.

Aby zrozumieć zdolność bakteriofagów do adaptacji, omówimy tu na kilku przykładach zdolności przystosowawcze zarazków przesączalnych. Takimi są zarazki wywołujące ospę, żółtą febrę i wściekliznę.

Pierwsza z tych chorób należała do najstraszniejszych plag, które zaważyły na historii. Zauważono jednak (Jenner), że zarazek ospy zmniejsza w ustroju krowy swą zjadliwość dla człowieka. Osobnik zakażony zarazkiem mniej zjadliwym jest odporny na zarazek bardziej zjadliwy. Stwierdzono potem, że wstrzykując zarazek ospy lub krowianki domózwowo lub podskórnice, stwarzamy odmiany zarazków bardziej dostosowanych do drogi wnikania.

Zastanówmy się nad febrą żółtą. Wywołuje ją zarazek przesączalny, mający powinowactwo do wątroby i wywołujący jej degenerację. Na tkankę mózgową zarazek ten działa w mniejszym stopniu. Ale wstrzyknięcie zarazka do mózgu osłabia powinowactwo do wątroby, potęguje natomiast jego powinowactwo do mózgu. Zmieniony w ten sposób virus, tzw. *neurotropowy*, o ile go wstrzyknąć podskórnice, nie wywołuje więcej zmian degeneracyjnych w wątrobie, nie zagraża zdrowiu, natomiast uodpornia.

Podobnie tłumaczymy też powstawanie szczepionki przeciw wściekliznie z virusu ulicznego: polega ono na dostosowaniu się virusu do centralnego układu nerwowego z osłabieniem czy utratą jego powinowactwa do układu nerwowego obwodowego. Nie wiemy tylko, czy virus ospy, wścieklizny lub żółtej febry składa się z różnych odmian, powstałych kiedyś w naturze, odmian, które selekcjonujemy przez sztuczne skierowywanie zarazka do poszczególnych narządów, czy też zarazki te dopiero w starciu z komórką makroorganizmu wytwarzają nowe odmiany. Tak więc badania nad virusami mogą rzucić pewne światło również na procesy, zachodzące w przebiegu starcia między bakteriofagiem a bakterią. Na podstawie tej analogii możemy doszukiwać się w „zakażonych” bakteriach przemian i zjawisk, stwierdzonych w zakażonym makroorganizmie.

Znane jest zjawisko tzw. *zdrowego nosicielstwa*, polegające na tym, że zarazek krąży w makroorganizmie nie wywołując choroby. Warunkiem tego współżycia jest odporność wrodzona albo nabyta pod wpływem zakażenia lub uodpornienia sztucznego. Mamy wówczas do czynienia z równowagą względną między makro- i mikroorganizmem, którą możemy naruszyć. Takie jest zjawisko bezobjawowego nosicielstwa w zakażeniu makroorganizmu.

Czy podobne zjawiska dają się stwierdzić również w świecie bakterii?

Niejednokrotnie spotykamy w makroorganizmach różnice osobnicze we wrażliwości na zarazki. Otóż istnieją również szczepy bakterii niewrażliwe na bakteriofagi. Podobnie jak zwierzęta stosunkowo niewrażliwe na dane bakterie chorobotwórcze mogą być bezobjawowymi nosicielami, tak hodowle bakteryjne zawierają często bakteriofagi, którym pozornie nie podlegają. Hodowla taka może się składać z większości bakterii niewrażliwych i małej ilości wrażliwych, których rozpuszczanie przez bakteriofagi umożliwia bakteriofagom życie. Nie zauważamy tego jednak, gdyż powstałe drobne łysinki są przerośnięte przez bakterie odporne. Poddając hodowle wrażliwe działaniu przesączów z takich szczepów-nosicieli, możemy stwierdzić istnienie nosicielstwa u bakterii. Podobnie jak komórka makroorganizmu staje się odporna pod wpływem zakażenia słabym zarazkiem, tak i w bakteriach zakażonych słabym bakteriofagiem spostrzegamy zjawisko analogiczne do uodpornienia. Zjawisko to nazywamy *interferencją*.

Widzimy zatem, jak uzasadniony jest pogląd, że bakteriofagi są to „virusy bakterii”.

Najmniejsze postacie bakteriofagów obserwowane przez Ruskę są kuliste i mają wielkość 40 milimikronów; stwierdzono je w hodowlach prątków okrężnicy, duru i czerwonki. Większe bakteriofagi, mierzące około 70 milimikronów, mają często wypustkę grubości 15 milimikronów i długości dochodzącej do 200 milimikronów. W hodowlach rozpuszczonych bakterii odmieńca, okrężnicy, duru i czerwonki występują jeszcze większe postacie bakteriofaga o głowicy wyraźnie dwudzielnej, przypominającej dwoinkę. Wymiary głowicy wynoszą 60 do 110 milimikronów, ogonka zaś 15 do 100 milimikronów. Istnieją wreszcie bakteriofagi pałeczkowate z biegunowo ułożonymi zagęszczeniami. Jeden i ten sam szczep faga może zawierać jednocześnie postacie kuliste, maczugowate i pałeczkowate. Różne te postacie nie są wynikiem przejścia jednego kształtu w drugi, ale świadczą o mieszanej naturze faga.

Działanie fagów na bakterię rozpoczyna się od ich wiązania przez powierzchnię bakterii. Młode fagi mogą być wiązane nawet w zimnie, liza natomiast bakterii dochodzi do skutku tylko w wyższej ciepłocie. Wiązanie może się odbywać nawet wtedy, gdy bakterie uległy zabiciu. Jeżeli bakterie wiążą się z fagami, które ich nie rozpuszczają, to stają się one odporne na działanie

fagów. Zjawisko odporności, które jest podstawą współżycia komórki zwierzęcej i bakterii, spotykamy więc również przy zetknięciu się bakterii z bakteriofagiem. Fagi można zobojętnić surowicą odpornościową podobnie jak jady bakteryjne.

Wiązanie fagów z bakteriami może być uwidocznione w mikroskopie elektronowym, jak wykazują rysunki 7 i 8.



Rys. 7. Atak fagów maczugowatych na *B. dysenteriae*.



Rys. 8. Atak bakteriofagów na *B. coli*.

Zdjęcia w mikroskopie elektronowym (według Ruski).

Przypuszczalnie fagi posiadają specjalne narządy, umożliwiające im przytwierdzenie się do powierzchni bakterii. Fagi napadające na bakterie rozmnażają się w czasie lizy i ewentualnie nieco wcześniej; w każdym razie przedostają się one w większej ilości do płynu, w którym bakterie i fagi są zawieszane. Nie udało się dotychczas przy pomocy mikroskopu elektronowego stwierdzić dokładnej morfologii procesów podziałowych u fagów. Niektórzy sądzą, że podział ten jest podłużny i że procesy podziału fagów mogą się odbywać już na powierzchni, a nie w głębi ciał bakteryjnych. Tłumaczyłoby to przypadki, kiedy napotymano zjawisko rozmnażania fagów przed nastąpieniem lizy.

Badania przy pomocy mikroskopu elektronowego pozwoliły na ostateczne odrzucenie teorii rozstrząsanych przed erą tego mikroskopu. Udowodniły one, że fagi nie są wysokomolekularnymi ciałami chemicznymi, lecz istotami żyjącymi, obdarzonymi wielkością i kształtem. Dzięki temu obalono teorie, które dopatrywały się w fagach jedynie zwykłych substancji czynnych, jak fermenty lub hormony. Odrzucić też należy pogląd na fagi, jako na normalne składniki komórek bakteryjnych. Nieprawdopodobne jest, by były one stadiami rozwojowymi bakterii. Badaniom elektronowo-mikroskopowym oparła się tylko teoria d'Hérelle'a, według której fagi są prymitywną postacią tworów żywych.



W ten sposób dyskusja nad istotą bakteriofagów zyskała szersze podłoże. Podobnie jak dla bakterii i wirusów, należało dążyć do ustalenia cech, przy pomocy których można by było charakteryzować poszczególne bakteriofagi. Rozporządzamy obecnie następującymi kryteriami:

1<sup>o</sup> wielkość bakteriofagów, którą możemy ustalić bądź przez sączenie, bądź przez wirowanie różniczkowe, bądź w mikroskopie elektronowym;

2<sup>o</sup> wielkość i charakter łysinek;

3<sup>o</sup> różnice odporności na niektóre czynniki chemiczne i fizyczne, jak błękit metylenowy, cytrynian sodu, mocznik, promienie pozafioletkowe;

4<sup>o</sup> swoista chorobotwórczość dla poszczególnych gatunków bakteryjnych lub ich składników szczepowych;

5<sup>o</sup> swoistość serologiczna: za pomocą surowic odpornościowych możemy rozróżnić poszczególne gatunki bakteriofagów, tak jak rozróżniamy poszczególne gatunki bakterii.

Nauka o bakteriofagach od samego początku zajęła się sprawą ich zmienności. Działając nimi na bakterie i następnie sącząc rozpuszczoną hodowlę, możemy wzmoenić u bakteriofaga zdolność rozpuszczania, spotęgować niejako jego zjadliwość. Kryteria zaś przed chwilą wymienione umożliwiają ściślejsze oznaczenie typu bakteriofaga. Okazało się, że *bakteriofagi mogą się zmieniać, ale tylko w obrębie określonych granic*. I tutaj więc, w zakresie zmienności bakteriofagów, otworzyły się zupełnie nieoczekiwane horyzonty i zostały stworzone metody, które przypuszczalnie zrewolucjonizują nasze metody laboratoryjne w dziedzinie bakteriologii.

Aby bliżej wyjaśnić te badania, muszę omówić pokrótce piękny dział bakteriologii, który moglibyśmy nazwać badaniem *architektoniki komórki bakteryjnej*.

Przyjrzyjmy się zarazkowi duru brzuszego. Mamy tu do czynienia z pałeczką posiadającą kilkanaście rzęsek, dzięki którym porusza się. Rzęski te nie są jednak nieodzownym atrybutem gatunku. Bez trudu możemy otrzymać postacie bezrzęskowe tegoż zarazka. Badania biochemiczne i serologiczne stwierdziły, że rzęski i ciała bakteryjne składają się z odrębnych elementów. W rzęskach stwierdzamy składniki raczej białkowe, w ciele bakteryjnym natomiast związki złożone z lipin i wielocukrów. Możemy otrzymać odrębne przeciwciała dla rzęsek i odrębne dla

komórki bakteryjnej. Składniki obecne w rzeskach oznaczamy przez *H*, a składniki znajdujące się w ciele bakteryjnym — przez *O*. Nie wyczerpuje to jednak stwierdzonej dotychczas złożoności komórki bakteryjnej. Istnieje jeszcze trzeci składnik otaczający bakterię duru brzuszego. Poprzez tę otoczkę przebijają się właśnie rzeski. Otóż otoczka ta wpływa na *virulencję* czyli jadowitość bakterii; nazywa się ją *antygenem Vi*.

Wszystko to gra niepoślednią rolę przy starciu bakteriofagów z bakteriami. Istnieją bowiem bakteriofagi, które reagują z ciałem *O*, inne zaś z ciałem *Vi*. Bakteriofag reagujący z ciałem *Vi* rozpuszcza drobnoustroje zawierające *Vi*. Bakterie duru brzuszego pozbawione antygeny *Vi* mogą być rozpuszczone przez bakteriofagi anty-*O*, nie mogą być natomiast rozpuszczone przez bakteriofagi anty-*Vi*. Widzimy zatem rzecz niespodziewaną: tak jak poszczególne bakterie mają powinowactwo do poszczególnych komórek makroorganizmu i tak jak poszczególne zarazki przesączalne reagują bądź z tkanką mózgową, bądź z tkanką wątroby, tak też istnieją bakteriofagi reagujące z poszczególnymi składnikami bakterii.

Otóż tutaj badania Craigie'ego wykryły następującą całkowitą niespodzianą swoistość: antygeny *Vi* są różne u rozmaitych bakterii durowych! Nie możemy ich rozróżniać za pomocą metod serologicznych, nie potrafi też tego biochemik, ale uczyni to zarazek przesączalny.

*Za pomocą bakteriofagów anty-Vi możemy odróżniać różne szczepy pałeczek duru brzuszego.*

Virus febry żółtej ma — jak widzieliśmy — silne powinowactwo do wątroby, a słabe do mózgu; wstrzykując go domózgowo, stwarzamy jednak odmiany silniej atakujące mózg niż wątrobę. Tak samo bakteriofagi anty-*Vi*. Z początku rozpuszczają jeden szczep, a słabiej — lub wcale — inne szczepy. Jeżeli jednak hodujemy bakteriofagi na takim słabo się rozpuszczającym szczepie, przeszczepiając z niego utworzone pojedyncze łyśinki, to bakteriofag adaptuje się do tego szczepu i w konsekwencji nie rozpuszcza szczepu pierwotnego, lecz tylko te szczepy, do których się przyzwyczaił. Za pomocą tej metody możemy nastawiać bakteriofagi na poszczególne szczepy, możemy je niejako wytresować tak, że będą rozpuszczały jedynie pewne określone szczepy pałeczek duru brzuszego. Poprzednio znane metody umożliwiały stwier-

dzenie jednego gatunku bakterii durowych. Badania przy pomocy zarazków przesączalnych, przystosowanych do poszczególnych szczepów, pozwoliły na daleko idące zróżniczkowanie tych bakterii. Dotychczas, po kilku latach, stwierdzono 26 typów, odmian czy też ras pałeczki duru brzuszego, nieuchwytnych żadną inną metodą. Oznacza się je różnymi literami. Rys. 9 odzwierciedla to zjawisko.

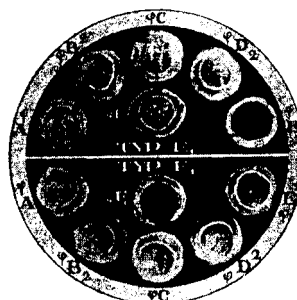
Natrafiamy tu na to samo zagadnienie, na tę samą tajemnicę istoty nowych odmian, którą stwierdziliśmy w świecie virusów: czy fagi są mieszaniną różnych odmian powstałych uprzednio, czy nowymi mutacjami jednej odmiany?

Jakie są praktyczne konsekwencje opisanego zjawiska?

Pierwszą jest jego zastosowanie w epidemiologii. Dur brzuszny zwalczamy, doszukując się nosicieli zarazka. Poszukiwania te nie zawsze dają wyniki z punktu widzenia epidemiologicznego, ponieważ stwierdziwszy zarazek u chorego i u jakiegoś obcego nosiciela, nie możemy mieć pewności, że właśnie ten nosiciel jest przyczyną zachorowania lub epidemii.

Możność rozróżnienia kilkudziesięciu typów zarazka duru brzuszego stanowi ogromny postęp. Tak np. wśród 36 chorych, zbadanych w szpitalach wrocławskich na zarazki duru brzuszego, stwierdzono u 10 typ D, u 6 — typ E, u 6 — typ F, u 2 — typ J i u 5 — typ M. We Wrocławiu zatem przeważają pałeczki duru brzuszego typów D, E, F i M. W Bystrzycy natomiast zbadano 2 chorych, z których jeden miał typ B, w Jaworze zaś na 2 chorych jeden miał typ C. W Kłodzku stwierdzono typy A i O, których nie spotkano we Wrocławiu, i t. d. Jasne jest teraz, że jeśli stwierdzimy w szpitalu wrocławskim typ A, będziemy liczyli się z tym, że chory zakaził się w miejscu, gdzie ten typ występuje, a zatem — według naszych badań — w Kłodzku, Lubaniu lub Trzebnicy. Rozwinięcie tych badań jest w toku, są one częścią badań międzynarodowych.

Badania te były prowadzone z początku w Kanadzie przez Craigie'ego i Yena (w 1938 r.). Następnie powstał ośrodek na całe Imperium Brytyjskie w Londynie pod kierunkiem Felixa.



Rys. 9. Typowanie bakterii duru brzuszego za pomocą odpowiednich bakteriofagów (według Craigie'ego).

Bakteriofag E rozpuszcza jedynie typ E, a bakteriofag F — jedynie typ F. W niektórych koloniach widać maleńkie łysinki.

Wreszcie, na Zjeździe Międzynarodowym w Kopenhadze w 1947 roku postanowiono ośrodek londyński zmienić na Centralny Ośrodek Międzynarodowy pod kierunkiem Craigie'ego i Felixa oraz stworzyć ośrodki narodowe w poszczególnych państwach. Ośrodek polski znajduje się w Filii Państwowego Zakładu Higieny we Wrocławiu, gdzie właśnie przeprowadzono wspomniane badania nad typami pałeczki duru brzuszego u chorych miejscowych.

Mamy tu zatem do czynienia z odkryciem nie tylko o wielkim zasięgu epidemiologicznym, ale i metodycznym. Możliwość użycia zarazków przesączalnych do subtelniejszego klasyfikowania poszczególnych gatunków i szczepów bakteryjnych jest przypuszczalnie metodą przyszłości. Dość powiedzieć, że ostatnio stwierdzono 56 odmian czerwonki. Filie Państwowego Zakładu Higieny zajmują się już tym zagadnieniem, umożliwiając nakreślenie mapy epidemicznej kraju <sup>1)</sup>.

Drugim zastosowaniem zjawiska zmienności bakteriofagów jest ich użycie profilaktyczne lub lecznicze. Istnieją dane, że bakteriofag dostosowany do typu bakterii, która wywołała zachorowanie, działa leczniczo. Otworzy to być może w lecznictwie duru brzuszego nowe horyzonty.

Tak przedstawia się dzisiaj sprawa walki świata niewidzialnego z pozawidzialnym. Drobnoustroje często działają na siebie antagonistycznie, „walczą ze sobą“ — jeżeli można użyć wyrazu tak bliskiego niespokojnej psychice człowieka. Geniusz ludzki potrafił jednak wyciągnąć z tej walki korzyść. Antagonizm między niektórymi grzybkami a bakteriami doprowadził do odkrycia najwspanialszego środka leczniczego, jakim jest penicylina. Dziś jesteśmy świadkami odkrycia konfliktów między zarazkiem przesączalnym a bakterią; potrafimy potęgować zjadliwość owego zarazka przesączalnego i skierowywać go na poszczególne typy bakterii. Wylaniają się tutaj nowe możliwości diagnostyczne, nowy oręż w walce z chorobami zakaźnymi. Odkrycia czystej nauki mogą być obrócone dla dobra ludzkości. Z konfliktu między światem niewidzialnym a pozawidzialnym możemy ukuć skuteczną broń dla ochrony zdrowia i życia człowieka.

---

<sup>1)</sup> Wspólna praca na ten temat z A. Gallis-Malejczykową, Z. Niewiadomską i C. Zwierzem została ogłoszona w Polskim Tygodniku Lekarskim (1948, Nr 14).

WYDAWNICTWA  
WROCŁAWSKIEGO TOWARZYSTWA NAUKOWEGO  
Prace Wrocławskiego Towarzystwa Naukowego  
Seria A

- Nr. 1. *Hermogenes de statibus*, edidit Georgius Kowalski. Wratislaviae 1947, p. LXXXII + 72.
- Nr. 2. Maleczyński Karol, W sprawie autentyczności bulli gnieźnieńskiej z r. 1136. Wrocław 1947, s. 28.
- Nr. 3. Mikulski Tadeusz, Nad tekstami Kniażnina. I. Wrocław 1947, s. 60.
- Nr. 4. Styś Wincenty, Drogi postępu gospodarczego wsi. Wrocław 1947, s. 344, 5 map.
- Nr. 5. Maleczyńska Ewa, Społeczeństwo polskie z epoki pierwszych Jagiellonów wobec zagadnień zachodnich. Wrocław 1947, s. 164.
- Nr. 6. Czapliński Władysław, Polska a Prusy i Brandenburgia za Władysława IV. Wrocław 1947, s. 283.
- Nr. 7. Biliński Bronisław, De Apollodoreis in Pliniana Graeciae descriptione (N. H. IV 1—32) obviis. Wratislaviae 1948, s. 135.
- Nr. 8. Mycielski Andrzej, Polityczno-ustrojowa wiedza stosowana i jej praktyczne zalecenia. Wrocław 1947, s. 40.
- Nr. 9. Strzelecki Ladislaus, De Ateio Capitone nuptialium caerimoniarum interprete. Wratislaviae 1947, s. 27.
- Nr. 10. Olszewicz Bolesław, Polska a odkrycie Ameryki.
- Nr. 11. Kotwicz Władysław, Józef Kowalewski, orientalista—1800-1878 (w druku).
- Nr. 12. Pocięcha Władysław, Polska wobec elekcji cesarza Karola V. w r. 1519. Wrocław 1947, s. 88.
- Nr. 13. Majewski Kazimierz, Importy rzymskie na ziemiach słowiańskich (w druku).
- Nr. 14. Rospond Stanisław, Z badań nad przeszłością dialektu śląskiego — „Der hoch- und plattpolnische Reisegefährte“ 1804 — Charakterystyka językowa i przedruk (w druku).
- Nr. 15. Skurzak Ludwik, Études sur l'origine de l'ascétisme indien. Wrocław 1948, s. 56.
- Nr. 16. Krzyżanowski Juliusz, Shakespearian Modifications — Methodical Prolegomena. Wrocław 1948, s. 31.
- Nr. 17. Zajaczkowski Ananiasz, Głosy tureckie w zabytkach staropolskich. I. Katechizacja turecka J. Herbiniusa z r. 1675. Wrocław 1948, s. 76.
- Nr. 18. Floryan Władysław, Forma poetycka „Pieśni“ Jana Kochanowskiego wobec kierunków liryki renesansowej (w druku).
- Nr. 19. Strzelecki Ladislaus, De Litterarum Romanarum nominibus Wratislaviae 1948, s. 41.
- Nr. 20. Rospond Stanisław, Studia nad językiem polskim XVI wieku — Jan Seklucjan, Jan Malecki, Stanisław Murzynowski, Grzegorz Orszak (w druku).
- Nr. 21. Steffen Victor, De duobus Sapphus carminibus redivivis. Wratislaviae 1948, s. 26.
- Nr. 22. Lepik Wilhelmina, Mathematical Planning of the Ancient Theatres (on the basis of Vitruvius and monuments).
- Nr. 23. Longchamps Franciszek, Założenia nauki administracji (w druku).
- Nr. 24. Gierowski Józef Andrzej, Generał Księstwa Mazowieckiego na tle ustroju sejmikowego Mazowsza (w druku).

---

SKŁAD GŁÓWNY W PAŃSTWOWYM INSTYTUCIE WYDAWNICZYM

WYDAWNICTWA  
WROCŁAWSKIEGO TOWARZYSTWA NAUKOWEGO

(ciąg dalszy)

Prace Wrocławskiego Towarzystwa Naukowego  
Seria B

- Nr. 1. Steinhaus Hugo, O zagadnieniu taryfy elektrycznej, Wrocław 1947, s. 49.  
Nr. 2. Hirszfeld Ludwik i Amzel Róża, O pośrednich postaciach grup krwi i ich dziedziczeniu, Wrocław 1947, s. 56.  
Nr. 3. Moszkowska Irena, Częściowy wzrost olbrzymi (*Gigantismus partialis*), Wrocław 1947, s. 44.  
Nr. 4. Mergentaler Jan, Recherches sur les étoiles variables (w druku).  
Nr. 5. Opolski Antoni, Studies on Cepheid variable stars (w druku).  
Nr. 6. Słupecki Jerzy, Z badań nad sylogistyką Arystotelesa (w druku).  
Nr. 7. Klimaszewski Mieczysław, Polskie Karpaty Zachodnie w okresie dyluwialnym, Wrocław 1948, s. 236 + 7 tablic w teczce.  
Nr. 8. Szczepankiewicz Stanisław, Intensywność urzeźbienia krajobrazu okolic Wałbrzycha, Wrocław 1948, s. 24.  
Nr. 9. Albert Zygmunt, Wrzody dwunastnicy u niemowląt i dzieci, Wrocław 1948, s. 48.  
Nr. 10. Kowarzykowie Hugon i Zofia, Podstawy elektrokardiografii ogólnej (w druku).  
Nr. 11. Schmuck Adam, Klimat regionu Wałbrzyskiego, Wrocław 1948, s. 48.

---

Sprawozdania Wrocławskiego Towarzystwa Naukowego **1**, 1946 s. 64; **2**, 1947, s. 123; **3**, 1948 (w druku).

Comptes - rendus de la Société des Sciences et des Lettres de Wrocław I, 1946—1947 (w druku).

Codex Diplomaticus Silesiae. Zbiór dokumentów i listów do historii Śląska. Zeszyt I, wydał K. Maleczyński — Wydawnictwo wspólne z Wrocławskim Towarzystwem Miłośników Historii (w druku).

Kowalski Jerzy, O autonomii zjawisk świata duchowego, Wrocław 1947, s. 14.

Hirszfeld Ludwik, Walka między światem niewidzialnym a pozawidzialnym, Wrocław 1948, s. 18.

---

SKŁAD GŁÓWNY W PAŃSTWOWYM INSTYTUCIE WYDAWNICZYM  
WARSZAWA, FOKSAL 17 — WROCŁAW, RYNEK 8

Exemplarz bezpłatny

## Spis treści

Profesor Piotr Słonimski (9 XI 1922 – 25 IV 2009) .....	89
E. K. Jagusztyn-Krynicka, J. Rybacki, A. M. Łasica – Nowe strategie poszukiwania leków przeciw-bakteryjnych – leki przeciw-toksynowe .....	93
A. Sikora, M. K. Błaszczuk – Prokarioty redukujące Fe(III): klasyfikacja, występowanie, mechanizmy redukcji Fe(III), rola ekologiczna i znaczenie biotechnologiczne .....	105
M. Skóra, J. Witalis, P. Krzyściak, A. B. Macura – Grzyby z rodzaju <i>Geotrichum</i> jako oportunistyczny patogen człowieka .....	125
J. Puławska, K. Kielak, P. Sobiczewski – Bioróżnorodność bakterii <i>Erwinia amylovora</i> – sprawcy zarazy ogniowej .....	133
J. S. Niczyporuk, E. Samorel-Salmonowicz, H. Czekaj – Reowirusy – budowa oraz chorobotwórczość dla ludzi i zwierząt .....	143
L. Hirszfild – Walka świata niewidzialnego z pozawidzialnym .....	153

## Contents

Professor Piotr Słonimski (9 XI 1922 – 25 IV 2009) .....	89
E. K. Jagusztyn-Krynicka, J. Rybacki, A. M. Łasica – Novel strategies for antibacterial drug discovery – antitoxin drugs .....	93
A. Sikora, M. K. Błaszczuk – Fe(III)-reducing prokaryotes: classification, distribution, mechanisms of Fe(III) reduction, ecological role and biotechnological significance .....	105
M. Skóra, J. Witalis, P. Krzyściak, A. B. Macura – Fungal genus <i>Geotrichum</i> : an opportunistic pathogen of humans .....	125
J. Puławska, K. Kielak, P. Sobiczewski – Biodiversity of <i>Erwinia amylovora</i> – the causal agent of fire blight .....	133
J. S. Niczyporuk, E. Samorel-Salmonowicz, H. Czekaj – Reoviruses – structure and pathogenicity for human and animals .....	143
L. Hirszfild – Struggle between the visible and invisible world .....	153

POLITECHNIKA ŁÓDZKA  
WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII I NAUKI O ŻYWNOSĆCI  
SERDECZNIE ZAPRASZA

w dniach 7–9 września 2009 r.

na

V Międzynarodową Konferencję Naukową

## **Rozkład i Korozja Mikrobiologiczna materiałów technicznych**

W programie przewidziane są:

referaty plenarne zaproszonych wybitnych specjalistów (w tym gości zagranicznych), sesja posterowa, wystawy i prezentacje firm oraz V sesji referatowych:

1. Rozkład mikrobiologiczny i korozja wzbudzana przez mikroorganizmy materiałów technicznych,
2. Mikrobiologia zbiorów muzealnych i wyrobów artystycznych,
3. Mikroorganizmy, a jakość życia,
4. Ochrona materiałów technicznych przed rozkładem i korozją wzbudzoną przez mikroorganizmy
5. Metody badań procesu biodeterioracji materiałów

Opłata konferencji wynosi  
800 zł dla pracowników wyższych uczelni, instytucji naukowo-badawczych  
oraz pracowników przemysłu, 1500 dla firm.  
Doktoranci i studenci – 400 zł

Szersze informacje na temat konferencji na stronie:

**<http://korozja.p.lodz.pl>**

### **Kontakt:**

Dr inż. Anna Koziróg  
Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii,  
Politechnika Łódzka  
90-924 Łódź, ul. Wólczyńska 171/173,  
tel. (0 42) 631 34 70, fax (0 42) 636 59 76,  
e-mail [anna.kozirog@p.lodz.pl](mailto:anna.kozirog@p.lodz.pl)