

Kwartalnik

**Tom 50**

**Zeszyt 4•2011**

PAŹDZIERNIK – GRUDZIEŃ

CODEN:

PMKMAV 50 (4)

2011

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

# Postępy Mikrobiologii

Advances in Microbiology

Index Copernicus ICV = 9,00 (2010)

Impact Factor ISI = 0,108 (2010)

<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 (Warszawski Uniwersytet Medyczny),  
ANDRZEJ PASZEWSKI (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN), ANDRZEJ PIEKAROWICZ (Uniwersytet Warszawski),  
ANTONI RÓŻAŁSKI (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. (22) 554 13 05/304, fax (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. (22) 628 08 22, (22) 621 13 51  
e-mail: zmf@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: (91) 46 616 51, 52, lub fax: (91) 46 616 59, e-mail: kalemba@mp.pl lub kalemba@sci.pam.szczecin.pl

#### STALI RECENZENCI:

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

CZASOPISMO WYDAWANE Z FINANSOWĄ POMOCĄ  
 MINISTERSTWA NAUKI I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO

ISBN 978 - 83 - 923731 - 3 - 1

#### **Informacja o zdjęciu na okładce:**

Komórki *Bacillus subtilis* (BR-1-S) wnikające do komórki linii Int 407  
Fotografia: J. Wiśniewski – Zakład Mikrobiologii Stosowanej  
Instytut Mikrobiologii Uniwersytetu Warszawskiego

---

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

Nakład 1150, Objętość 9 arkuszy wyd., Papier offser 80 g

Skład i druk: *Zakład Wyd. Letter Quality*, tel. 22 631 45 18, 607 217 879,  
e-mail: roma.walendzewicz@gmail.com; projekt okładki: *Jerzy Grzegorkiewicz*

## Prof. dr hab. Zdzisław Ilczuk (1929–2011)



### Zdzisław Ilczuk – Wspomnienie

W dniu 10 września 2011 roku zmarł Prof. dr hab. Zdzisław Ilczuk, emerytowany profesor zwyczajny i wieloletni kierownik Zakładu Mikrobiologii Przemysłowej UMCS. W latach 1982–1990 redaktor naczelny czasopisma *Postępy Mikrobiologii*.

Profesor Zdzisław Ilczuk urodził się 23 marca 1929 r. w Zagożdżonie (od 1932 r. Pionki) w rodzinie robotniczej. Wykształcenie podstawowe Profesor zdobywał w latach 1936–1943 w Pionkach (do wybuchu wojny w 1939 r.) i w Chełmie. W okresie okupacji pracował przez jakiś czas fizycznie w lokomotywowni w Chełmie. W mieście tym ukończył też Gimnazjum im. Stefana Czarnieckiego uzyskując w roku 1947 tzw. „małą maturę”. Świadectwo dojrzałości Liceum Ogólnokształcącego (typu przyrodniczego) w Pionkach uzyskał w 1949 roku. W 1950 roku rozpoczął studia biologiczne pierwszego stopnia na Wydziale Matematyczno-Przyrodniczym Uniwersytetu Warszawskiego, które ukończył w roku 1953. Drugi stopień tych studiów ukończył na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie uzyskaniem magisterium z zakresu mikrobiologii w 1955 roku.

Całą swoją 45-letnią pracę zawodową Profesor związał z Wydziałem Biologii i Nauk o Ziemi UMCS, rozpoczynając ją już rok przed ukończeniem studiów na stanowisku młodszego asystenta, a od 1955 r. pracował na stanowisku asystenta. W latach 1954–1962 był

zatrudniony w Katedrze Mikrobiologii Ogólnej, później w Katedrze Mikrobiologii Szczegółowej (lata 1962–1970), Zakładzie Mikrobiologii Stosowanej (lata 1970–1995), a od 1995 roku w Zakładzie Mikrobiologii Przemysłowej, z którym był związany do czasu odejścia na emeryturę w 1999 roku. Na Wydziale BiNoZ przeszedł również wszystkie kolejne szczeble kariery zawodowej i naukowej do osiągnięcia w 1988 roku tytułu profesora zwyczajnego.

Praca magisterska Zdzisława Ilczuka dotyczyła zakażeń bakteryjnych zacierów fermentacji acetonowo-butanolowej, a jego dysertacja doktorska obejmowała badania nad mikrobiologiczną syntezą kwasu cytrynowego prowadzoną przez różne szczepy *Aspergillus niger*. Obie prace wykonał pod kierunkiem swojego nauczyciela i mistrza Prof. Stanisława Bujaka. Stopień doktora habilitowanego Profesor uzyskał na podstawie rozprawy dotyczącej genetyki szczepów *Aspergillus niger* wytwarzających kwas cytrynowy.

Zainteresowania naukowe Prof. Ilczuka dotyczyły opracowania metod i poznania mechanizmów prowadzących do wydajnej syntezy przez drobnoustroje enzymów, kwasów spożywczych i innych bioproduktów ważnych dla różnych sektorów gospodarki. Stosowane w tych badaniach techniki mutagenizacji wielostopniowej i wykorzystanie cyklu paraseksualnego do celów hybrydyzacji różnych szczepów grzyba *Aspergillus niger* przyniosły – obok wyników zawierających pewne elementy poznawcze, także określone korzyści praktyczne, dzięki możliwości uzyskiwania tym sposobem rekombinantów somatycznych (także pod postacią heterokarionów i diploidów) o nowych właściwościach kwasotwórczych lub o zwiększonej aktywności pektynolitycznej i glukoamylazowej. Wśród bardziej znaczących wyników, jakie zostały w tym względzie osiągnięte, można wymienić pozyskanie udoskonalonego mutantu *A. niger* o aktywności poligalakturonazy zwiększonej pięciokrotnie, w porównaniu ze szczepami produkcyjnymi. Kultura ta przez wiele lat stosowana była w jedynej krajowej wytwórni preparatów enzymatycznych w Jaśle. Również sposoby grzybowej syntezy preparatów glukoamylazy i oksydazy glukozy opracowane zostały technologicznie i chronione patentami. Z tego zakresu Profesor opublikował wiele oryginalnych prac doświadczalnych, które stanowią ważny wkład do rozwoju nauki. Łączny dorobek naukowy Prof. Ilczuka obejmuje ponad 170 pozycji, w tym 71 rozpraw naukowych opublikowanych w czasopismach o zasięgu krajowym i międzynarodowym. Jest również współautorem trzech patentów krajowych.

Profesor Ilczuk był również popularyzatorem wiedzy z zakresu mikrobiologii, biotechnologii i egzobiologii, czego efektem są: dwie książki (*Na tropach życia pozaziemskiego*, *Niewidzialni sojusznicy człowieka*), liczne artykuły opublikowane w prasie codziennej i periodykach popularnonaukowych, oraz wywiady i udział w popularnonaukowych audycjach radiowych i telewizyjnych. Do tej sfery zainteresowań można też zaliczyć wieloletnią współpracę Prof. Ilczuka z czasopismem *Przemysł Spożywczy*, na którego łamach opublikował łącznie 781 doniesień na temat nowości z zakresu mikrobiologii przemysłowej i biotechnologii.

Do niewątpliwych zasług Prof. Ilczuka było zorganizowanie w 1972 roku Pracowni Mikrobiologii Technicznej w obrębie Zakładu Mikrobiologii Stosowanej, której był nieformalnym kierownikiem do 1987 roku. Pracownia ta została później (1995 r.) przekształcona w Zakład Mikrobiologii Przemysłowej, którego kierownictwo objął Prof. Ilczuk.

Profesor pełnił również ważne funkcje w macierzystej Uczelni oraz działał społecznie zarówno w środowisku lubelskim jak i ogólnokrajowym. Był kierownikiem Zakładu Mikrobiologii Stosowanej (1987–1995) i Zakładu Mikrobiologii Przemysłowej (1995–1999), prodziekanem wydziału Biologii i Nauk o Ziemi (1973–1978), prorektorem ds. dydaktyki i wychowania UMCS (1978–1981), dyrektorem Instytutu Mikrobiologii (1987–1991) oraz członkiem wielu komisji senackich. W latach 1982–1990 był redaktorem naczelnym *Postępów Mikrobiologii*, a przez okres ponad 35 lat współpracował ściśle z miesięcznikiem Naczelnej Organizacji Technicznej *Przemysł Spożywczy*. W latach 1973–1994 pełnił funkcję wiceprezesa Klubu Oficerów Rezerwy im. gen. Franciszka Kleeberga przy UMCS. Był członkiem wielu towarzystw i organizacji naukowych, w tym m.in. Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, Lubelskiego Towarzystwa Naukowego, Komisji Mikrobiologii Przemysłowej i Komisji Biotechnologii Komitetu Mikrobiologii PAN, Komitetu Mikrobiologii PAN (trzy kadencje), Komisji Biotechnologii Rolnej Komitetu Technologii i Chemii Żywności PAN, Komitetu Technologii i Chemii Żywności PAN, Rady Naukowej Instytutu Przemysłu Fermentacyjnego (od 1988 r. Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego), Fellowship of International Research into Science and Technology (Anglia). Za działalność naukowo-dydaktyczną i organizacyjno-społeczną został wyróżniony licznymi nagrodami i odznaczeniami państwowymi i resortowymi, w tym: wielokrotnie nagrodami Rektora UMCS, Krzyżem Kawalerskim Orderu Odrodzenia Polski, Złotym Krzyżem Zasługi, Medalem Komisji Edukacji Narodowej, srebrnym i brązowym Medalem Zasługi dla Obronności Kraju, złotą odznaką Zasłużonego Działacza Ligii Obrony Kraju, odznaką Zasłużonego Działacza Klubu Oficerów Rezerwy, złotą odznaką Zasłużonego Pracownika Przemysłu

Spożywczego i Skupu oraz srebrną honorową odznaką Zasłużony dla Lublina.

Wśród zasług Prof. Ilczuka dotyczących działalności dydaktycznej należy w pierwszym rzędzie wymienić priorytetowe na wydziale BiNoZ autorstwo programów wykładu i ćwiczeń z mikrobiologii przemysłowej. W ciągu 45 lat swojej pracy zawodowej Profesor wykształcił liczne grono absolwentów mikrobiologii i biotechnologii. Dorobek Prof. Ilczuka w procesie kształcenia kadry naukowej obejmuje promotorstwo 2 doktoratów oraz udział (w charakterze recenzenta) w 7 przewodach doktorskich (z tego w jednym na tytuł dr h.c.), 7 habilitacyjnych i 2 na tytuły profesorskie. Z grona współpracowników profesora 2 osoby uzyskały tytuł profesora nauk biologicznych.

Profesor Ilczuk został pochowany 14 września 2011 r. na cmentarzu w Głusku. Pozostawił żonę Irenę, dwie córki Adelę i Jadwigę oraz wnuczkę Kaję.

Żegnając Profesora mogliśmy śmiało powiedzieć nad trumną te słowa:

„Był Pan dla nas wzorem nauczyciela akademickiego oraz przewodnikiem po trudnej drodze zdobywania stopni i tytułów naukowych. Dziękujemy za liczne dyskusje naukowe, inspiracje do podejmowania trudnych wyzwań, szczegółowe korekty prac naukowych i ich krytyczny osąd, cierpliwość, cenne rady i wskazówki. Miał Pan liczne grono serdecznych przyjaciół, którzy pogrążeni w żalu i smutku Pana żegnają. Żalujemy, że po przejściu na emeryturę nie mogliśmy się z Panem często spotykać z powodu ciężkich chorób i cierpień, których Pan doświadczał”.

Odszedł od nas człowiek o wysokiej kulturze osobistej, przyrodnik-humanista, świetnie władający językiem ojczystym, skromny i życzliwy ludziom. Cieszył się szacunkiem i sympatią studentów oraz pracowników i pozostanie na zawsze w naszej pamięci jako mistrz i nauczyciel.

Jan Fiedurek, Janusz Szczodrak

*Ze smutkiem przyjęliśmy wiadomość o śmierci Pana Profesora Zbigniewa Ilczuka. śp. Profesor od lat związany był z Postępami Mikrobiologii pełnił w nich funkcję stałego Recenzenta oraz w latach 1982–1990 Redaktora Naczelnego. Okres kierowania pismem był szczególnie trudny dla działalności wydawnictw w Polsce. Nakładały się wtedy na siebie zarówno kłopoty finansowe jak i materiałowe wydawanych w kraju periodyków. Prócz tego młodzi autorzy odczuwali dotkliwie izolację polskiej nauki od ogólnoswiatowego nurtu (dostępność do czasopism zagranicznych, znaczne ograniczenie kontaktów). Zasługą śp. Zbigniewa Ilczuka było przeprowadzenie Postępów Mikrobiologii przez ten bardzo trudny dla Polski okres, za co jesteśmy Mu szczególnie wdzięczni.*

Redakcja Postępów Mikrobiologii

Roman Krzysztof Górecki<sup>1\*</sup>, Jacek Karol Bardowski<sup>1</sup>

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

Wpłynęło w sierpniu 2011 r.

1. Wprowadzenie. 2. Mechanizmy oporności na wirusy bakteryjne. 2.1. Hamowanie adsorpcji faga. 2.2. Blokowanie iniekcji DNA fagowego. 2.3. Abortywna infekcja. 2.4. Restrykcja i modyfikacja (R-M). 2.5. System CRISPS/Cas. 3. Podsumowanie

### Molecular mechanisms of bacteriophage resistance of lactic acid bacteria

**Abstract:** Lactic acid bacteria (LAB) constitute a heterogeneous group of bacteria, which are found in diverse environments, such as the human body or plants, and are traditionally used to produce fermented food. Food bio-transformation in industrial processes increases the economical importance of LAB. However, conditions that exist in industrial facilities do not seem to be an optimal environment for bacteria. During technological processes, which take place in enclosed space, the intensity of physical (temperature shift), chemical (acids) or biological (phages) stress factors raises dramatically. In the dairy industry, bacteriophage contamination is regarded as a serious problem due to the disturbance or arrest of the production processes, which results in significant economical losses. It is well documented that LAB evolved defense systems against bacteriophages, which allow them to survive in harsh conditions. Therefore, bacteria used in food industry are selected for high level of bacteriophage resistance. According to the mode of action, natural bacterial defense systems against their predators were divided into 5 categories: (i) inhibition of phage adsorption, (ii) blocking of phage DNA injection, (iii) phage abortive infection systems, (iv) restriction modification systems, (v) CRISPR/Cas systems. Remarkably, the majority of known bacteriophage resistance systems are plasmid-encoded. In this context, future studies on phage resistance mechanisms as well as plasmid sequencing may have an impact on solving the problem of phage infections in the dairy industry.

1. Introduction. 2. Bacteriophage resistance mechanisms. 2.1. Inhibition of phage adsorption. 2.2. Blocking of phage DNA injection. 2.3. Phage abortive infection (Abi). 2.4. Restriction-modification (R-M). 2.5. CRISPR/Cas systems. 3. Summary

**Key words:** bacteriophage resistance, bacteriophages, lactic acid bacteria (LAB).

**Słowa kluczowe:** bakterie kwasu mlekowego, bakteriofagi, oporność na bakteriofagi

## 1. Wprowadzenie

Grupa bakterii określanych jako bakterie kwasu mlekowego lub bakterie mlekowe, w skrócie LAB (Lactic Acid Bacteria), obejmuje bakterie spokrewnione funkcjonalnie, w związku z ich zdolnością do produkcji kwasu mlekowego podczas homo- lub heterofermentacji. Według obecnej taksonomii, do grupy LAB należą rodzaje drobnoustrojów jak: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* i stanowiące trzon tej grupy bakterii, rodzaje *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* oraz *Leuconostoc* [25]. Niektórzy badacze do grupy LAB zaliczają także *Bifidobacterium*. Bakterie fermentacji mlekowej charakteryzują się prostym metabolizmem i dlatego mają wysokie wymagania pokarmowe, w zakresie czynników wzrostowych w podłożu. Prosty metabolizm oraz niewielki rozmiar genomów LAB (od 1,8 Mbpz w przypadku *Oenococcus oeni* do 3,3 Mbpz dla *L. plantarum*) [25] spowodowały duże zainteresowanie tymi bakteriami, jako organizmami modelowymi w badaniach nad „minimalnymi wymogami życiowymi” bakterii Gram-dodatnich.

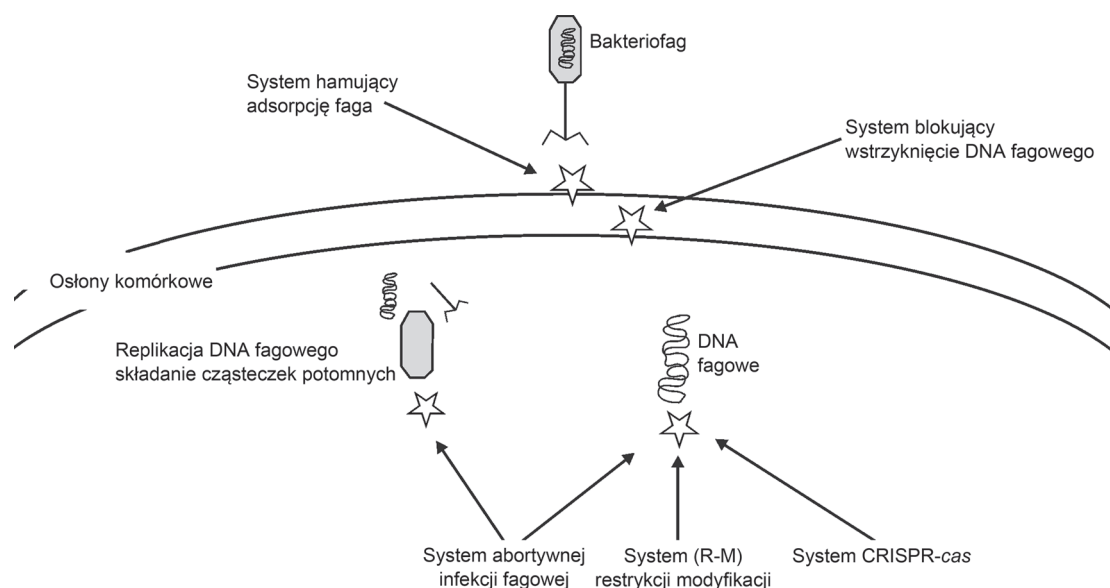
Zapotrzebowanie na substancje odżywcze ma wpływ na rozprzestrzenianie się bakterii mlekowych w przyro-

dzie. Bardzo rzadko występują one w glebie lub w wodzie, a ich naturalnymi siedliskami są: (i) mleko (*Lactobacillus lactis*, *L. bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*), (ii) zdrowe i gnijące rośliny (*Lactobacillus plantarum*, *L. delbrueckii*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*), (iii) układ pokarmowy oraz błony śluzowe ludzi i zwierząt (*Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *Streptococcus salivarius*).

Szczególnie zdolność LAB do zasiedlania i rozwoju w mleku została wykorzystana na skalę przemysłową do produkcji fermentowanych artykułów mlecznych. Ponadto bakterie kwasu mlekowego mogą rozwijać się w mięsie i winie, co zostało wykorzystane w produkcji fermentowanych wędlin (*Lactobacillus*, *Pediococcus*) oraz dla poprawy właściwości organoleptycznych wina (*O. oeni*) [25].

W procesach przemysłowych stresowe czynniki fizyczne, chemiczne oraz biologiczne występują w zwiększonym natężeniu [47]. Z tego powodu mikroorganizmy wykorzystywane w takich procesach selekcyjonowane są w kierunku zwiększonego poziomu oporności na pewne czynniki, jak: niskie pH związane z zakwaszeniem środowiska, wyższe od naturalnych stężenia metabolitów pierwotnych powstających podczas fermentacji

\* Autor korespondencyjny: Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa; tel. 22-592-12-13, e-mail: krzygor@ibb.waw.pl



Rys. 1. Podstawowe systemy oporności fagowej u LAB

oraz niskie temperatury stosowane podczas przechowywania artykułów spożywczych.

Poza czynnikami o charakterze fizycznym i chemicznym, hamującymi rozwój lub zmniejszającymi przeżywalność komórek bakteryjnych, wyróżniono również czynnik biologiczny – wirusy bakteryjne czyli bakteriofagi. Infekcje komórek bakteryjnych wywoływane są przez fagi występujące w stanie wolnym w środowisku lub przez fagi „uśpione” (fagi lizogenne, profagi) wintegrowane w chromosom bakteryjny, a indukowane w pewnych warunkach środowiskowych [42]. Wśród bakteriofagów atakujących jednego z najlepiej poznanych przedstawicieli LAB – *Lactococcus lactis* – wyróżniono 3 grupy genetyczne, c2, 936 i P335, różniące się morfologią, zakresem gospodarza oraz cyklem życiowym [44]. W obrębie grup c2 oraz 936 występują wyłącznie fagi lityczne, powodujące szybką lizę komórek gospodarza. Natomiast grupa P335 obejmuje zarówno fagi lityczne, jak i lizogenne [30]. Bakterie LAB posiadają naturalne systemy obrony przed fagami, które pod względem mechanizmu działania zostały podzielone na 5 kategorii (Rys. 1): (i) mechanizm hamujący adsorpcję, (ii) mechanizm blokujący wprowadzenie DNA do komórki, (iii) system abortywnej (przerwanej) infekcji fagowej (Abi), (iv) system restrykcji modyfikacji (R-M) oraz (v) system CRISPR/cas.

## 2. Mechanizmy oporności na wirusy bakteryjne

### 2.1. Hamowanie adsorpcji faga

Oddziaływanie cząstki fagowej z powierzchnią bakterii jest pierwszym etapem, niezbędnym do zainicjowania procesu infekcji wirusowej. W procesie adsorp-

cji faga do komórki bakteryjnej biorą udział dwa komponenty. Jednym z nich jest receptor, znajdujący się w błonie lub ścianie komórkowej, a drugim jest białko faga odpowiedzialne za rozpoznanie i związanie się z receptorem bakteryjnym tzw. białko wiążące receptor RBP (**r**eceptor-**b**inding **p**rotein) [42]. Proces adsorpcji najlepiej poznany jest u bakterii Gram-ujemnych, gdzie stwierdzono że większość interakcji fag – komórka bakteryjna zachodzi dwuetapowo. W przypadku układu bakteria *E. coli* oraz fag T5 zaobserwowano, że bakteriofag wiąże się początkowo w sposób odwracalny do lipopolisacharydów zawierających poli-mannozowy antygen O, a następnie w sposób nieodwracalny z transporterem ferrichromu, który jest rodzajem sideroforu [18].

Podobnie jest u bakterii Gram-dodatnich, gdzie fagi atakujące komórki *Lactococcus lactis*, wiążą się głównie ze specyficznymi receptorami cukrowymi, występującymi w ścianie komórkowej. Do związków najczęściej oddziałujących z fagami w pierwszym etapie przyłączenia cząstki wirusowej należą cukry: ramnoza, glukoza, galaktoza, glukozo- oraz galaktozoamina [46]. W przypadku fagów grupy c2, w celu przeprowadzenia skutecznej infekcji, niezbędne jest oddziaływanie faga z bakteryjnym białkiem PIP (**p**hage **i**nfection **p**rotein) [2]. Z kolei fagi grup P335 oraz 936 wiążą się do różnych białek błonowych [11]. Podstawowe mechanizmy hamowania przyłączania się faga do komórki bakteryjnej związane są z fizycznym maskowaniem receptora bądź ze zmianami w jego budowie lub nawet z jego brakiem w osłonach komórkowych [8]. Brak funkcjonalnego receptora może być spowodowany spontanicznymi mutacjami w materiale genetycznym, które powodują powstanie całkowicie niewrażliwego mutantu BIM (**b**acteriophage **i**nsensitive **m**utant). Brak

receptora, np. polisacharydowego, związany jest z mutacją(ami) genów zaangażowanych w jego syntezę lub transport. Niestety zaburzenia w procesie syntezy składników ściany mogą skutkować słabszym wzrostem bakterii, uniemożliwiając wykorzystanie mutantu BIM w procesach przemysłowych [13]. Poza tym mutanty BIM często ulegają rewersji do fenotypu wrażliwego. Z kolei mechanizm polegający na fizycznym maskowaniu receptora związany jest z możliwością syntezy egzopolisacharydów, które tworzą dodatkową otoczkę, ograniczając możliwość oddziaływania fagów z komórkami bakteryjnymi [33].

## 2.2. Blokowanie iniekcji DNA fagowego

Po związaniu się z receptorem, bakteriofag wprowadza DNA do komórki bakteryjnej, gdzie występuje powielenie informacji genetycznej oraz wytworzenie potomnych cząstek wirusa. Systemy oporności fagowej, które polegają na zaburzaniu etapu wprowadzania DNA do komórki mimo związania się faga z receptorem, są najslabiej poznanymi systemami oporności, zarówno u LAB jak i innych mikroorganizmów [42]. Badania przeprowadzone przez W a t a n a b e i wsp. [48], dotyczące interakcji faga PL-1 z komórkami *L. casei* wykazały, że mimo adsorpcji fagów do powierzchni komórki nie obserwowano lizy bakteryjnej. Analiza tej interakcji przy użyciu mikroskopii elektronowej pokazała, że DNA fagowe pozostaje w kapsydie, w przeciwieństwie do infekcji szczepu wrażliwego, gdzie obserwowano znaczący wzrost liczby pustych kapsydów. Jednak czynnik odpowiedzialny za blokowanie iniekcji DNA fagowego nie został zidentyfikowany w tym przypadku. M c G r a t h w badaniach z 2002 roku [32] poświęconych wirusowi Tuc2009 infekującemu komórki szczepu *L. lactis*, zidentyfikował gen chromosomalny kodujący białko nazwane Sie<sub>2009</sub>, które blokuje wprowadzanie DNA fagowego do komórki bakteryjnej. Mechanizm blokowania nie został poznany, ale przypuszcza się, że białko Sie<sub>2009</sub> oddziałuje albo z białkami błonowymi komórki, które są niezbędne do procesu iniekcji DNA, albo z białkami fagowymi odpowiedzialnymi za inicjację procesu uwalniania DNA z kapsydu [32]. Efekt działania białka Sie<sub>2009</sub> może przypominać efekt obecności represora fagów lizogennych, polegający na zapobieganiu ponownej infekcji tym samym fagiem. W przeciwieństwie do tego procesu, gen *sie*<sub>2009</sub> warunkuje oporność na różne fagi i co więcej, również na fagi z innej grupy fagowej niż ta, do której należy Tuc2009. Znane są także przykłady systemu blokowania transferu DNA fagowego do komórki, kodowane na plazmidach występujących w komórkach LAB, jak np. na plazmidzie pNP40, który ponadto koduje dwa systemy abortywnej infekcji [15].

## 2.3. System abortywnej infekcji

Kiedy DNA fagowe „ominie” opisane powyżej wczesne systemy obrony i wniknie do komórki bakteryjnej, rozpoczyna się cykl zdarzeń prowadzący do powstania potomnych cząstek fagowych. Systemy infekcji abortywnej Abi (**ab**ortive **i**nfection system) są w stanie przerwać, na różnych etapach, cykl namnażania faga. Pod pojęciem infekcji abortywnej kryją się komórkowe mechanizmy obronne, które ingerują w procesy niezbędne do powstania potomnych bakteriofagów, takie jak: replikacja wprowadzonego DNA fagowego, transkrypcja, translacja, pakowanie DNA do kapsydu oraz składanie cząstki bakteriofaga [13]. Blokowanie namnażania faga w cytoplazmie z wykorzystaniem systemu Abi wiąże się z przedwczesną śmiercią komórki bakteryjnej. Fenotypowym objawem działania systemów Abi jest zmniejszenie wydajności powstawania łysek o typowych rozmiarach dla danego bakteriofaga, na rzecz nielicznych łysek o znacznie zmniejszonej średnicy [6, 13]. Śmierć pojedynczej zainfekowanej komórki ogranicza liczbę potomnych cząstek wirusa, zmniejszając tym samym rozmiar potencjalnej infekcji fagowej w populacji bakterii. Jak podają dane źródłowe, zidentyfikowano i scharakteryzowano 22 laktokokowe systemy infekcji abortywnej, oznaczane skrótem Abi oraz kolejną literą alfabetu [17]. Jeden system Abi może wpływać na cykl życiowy fagów należących do jednej, dwóch, a nawet trzech grup fagowych. Zazwyczaj mechanizm Abi kodowany jest przez pojedynczy gen zlokalizowany na plazmidzie. Zidentyfikowano i takie mechanizmy Abi, które kodowane są przez dwa geny (AbiE, AbiG, AbiL, AbiT) [6], a nawet jak w przypadku jednego z niedawno odkrytych systemów, systemu AbiR, przez 3 geny [50]. Większość genów kodujących systemy Abi charakteryzuje się nietypowo niską zawartością par GC (24–31%) w porównaniu do średniej zawartości 35% określonej dla genomów laktokokowych, sugerując ich horyzontalny transfer z innych mikroorganizmów [13]. Większość białek systemów Abi funkcjonuje w cytoplazmie, chociaż scharakteryzowano i takie, które wykazują lokalizację transbłonową. W zależności od hamowanego etapu rozwoju faga, systemy Abi podzielono na systemy wczesne, zaburzające replikację DNA fagowego i systemy późne, ingerujące w pozostałe etapy rozwoju bakteriofaga, zachodzące po etapie replikacji DNA fagowego [13]. Systemy, takie jak AbiA, AbiD1, AbiE, AbiK, AbiP i AbiT zaburzają replikację DNA fagowego, podczas gdy systemy AbiB, AbiG i AbiU zaburzają proces transkrypcji. System AbiC powoduje obniżenie wydajności produkcji głównego białka kapsydu, a systemy AbiE, AbiL, and AbiQ zaburzają pakowanie DNA do kapsydu [17]. W przeciwieństwie do wymienionych systemów, działających na procesy replikacji, translacji czy transkrypcji, zidentyfikowany w 2007 roku system AbiZ powoduje

Cechy systemów restrykcji i modyfikacji typów I, II, III, IV

	Budowa molekularna	Aktywność enzymatyczna	Miejsce cięcia
Typ I	strukturalnie niezależne białka: HsdR, HsdM, HsdS	aktywność modyfikująca – kompleks białek HsdS, HsdM aktywność restrykcyjna – kompleks białek HsdR, HsdM, HsdS	losowe miejsce w znacznej odległości od rozpoznawanej sekwencji
Typ II	strukturalnie niezależne białka R i M	aktywność modyfikująca – białko M aktywność restrykcyjna – białko R	miejsce w obrębie lub w najbliższym otoczeniu rozpoznawanej sekwencji
Typ III	strukturalnie niezależne białka Res i Mod	aktywność modyfikująca – białko Mod aktywność restrykcyjna – kompleks białek Mod i Res	w odległości 24–27 pz od strony 3' rozpoznawanej sekwencji
Typ IV	strukturalnie niezależne białka R i M	aktywność modyfikująca – białko M aktywność restrykcyjna – białko R białko R posiada również właściwości metylazy	w stałej odległości (14–16 pz) od strony 3' rozpoznawanej sekwencji

przedwczesną lizę komórki, uniemożliwiając składanie potomnych cząstek wirusa [12]. W wielu przypadkach mechanizmy działania poszczególnych systemów nie zostały szczegółowo wyjaśnione, a jedynie powiązane z zaburzaniem przez nie etapami rozwoju faga. I tak system AbiB powoduje degradację RNA prawdopodobnie przez indukowanie nowych lub stymulowanie aktywności już istniejących RNaz [38]. W przypadku systemu AbiD1, przedstawiciela systemów zaburzających replikację DNA, stwierdzono że system ten jest indukowany przez produkt białkowy wczesnego genu (*orf1*) faga bIL66. Powstałe w wyniku indukcji ekspresji genu *abiD1* białko wiąże się z fagową nukleazą, blokując jej aktywność, która polega na usuwaniu rozgałęzionych struktur w replikowanym DNA faga [6]. Inny system, AbiZ, powoduje przedwczesną lizę komórki w wyniku zaburzenia kontroli nad właściwym momentem uaktywnienia się holiny, poprzez oddziaływanie z jej inhibitorem lub bezpośrednio z samym białkiem [12]. O ile mechanizm śmierci komórki w wyniku aktywności systemu AbiZ nie wymaga wyjaśnień, to w przypadku aktywności innych systemów Abi, mechanizmy powodujące śmierć komórek nie są tak oczywiste. W związku z faktem stwierdzenia toksyczności nadprodukowanych białek systemów infekcji abortywnej wobec komórek bakteryjnych przypuszcza się, że oddziaływania białek Abi z nukleazami czy proteazami, za pośrednictwem których wpływają one na procesy fagowej replikacji, transkrypcji i translacji, nie ograniczają się wyłącznie do procesów fagowych, ale również ingerują w procesy bakteryjne, powodując śmierć komórki [6].

#### 2.4. Systemy restrykcji modyfikacji (R-M)

W odróżnieniu od systemów infekcji abortywnej, które ingerują we wczesne etapy rozwoju faga, jak proces replikacji DNA fagowego, głównym zadaniem systemów restrykcji modyfikacji (R-M) jest rozpoznanie i degradacja w procesie trawienia endonukleolitycznego obcego, w tym DNA fagowego [40]. Zatem systemy R-M ogra-

niczają zainicjowanie procesów cyklu fagowego na terenie cytoplazmy. W przeciwieństwie do systemów Abi, w wyniku aktywacji mechanizmu R-M nie obserwuje się śmierci komórki bakteryjnej, ponieważ DNA komórkowe jest chronione przed degradacją [39]. DNA chromosomalny komórek, posiadających system restrykcji modyfikacji, jest odpowiednio zmodyfikowany w specyficznych sekwencjach przez enzym o aktywności metylotransferazy. Chroni to DNA gospodarza przed aktywnością endonukleazy restrykcyjnej, rozpoznającej te specyficzne sekwencje i zdolnej do wprowadzania nacięć w DNA [41]. Inaczej sytuacja przedstawia się w przypadku pojawienia się obcego DNA. Wnikający DNA nie posiada wzoru metylacji, zgodnego z systemem R-M występującym już w komórce, co prowadzi do jego degradacji przez enzym restrykcyjny [41].

Systemy R-M podzielono na cztery grupy, uwzględniając właściwości związane z typem rozpoznawanej sekwencji, lokalizacją miejsca cięcia w stosunku do rozpoznawanej sekwencji oraz strukturą molekularną systemu (Tab. I).

U laktokoków zidentyfikowano przedstawicieli systemów R-M, należących do trzech z 4 głównych typów: typ I, typ II oraz najmniej poznany i rozpowszechniony typ III. Stwierdzono także powszechne występowanie genów związanych z systemami R-M na plazmidach laktokokowych [13].

Pierwszy opisany u bakterii Gram-dodatnich system R-M typu III został zidentyfikowany na laktokokowym plazmidzie pND801 [43]. Typ ten składa się z dwóch enzymów: metylotransferazy, kodowanej przez gen *mod* i endonukleazy restrykcyjnej, kodowanej przez gen *res*. Metylotransferaza Mod działa niezależnie od endonukleazy Res i katalizuje reakcję metylacji specyficznych sekwencji DNA. Ponadto, podjednostka Mod jest odpowiedzialna za rozpoznanie dwóch, przeciwstawnie zorientowanych, asymetrycznych miejsc w sekwencji DNA [43]. Białko Res funkcjonuje w kompleksie z białkiem Mod, dzięki czemu reakcje modyfikacji i restrykcji endonukleolitycznej dotyczą tej samej, specyficznej sekwencji. Endonukleaza Res przecina dwuniciowy



DNA w odległości 24–27 nukleotydów poniżej niemetylowanej specyficznej sekwencji [10].

Większość poznanych systemów R-M u bakterii *Lactococcus* należy do typu II [13]. Systemy te zazwyczaj wymagają prostych kofaktorów i charakteryzują się prostą organizacją genetyczną. Klasyczne systemy R-M typu II zawierają dwa geny, kodujące białka o niezależnych aktywnościach – endonukleazy i metylotransferazy. Endonukleaza rozpoznaje specyficzną, palindromową sekwencję DNA o długości od 4 do 8 nukleotydów i powoduje przecięcie obu nici DNA, a metylotransferaza rozpoznaje oraz metyluje tę samą sekwencję, co chroni DNA przed aktywnością endonukleazy [39]. Metylazy systemu R-M typu II wymagają kofaktora w postaci S-adenozylometioniny, z którego przenoszą grupę metylową na nukleotydy w rozpoznawanej sekwencji. Cechą charakterystyczną endonukleaz typu II jest fakt, że przecięcie nici DNA ma miejsce w obrębie lub w stałej odległości kilku nukleotydów, od miejsca rozpoznawanego przez system R-M oraz, że w odróżnieniu od endonukleaz typu I i III, endonukleazy typu II nie wymagają energii w postaci ATP do przeprowadzenia reakcji [39]. Endonukleazy tej grupy działają jako homodimery, które wymagają kofaktora w postaci jonów magnezu ( $Mg^{2+}$ ) [35]. Nie wszystkie endonukleazy typu II funkcjonują według przedstawionego schematu. W celu uwzględnienia ich zróżnicowania strukturalno-funkcjonalnego wyodrębniono następujące podtypy: IIB, IIE, IIF, IIG, IIM, IIS i IIT [39]. Endonukleazy podtypu IIS działają zazwyczaj jako monomery, rozpoznają asymetryczne sekwencje i przecinają DNA w określonej odległości od rozpoznawanego miejsca [45]. Odmienność endonukleaz podtypów IIG i IIB polega na tym, że obie aktywności enzymatyczne (metylazy i endonukleazy) znajdują się na jednym łańcuchu białkowym. Ponadto, do swojej aktywności enzymatycznej, wymagają dodatkowego kofaktora w postaci S-adenozylometioniny. Dodatkowo, endonukleazy podtypu IIB charakteryzują się tym, że przecinają każdą nić DNA po obu stronach rozpoznawanej sekwencji. Zatem endonukleazy podtypu IIB usuwają z nici DNA krótkie fragmenty, zawierające rozpoznawaną przez nie sekwencję [39]. Odrębność podtypu IIM sprowadza się do faktu, że trawienie DNA następuje po rozpoznaniu specyficznej sekwencji, która w przeciwieństwie do pozostałych systemów R-M jest zmetylowana [27].

Warto podkreślić, że istnieje hipoteza zakładająca, że poprzez fuzję genów podjednostek Mod i Res typu III rozpoczęła się ewolucja systemu R-M typu IV. Dodatkowo, uwzględniając właściwości enzymatyczne endonukleaz systemów Eco57I i BseMII typu IV wysunięto hipotezę, że są one formą pośrednią w toku ewolucji pomiędzy enzymami typu III i typu IIS [23]. Jak do tej pory, typ IV systemów R-M jest najsłabiej poznanym typem, głównie ze względu na małą liczebność przedstawicieli tej grupy.

Typ I restrykcji modyfikacji jest jednym z najbardziej złożonych systemów pod względem biochemicznym jak i genetycznym. Składa się z 3 białek, które warunkują restrykcję (HsdR lub R), modyfikację (HsdM lub M) i rozpoznawanie specyficznej sekwencji w DNA (HsdS lub S) [36]. Podobnie jak przedstawiciele innych typów, także systemy R-M typu I wymagają do prawidłowego działania kofaktorów w postaci jonów  $Mg^{2+}$  oraz donora grup metylowych – S-adenozylometioniny [36]. W odróżnieniu od endonukleaz typu II, endonukleazy typu I do przecięcia nici DNA potrzebują energii uzyskiwanej podczas hydrolizy ATP. W celu uzyskania funkcjonalnego kompleksu o aktywności endonukleolitycznej niezbędne jest oddziaływanie ze sobą wszystkich trzech podjednostek (R, M i S) w stosunku stechiometrycznym 2:2:1, podczas gdy dla aktywności metylotransferazy wystarczające są jedynie oddziaływania dwóch podjednostek M i jednej S [37]. Poza złożoną strukturą funkcjonalnych kompleksów enzymatycznych, innymi cechami wyróżniającymi typ I są: budowa rozpoznawanej sekwencji oraz miejsce cięcia DNA. Sekwencja nukleotydowa rozpoznawana przez enzymy typu I jest asymetryczna i złożona z dwóch komponentów, jednego o długości 3–4 pz i drugiego o długości 4–5 par zasad, przedzielonych niespecyficzną sekwencją 6–8 pz [36]. Kompleks białek  $R_2M_2S_1$ , o specyficzności endonukleazy, tnie DNA w przypadkowym miejscu, w odległości dochodzącej nawet do kilku tysięcy par zasad od rozpoznawanej sekwencji. Oddziaływanie kompleksów enzymatycznych typu I z DNA jest ściśle uwarunkowane budową białka HsdS. Podjednostka S zawiera tak zwane regiony konserwowane, na końcach białka i w centralnej części, odpowiedzialne za interakcje z podjednostkami M [26] oraz dwie domeny zmienne, oddziałujące z DNA i rozpoznające specyficzne sekwencje nukleotydowe. System R-M typu I, występujący u *Enterobacteriaceae* został podzielony na 4 podtypy (IA, IB, IC, i ID) na podstawie testu krzyżowej hybrydyzacji pomiędzy genami i krzyżowej reakcji kodowanych przez nie białek, z wykorzystaniem przeciwciał. Testy komplementacji wykazały, że w obrębie podtypów może dochodzić do wymiany podjednostek systemu R-M, ale już pomiędzy podjednostkami różnych podtypów wymiany takie nie zachodzą [14].

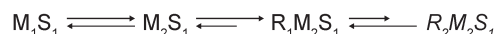
Spośród czterech typów systemów R-M, typ I, a przede wszystkim podtyp IC, wydaje się być najbardziej rozpowszechniony wśród bakterii LAB. W chromosomach szczepów *L. lactis* IL1403 oraz *L. cremoris* MG1363 zidentyfikowano cały operon *hsdRMS* tego typu, a dodatkowe podjednostki S, rozpoznające nową sekwencję, kodowane są przez geny zlokalizowane na plazmidach [4, 5, 16, 49].

Nowy system R-M wnikając do komórki determinuje nowy wzór metylacji, którego komórka jeszcze nie posiada. Zatem DNA chromosomalny może być nara-

żony na działanie endonukleaz tego systemu. Zakłada się, że DNA komórkowy mógłby być chroniony przed endonukleazą nowego systemu w wystarczającym stopniu, poprzez rozdzielenie w czasie aktywności metylazy i endonukleazy lub poprzez wyraźne osłabienie aktywności endonukleolitycznej [36]. W takiej sytuacji istotną rolę odgrywają mechanizmy kontroli ekspresji genów, kodujących metylotransferazy i endonukleazy.

W gronie systemów R-M typu II, kodującego dwa oddzielne enzymy odpowiedzialne za modyfikację i degradację DNA, wyróżniono kilka mechanizmów regulacji ekspresji poszczególnych genów systemu. Metylaza systemów MspI oraz LlaDII są nadprodukowane w początkowej fazie po wniesieniu do komórki, podczas gdy endonukleazy są produkowane konstytutywnie na niskim poziomie. Metylaza tych systemów wiążąc się do sekwencji własnego promotora, dzięki obecności motywu HTH umożliwiającemu interakcje z DNA, powodują wyciszenie ekspresji własnych genów [7]. Początkowe zwiększenie ilości metylazy w komórce umożliwia kompletną modyfikację DNA chromosomalnego, chroniąc go przed aktywnością syntetyzowanych endonukleaz. Nie wszystkie systemy typu II posiadają działający w ten sposób mechanizm regulacji. Niektóre systemy, jak np. system Kpn2I z *Klebsiella*, koduje dodatkowe białko regulacyjne, białko C. W tym systemie, podobnie jak w systemie MspI, endonukleaza jest produkowana konstytutywnie na niskim poziomie, podczas gdy poziom biosyntezy białka metylotransferazy oraz białka regulatorowego C jest wysoki. Wraz ze wzrostem stężenia białka C następuje wyciszenie transkrypcji genów kodujących zarówno białko C, jak i białko metylotransferazy [29].

W przypadku systemów typu I nie stwierdzono regulacji ekspresji genów podjednostek związanych z restrykcją i modyfikacją DNA. Zaobserwowano natomiast zależność efektywności nabycia nowego systemu od funkcji kodowanych przez komórkę biorcy [36]. I tak, stwierdzono zaangażowanie ATP-zależnej proteazy jak ClpXP w proces nabycia nowego systemu R-M. Proteaza ClpXP jest odpowiedzialna za okresową utratę restrykcji (w skrócie RA restriction alleviation) poprzez degradację proteolityczną nukleaz systemów R-M typu I. Ekspresja genów tych proteaz jest indukowana przez obecność fragmentów DNA w komórce. Degradacja podjednostki R odbywa się wyłącznie, gdy tworzy ona kompletny holoenzym i to w dodatku związany z niemetylowanym DNA. Przypuszcza się, że również w przypadku podtypów IC i ID mechanizm RA odgrywa pewną rolę w zainstalowaniu się systemu R-M w komórce. Nabycie nowego systemu podtypu IC bardzo często ogranicza się do uzyskania – w procesie koniugacji – plazmidu zawierającego gen (*hdsS*) nowej podjednostki S, warunkującej specyficzność systemu. Opóźnienie wystąpienia aktywności endonukleolitycz-



Rys. 2. Schemat interakcji podjednostek typu IC systemów R-M. Czcionką pogrubioną oznaczono kompleksy enzymatyczne o aktywności metylotransferazy, kursywą o aktywności endonukleolitycznej. Długość strzałek wskazuje kierunek przesunięcia szybkości reakcji.

nej uważa się za najważniejszy mechanizm, umożliwiający zainstalowanie się nowego systemu w komórce. U podstaw tego mechanizmu leżą interakcje pomiędzy podjednostkami systemu R-M podtypu IC oraz ich stężenie w komórce [36] (Rys. 2). I tak, funkcjonalny kompleks  $M_2S_1$ , o aktywności metylotransferazy, ulega łatwej dysocjacji do niefunkcjonalnego, ale bardzo stabilnego kompleksu  $M_1S_1$ . Zatem, wzrost stężenia podjednostki M jest konieczny w celu odtwarzania funkcjonalnego kompleksu metylazy. Należy zwrócić uwagę, że do funkcjonalnego kompleksu metylazy bardzo trwale przyłącza się podjednostka R. Postuluje się, że kompleks o składzie stechiometrycznym  $R_1M_2S_1$  jest nadal aktywną metylotransferazą [22]. Natomiast, aby otrzymać funkcjonalny holoenzym ( $R_2M_2S_1$ ) o aktywności endonukleolitycznej, niezbędne jest przyłączenie drugiej podjednostki R. Proces ten powoduje jednak zmniejszenie stabilności całego układu białek, skutkującej łatwym oddysocjowaniem podjednostki R. W związku z tym, w celu przesunięcia reakcji w kierunku powstawania funkcjonalnego holoenzymu nukleazy niezbędna jest akumulacja podjednostki R w cytoplazmie. W ten sposób następuje opóźnienie w powstaniu funkcjonalnego kompleksu o aktywności endonukleolitycznej, co daje czas na modyfikację DNA chromosomalnego i zapobiega jego degradacji [22].

## 2.5. System CRISPR/Cas

Spośród opisanych powyżej systemów ochrony komórki bakteryjnej przed bakteriofagami jedynie system R-M jest bezpośrednio skierowany przeciwko wnikającym elementom genetycznym. Niedawno zidentyfikowano jednak kolejny system (system CRISPR/Cas), który został określony mianem „systemu immunologicznego” *Bacteria* i *Archaea*, wymierzony przeciwko DNA fagowemu lub plazmidowemu [20].

Pierwsze zmiany o ciągu zgrupowanych, regularnie rozmieszczonych, krótkich sekwencji palindromicznych CRISPR (clustered, regularly interspaced short palindromie repeats) odnotowano już w latach 80 ubiegłego stulecia, kiedy to I s h i n o i wsp. [21] zidentyfikowali krótkie powtórzenia w genomie *E. coli*. Natomiast na początku XXI wieku scharakteryzowano, często zlokalizowane w otoczeniu kaset CRISPR, geny *cas* (CRISPR-associated genes) [24]. Trakty CRISPR (Rys. 3) składają się z dwóch typów elementów: z powtórzeń sekwencji (direct repeats) i rozdzielających je, unikatowych sekwencji łącznikowych zwanych również sekwencjami



Rys. 3. Schematyczny obraz regionu CRISPR/*cas*

Szarymi kołami zaznaczono sekwencje powtórzone, a białymi prostokątami – sekwencje rozdzielające. Zbieżne strzałki symbolizują sekwencje palindromiczne w obrębie sekwencji powtórzonej.

rozdzielającymi (spacers). Wielkość powtórzeń CRISPR waha się w przedziale 23–47 pz, podczas gdy wielkość elementów rozdzielających zawiera się w przedziale 21–72 pz [20]. Poddając analizie genomy bakterii kwasu mlekowego udokumentowano, że jeden ciąg CRISPR zbudowany jest średnio z 50 jednostek, powtórzenie-sekwencja rozdzielająca [19]. Na uwagę zasługuje fakt, że powtórzenia znajdujące się w jednym locus są ściśle konserwowane [20]. Sytuacja przedstawia się odmiennie w przypadku elementów rozdzielających sekwencje powtórzeń. Otóż sekwencje rozdzielające w obrębie jednego regionu CRISPR są bardzo różne, a ponadto wysoce zmienne.

W 2005 roku, w badaniach *in silico*, wykazano homologie pomiędzy sekwencjami rozdzielającymi kaset CRISPR, a sekwencjami plazmidów lub wirusów bakteryjnych [34]. Dodatkowo zaobserwowano, że bakteriofagi, których krótkie sekwencje genomowe odnajdywano w kasetach CRISPR w postaci sekwencji rozdzielających, nie były zdolne do zainfekowania komórek bakteryjnych posiadających te kasety. Te obserwacje pozwoliły postawić hipotezę, że regiony CRISPR mogą stanowić adaptacyjny system immunologiczny przeciwko obcym elementom genetycznym, w którym sekwencje rozdzielające odpowiedzialne są za specyficzność systemu [24].

Barangou i wsp. zaobserwowali, że wrażliwy na fagi mutant BIM (**b**acteriophage **i**nsensitive **m**utant) *Streptococcus thermophilus* nabył od 1 do 4 typów jednostek rozdzielających o sekwencji identycznej z DNA zastosowanych fagów [3]. Ponadto wykazano, że poziom oporności był skorelowany nie tylko z nabyciem nowych elementów rozdzielających, ale również z ich liczbą. Badania te dowiodły również, że w nabyciu sekwencji rozdzielającej uczestniczą białka kodowane przez geny *cas*. Zaobserwowano, że powtarzające się infekcje fagowe sprzyjały wprowadzaniu sekwencji rozdzielających do odpowiednich regionów CRISPR, w ocalałych komórkach [9]. Ponadto badania ekspresji genów u *Thermus thermophilus* podczas infekcji fagowej wykazały nadekspresję regionu CRISPR, genów *cas* i genu receptora cAMP, wskazując na istnienie mechanizmu wykrywania infekcji [1]. Geny *cas* kodują różnorodną grupę białek, które zawierają funkcjonalne domeny typowe dla nukleaz, helikaz, polimeraz i białek wiążących kwasy nukleinowe [20]. Większość znanych białek Cas oddziałuje z DNA, ale znane są także takie, które wchodzi w interakcje z RNA. Wydaje się, że podczas infekcji fagowej maszynaria enzymatyczna CRISPR/Cas

wybiera sekwencje z genomu faga i wprowadza je, jako nowe elementy rozdzielające. Chociaż dokładny mechanizm decydujący o tym, które fragmenty DNA fagowego lub plazmidowego zostaną włączone do regionów CRISPR nie jest znany, to selekcja fragmentów obcego DNA nie jest przypadkowa. Na modelu badawczym *S. thermophilus* pokazano, że integrowane z chromosomem bakteryjnym w regionach CRISPR fragmenty DNA fagowego zawierają krótkie motywy sekwencji nukleotydowej (NNAGAAW) [9].

Ciągi CRISPR charakteryzują się dużą zmiennością w obrębie gatunku i wydają się być szczepowo specyficzne z uwagi na możliwość wbudowywania nowych elementów rozdzielających sekwencje powtórzone. Ta prawidłowość stanowi kolejny marker wykorzystywany dla ustalenia pokrewieństwa filogenetycznego wśród bakterii [20].

Nie tylko mechanizm nabycia oporności warunkowanej systemem CRISPR wobec obcych elementów genetycznych (genom fagowy lub plazmid) nie został w pełni wyjaśniony. Również mechanizm oporności wobec fagów warunkowany przez elementy kaset CRISPR wymaga wielu badań. Jak dotąd, ponad wszelką wątpliwość stwierdzono, że w ochronie komórki bakteryjnej przed infekcją fagową biorą udział białka kodowane przez geny *cas* oraz sekwencje rozdzielające, znajdujące się w kasetach CRISPR [3]. Wykazano, że to właśnie te elementy składowe kaset CRISPR są zaangażowane w specyficzność odpowiedzi obronnej. Mimo, że do zainicjowania oporności niezbędne są wyłącznie elementy rozdzielające, to transkrypcji ulega cała kaset CRISPR. Sekwencja liderowa CRISPR (Rys. 3), o wielkości dochodzącej do 500 nukleotydów, jest bogata w pary A/T i kończy się wraz z pojawieniem się pierwszej sekwencji powtórzonej. Sugeruje się, że działa ona jako promotor dla regionu CRISPR [28]. W procesie transkrypcji powstaje jeden długi transkrypt (pre-crRNA lub pre-CRISPR RNA) obejmujący sekwencje liderową oraz wszystkie jednostki składające się z sekwencji powtórzonej i sekwencji rozdzielających. Większość sekwencji powtórzonych zawiera regiony palindromiczne. Te krótkie sekwencje umożliwiają powstanie stabilnych, konserwowanych struktur drugorzędowych w jednociowym RNA, powstającym w procesie transkrypcji regionu CRISPR. Transkrypt pre-crRNA jest następnie procesowany przez trawienia endonukleolityczne na fragmenty, tworząc drabinkę produktów pośrednich, w tym produktów dojrzałych. Miejsce cięcia następuje poniżej ostatniego nukleotydu tworzącego strukturę szpilki do włosów. Akumulacja produktów procesowania pre-crRNA może wskazywać na rolę dojrzałych fragmentów crRNA dla oporności, na etapie specyficznego rozpoznawania wnikających, obcych elementów genetycznych. Model mechanizmu oporności typu CRISPR/Cas zaproponowany dla *E. coli* zakłada, że crRNA

oddziałuje z białkami Cas, w tym białkiem Cas3, które zawiera domeny charakterystyczne dla nukleaz i helikaz DNA. Prawdopodobnie crRNA rozpoznaje odpowiednie sekwencje w genomie faga, dając tym samym sygnał do zapoczątkowania degradacji DNA, przez zasocjowany z DNA kompleks białek Cas [31].

Zaangażowanie krótkich fragmentów RNA, w proces oporności fagowej związanej z systemem CRISPR, może wskazywać na pewne analogie z eukariotycznym mechanizmem działania RNA interferencyjnego (RNAi). Jednak podstawowa, różnica pomiędzy działaniem RNAi, a kompleksem crRNA/Cas, dotyczy maszyneryi enzymatycznej. Ponadto wprowadzenie powtórzeń do genomu bakteryjnego działa jak pamięć genetyczna, zabezpieczająca komórkę bakteryjną przed ponowną infekcją. Zatem powyższe fakty wskazują, że adaptacyjny system CRISPR/Cas imituje w większym stopniu działanie systemu immunologicznego kręgowców, niż model działania RNAi [20].

Systemy oporności na bakteriofagi typu CRISPR/Cas są rozpowszechnione w świecie mikroorganizmów. Znalezione je prawie u wszystkich znanych przedstawicieli *Archaea* i w około 40% zsekwencjonowanych genomach bakteryjnych, w tym również genomach bakterii fermentacji mlekowej [19]. Spośród 102 kompletnych chromosomalnych lub plazmidowych sekwencji nukleotydowych, pochodzących od bakterii LAB, sekwencje CRISPR znaleziono w 47 genomach i jednym plazmidzie [19]. Dalsze badania pozwoliły zidentyfikować powtórzenia CRISPR u przedstawicieli rodzajów: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Symbiobacterium* i *Bifidobacterium*. Zaskoczeniem okazał się brak powtórzeń CRISPR u przedstawicieli jednego z najlepiej scharakteryzowanych rodzajów bakterii mlekowych – rodzaju *Lactococcus*. Co ciekawe, także w genomach dwóch innych przedstawicieli LAB z rodzajów *Leuconostoc* i *Oenococcus* również nie zidentyfikowano elementów CRISPR [19].

### 3. Podsumowanie

W procesach biotechnologicznych bakterie LAB tworzą ogromne populacje skoncentrowane w ograniczonej przestrzeni. Stąd też pojawienie się czynnika szkodliwego, jakim są bakteriofagi, może spowodować lub całkowicie przerwać proces technologiczny, powodując poważne straty ekonomiczne [42].

Z tego względu w procesach przemysłowych, np. do produkcji jogurtów, serów oraz deserów mlecznych, wykorzystywane są bakterie LAB, które posiadają szczególnie wydajne mechanizmy ochrony przed bakteriofagami.

Warto nadmienić, że większość mechanizmów oporności fagowej kodowana jest plazmidowo [13]. Zatem

badania mechanizmów oporności, jak również biologii plazmidów bakterii LAB mogą przyczynić się w przyszłości do rozwiązania problemów napotykanych w czasie prowadzenia procesów przemysłowych.

### Piśmiennictwo

1. Agari Y., Sakamoto K., Tamakoshi M., Oshima T., Kuramitsu S., Shinkai A.: Transcription profile of *Thermus thermophilus* CRISPR systems after phage infection. *J. Mol. Biol.* **395**, 270–281 (2009)
2. Babu K.S., Spence W.S., Monteville M.R., Geller B.L.: Characterization of a cloned gene (*pip*) from *Lactococcus lactis* required for phage infection. *Dev. Biol. Stand.* **85**, 569–575 (1995)
3. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P.: CRISPR provides resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, **315**, 1709–1712 (2007)
4. Bolotin A., Wincker P., Mauger S., Jaillon O., Malarme K., Weissenbach J., Ehrlich S.D., Sorokin A.: The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* **11**, 731–753 (2001)
5. Boucher I., Emond E., Parrot M., Moineau S.: DNA sequence analysis of three *Lactococcus lactis* plasmids encoding phage resistance mechanisms. *J. Dairy Sci.* **84**, 1610–1620 (2001)
6. Chopin M.C., Chopin A., Bidnenko E.: Phage abortive infection in lactococci: variations on a theme. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 473–479 (2005)
7. Christensen L.L., Josephsen J.: The methyltransferase from the LlaDII restriction-modification system influences the level of expression of its own gene. *J. Bacteriol.* **186**, 287–295 (2004)
8. Coffey A., Ross R.P.: Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains: molecular analysis to application. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **82**, 303–321 (2002)
9. Deveau H., Barrangou R., Garneau J.E., Labonté J., Fremaux C., Boyaval P., Romero D.A., Horvath P., Moineau S.: Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* **190**, 1390–1400 (2008)
10. Dryden D.T., Murray N.E., Rao D.N.: Nucleoside triphosphate-dependent restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* **29**, 3728–3741 (2001)
11. Dupont K., Janzen T., Vogensen F.K., Josephsen J., Stuer-Lauridsen B.: Identification of *Lactococcus lactis* genes required for bacteriophage adsorption. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5825–5832 (2004)
12. Durmaz E., Klaenhammer T.R.: Abortive phage resistance mechanism *AbiZ* speeds the lysis clock to cause premature lysis of phage-infected *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **189**, 1417–1425 (2007)
13. Forde A., Fitzgerald G.F.: Bacteriophage defence systems in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **76**, 89–113 (1999)
14. Fuller-Pace F.V., Cowan G.M., Murray N.E.: *EcoA* and *EcoE*: alternatives to the *EcoK* family of type I restriction and modification systems of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **186**, 65–75 (1985)
15. Garvey P., Hill C., Fitzgerald G.F.: The lactococcal plasmid pNP40 encodes a third bacteriophage resistance mechanism, one which affects phage DNA penetration. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 676–679 (1996)
16. Górecki R.K., Koryszewska-Bagińska A., Gołębiowski M., Żylińska J., Grynberg M., Bardowski J.: Adaptive potential of the *Lactococcus lactis* IL594 strain encoded in its 7 plasmids. *PLoS ONE*, **6**(7): e22238 (2011)

17. Haaber J., Moineau S., Fortier L.C., Hammer K.: AbiV, a novel antiphage abortive infection mechanism on the chromosome of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 6528–6537 (2008)
18. Heller K., Braun V.: Polymannose O-antigens of *Escherichia coli*, the binding sites for the reversible adsorption of bacteriophage T5+ via the L-shaped tail fibers. *J. Virol.* **41**, 222–227 (1982)
19. Horvath P., Cou  t  -Monvoisin A.C., Romero D.A., Boyaval P., Fremaux C., Barrangou R.: Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. *Int. J. Food Microbiol.* **131**, 62–70 (2009)
20. Horvath P., Barrangou R.: CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, **327**, 167–170 (2010)
21. Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A.: Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* **169**, 5429–5433 (1987)
22. Janscak P., Dryden D.T., Firman K.: Analysis of the subunit assembly of the type IC restriction-modification enzyme EcoR124I. *Nucleic Acids Res.* **26**, 4439–4445 (1998)
23. Jurenaite-Urbanaviciene S., Kazlauskienė R., Urbelyte V., Maneliene Z., Petrusyte M., Lubys A., Janulaitis A.: Characterization of BseMII, a new type IV restriction-modification system, which recognizes the pentanucleotide sequence 5'-CTCAG(N)(10/8). *Nucleic Acids Res.* **29**, 895–903 (2001)
24. Karginov F.V., Hannon G.J.: The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea. *Mol. Cell.* **37**, 7–19 (2010)
25. Klaenhammer T., R. Siezen i wsp.: Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **82**, 29–58 (2002) (praca jest dziełem 36 autorów)
26. Kneale G.G.: A symmetrical model for the domain structure of type I DNA methyltransferases. *J. Mol. Biol.* **243**, 1–5 (1994)
27. Lacks S., Greenberg B.: A deoxyribonuclease of *Diplococcus pneumoniae* specific for methylated DNA. *J. Biol. Chem.* **250**, 4060–4066 (1975)
28. Lillest  l R.K., Shah S.A., Br  gger K., Redder P., Phan H., Christiansen J., Garrett R.A.: CRISPR families of the crenarchaeal genus *Sulfolobus*: bidirectional transcription and dynamic properties. *Mol. Microbiol.* **72**, 259–272 (2009)
29. Lubys A., Jurenaite S., Janulaitis A.: Structural organization and regulation of the plasmid-borne type II restriction-modification system Kpn2I from *Klebsiella pneumoniae* RFL2. *Nucleic Acids Res.* **27**, 4228–4234 (1999)
30. Madera C., Monjard  n C., Su  rez J.E.: Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fate of *Lactococcus lactis* bacteriophages in dairies. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 7365–7371 (2004)
31. Makarova K.S., Aravind L., Grishin N.V., Rogozin I.B., Koonin E.V.: A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic Acids Res.* **30**, 482–496 (2002)
32. McGrath S., Fitzgerald G.F., van Sinderen D.: Identification and characterization of phage-resistance genes in temperate lactococcal bacteriophages. *Mol. Microbiol.* **43**, 509–520 (2002)
33. Mills S., McAuliffe O.E., Coffey A., Fitzgerald G.F., Ross R.P.: Plasmids of lactococci – genetic accessories or genetic necessities? *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 243–273 (2006)
34. Mojica F.J., D  ez-Villase  nor C., Garc  a-Mart  nez J., Soria E.: Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.* **60**, 174–182 (2005)
35. Mruk I., Cichowicz M., Kaczorowski T.: Characterization of the LlaCI methyltransferase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* W15 provides new insights into the biology of type II restriction-modification systems. *Microbiology*, **149**, 3331–3341 (2003)
36. Murray N.E.: Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 412–434 (2000)
37. O'Sullivan D., Twomey D.P., Coffey A., Hill C., Fitzgerald G.F., Ross R.P.: Novel type I restriction specificities through domain shuffling of HsdS subunits in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* **36**, 866–875 (2000)
38. Parreira R., Ehrlich S.D., Chopin M.C.: Dramatic decay of phage transcripts in lactococcal cells carrying the abortive infection determinant AbiB. *Mol. Microbiol.* **19**, 221–230 (1996)
39. Pingoud A., Jeltsch A.: Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res.* **29**, 3705–3727 (2001)
40. Seegers J.F., van Sinderen D., Fitzgerald G.F.: Molecular characterization of the lactococcal plasmid pCIS3: natural stacking of specificity subunits of a type I restriction/modification system in a single lactococcal strain. *Microbiology*, **146**, 435–443 (2000)
41. Smith M.A., Read C.M., Kneale G.G.: Domain structure and subunit interactions in the type I DNA methyltransferase M.EcoR124I. *J. Mol. Biol.* **314**, 41–50 (2001)
42. Sturino J.M., Klaenhammer T.R.: Bacteriophage defense systems and strategies for lactic acid bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.* **56**, 331–378 (2004)
43. Su P., Im H., Hsieh H., Kang A.S., Dunn N.W.: LlaFI, a type III restriction and modification system in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 686–693 (1999)
44. Szczepańska A.K., Hejnowicz M.S., Kofakowski P., Bardowski J.: Biodiversity of *Lactococcus lactis* bacteriophages in Polish dairy environment. *Acta. Biochim. Pol.* **54**, 151–158 (2007)
45. Szybalski W., Kim S.C., Hasan N., Podhajaska A.J.: Class-II restriction enzymes – a review. *Gene*, **100**, 13–26 (1991)
46. Valyasevi R., Sandine W.E., Geller B.L.: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* C2 bacteriophage sk1 receptor involving rhamnose and glucose moieties in the cell wall. *J. Dairy Sci.* **77**, 1–6 (1994)
47. van de Guchte M., Serror P., Chervaux C., Smokvina T., Ehrlich S.D., Maguin E.: Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **82**, 187–216 (2002)
48. Watanabe K., Ishibashi K., Nakashima Y., Sakurai T.: A phage-resistant mutant of *Lactobacillus casei* which permits phage adsorption but not genome injection. *J. Gen. Virol.* **65**, 981–986 (1984)
49. Wegmann U., J. Kok i wsp.: Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *J. Bacteriol.* **189**, 3256–3270 (2007) (praca jest dziełem 12 autorów)
50. Yang J.M., Deurraza P.J., Matvienko N., O'Sullivan D.J.: Involvement of the LlaKR2I methylase in expression of the AbiR bacteriophage defense system in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis KR2. *J. Bacteriol.* **188**, 1920–1928 (2006)



# STRUKTURA GENOMU *BORRELIA BURGENDORFERI*; INFORMACJA GENETYCZNA ZAWARTA W POSZCZEGÓLNYCH REPLIKONACH SKŁADOWYCH

Ewa Furmańczyk<sup>1</sup>, Mirosława Włodarczyk<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego  
ul. I. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

Wpłynęło w lipcu 2011 r.

1. Wprowadzenie. 2. Genomy prokariotyczne. 3. *Borrelia burgdorferi* – ogólna charakterystyka. 4. Genom *Borrelia burgdorferi*. 4.1. Chromosom. 4.2. Plazmidy. 4.2.1. Plazmid cp26. 4.2.2. Rodzina plazmidów cp32. 4.2.3. Plazmid lp56. 4.2.4. Plazmid lp54. 4.2.5. Plazmid lp36. 4.2.6. Plazmid lp25. 4.2.7. Plazmidy z grupy lp28. 4.2.8. Pozostałe replikony liniowe. 5. Pangenom *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. 6. *Borrelia burgdorferi* a inne gatunki *Borrelia*. 7. Ewolucja i współistnienie replikonów genomu *B. burgdorferi*. 8. Podsumowanie

## Genome structure of *Borrelia burgdorferi*; genetic information in individual replicons

**Abstract:** *Borrelia burgdorferi* is an etiological agent of Lyme disease. Genome of this bacterium was sequenced in 1997. It contains of linear chromosome and at least 21 linear and circular plasmids. The chromosome appears to be very constant in gene order and content across the genus. Plasmids, which contain many paralogous sequences and pseudogenes, carry most of the genes that encode surface proteins that interact with *B. burgdorferi* hosts. Plasmid content varies among strains but one plasmid – cp26 is always present. It suggests that cp26 genes encode functions critical for survival. One of them is *resT* which is necessary for replication of linear structures including chromosome. This review presents short characteristic of these structures, their role in *B. burgdorferi* life cycle and their maintenance across different strains and the whole genus.

1. Introduction. 2. Prokaryotic genomes. 3. *Borrelia burgdorferi* – general information. 4. Genome of *Borrelia burgdorferi* B31. 4.1. The chromosome. 4.2. Plasmids. 4.2.1. cp26 plasmid. 4.2.2. cp32 plasmid family. 4.2.3. lp56 plasmid. 4.2.4. lp54 plasmid. 4.2.5. lp36 plasmid. 4.2.6. lp25 plasmid. 4.2.7. lp28 plasmid group. 4.2.8. The other linear replicons. 5. Pangenome of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. 6. *Borrelia burgdorferi* against other *Borrelia* species. 7. Evolution and coexistence of different replicons of *B. burgdorferi* genome. 8. Summary

**Słowa kluczowe:** *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia*, chromosom, genom, plazmid

**Key words:** *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia*, chromosome, genome, plasmid

## 1. Wprowadzenie

Termin genom został po raz pierwszy użyty, jak podają Lederberg i McCray w artykule z *The Scientists* [44], przez Hansa Winklera w 1920 roku. Zaproponował go „for the haploid chromosome set, which, together with the pertinent protoplasm, specifies the material foundation of species”, co można swobodnie przetłumaczyć jako pojedynczy zestaw chromosomów, który, wraz z otaczającą go peryplazmą, stanowi o formie istnienia gatunku.

Obecnie genom definiuje się jako całość informacji genetycznej zapisanej w DNA organizmu odpowiedzialnej za jego strukturę i funkcjonowanie oraz przekazywanie cech potomnym pokoleniom. Nie jest poprawne nazywanie genomu kolekcją wszystkich genów organizmu, gdyż na kompletną informację genetyczną składają się nie tylko geny, ale także regiony niekodujące i niebędące częściami genów, lecz istotne dla regulacji ich funkcjonowania.

Tak sformułowana ogólna definicja stosuje się do genomów organizmów eukariotycznych i prokariotycznych

oraz wirusów, w których przypadku informacja genetyczna może być zawarta w DNA lub RNA. Mimo pełnienia jednakowej funkcji, strukturalna organizacja genomu organizmów eukariotycznych i prokariotycznych jest zdecydowanie odmienna.

## 2. Genomy prokariotyczne

W przypadku bakterii przez wiele lat panował pogląd, że cała informacja genetyczna komórki zawarta jest w jednym chromosomie, co prowadziło do uważania terminów chromosom i genom za synonimy.

Dogmat ten ustalony na podstawie klasycznych analiz mikroskopowych i genetycznych, oznaczeń fizykochemicznych, molekularnych, ale też potwierdzony wynikiem zakończonego w roku 1997 sekwencjonowania genomu pierwszego szczepu *Escherichia coli* głosił, że cała informacja genetyczna tej bakterii to zawarta w rejonie tzw. nukleoidu, pojedyncza dwuniciowa cząsteczka DNA w formie kowalentnie zamkniętego koła, zwana chromosomem bakteryjnym, a więc

\* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, ul. I. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel. 22 5541406; e-mail: miraw@biol.uw.edu.pl

w dzisiejszym rozumieniu stanowiąca jego kompletny genom [7, 9, 11, 12, 40]. Chromosom *E. coli* składa się z około 4,6 Mbp co odpowiada DNA długości blisko 1,5 mm, z czego wynika konieczność odpowiedniej kondensacji – uporządkowanego upakowania w obszarze nukleoidu, które zapewnia wydajną replikację i segregację. Temu zagadnieniu poświęcane są dziesiątki prac poczynawszy od połowy ubiegłego wieku do dziś (przykłady: [43, 57, 64, 72, 74, 77]).

Chociaż *E. coli* była pierwszą bakterią, której projekt sekwencjonowania genomu został podjęty, przed jego ukończeniem w roku 1997 [7] poznano i opublikowano sekwencje nukleotydowe 5 innych genomów bakteryjnych (*Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Helicobacter pylori* i *Synechocystis* sp.). Wszystkie te genomy występowały w formie kolistych, pojedynczych chromosomów, co zgodne było z przekonaniem, że jest to forma typowa dla bakterii [28, 29, 36, 42, 73].

Jednak okazało się, że genom prokariotyczny może zawierać więcej niż jeden chromosom (pierwsze sygnały pochodziły z badań nad *Rhodobacter sphaeroides* z wykorzystaniem techniki PFGE) i nieść oprócz chromosomu jeden lub więcej plazmidów (patrz praca przeglądowa [24]), a chromosom może oprócz „klasycznej” kolistej mieć formę liniową, co okazało się charakterystyczne dla rodzajów *Borrelia* i *Streptomyces*) [5, 26]. Okazało się także, że wielkość genomów prokariotycznych jest znacznie, choć mniej niż eukariotycznych, różnicowana [23, 75].

Ważne było też wykazanie, że różne szczepy należące do tego samego gatunku bakteryjnego znacząco różnią się pulą niesionych genów co doprowadziło do wprowadzenia przed kilku laty dodatkowego pojęcia: pangenu (pan-genome) [47, 56, 63, 70, 71]. Pangenom to suma informacji genetycznej wspólnej dla wszystkich reprezentantów gatunku (core genome – konserwowany rdzeń genomu) oraz informacji uzupełniającej, specyficznej tylko dla konkretnych szczepów (dispensable genome – genom niosący geny dodatkowe w tym charakterystyczne dla gatunku). Pierwsza analiza typu pangenu przeprowadzona została dla gatunku *Streptococcus agalactiae* [70]. Z reguły mamy do czynienia z tzw. pangenukami otwartymi, gdyż poznanie sekwencji nukleotydowej kolejnego szczepu z danego gatunku może do znanego już zestawu genów dostarczyć kolejne.

Postępy genomiki, zwłaszcza osiągnięcia ostatniej dekady, pozwoliły zweryfikować dogmat dotyczący struktury genomu prokariotycznego, który ukształtował się na podstawie analizy genetycznej *E. coli*. Te ogólne problemy dotyczące genomów prokariotycznych zostały bardzo poglądowo omówione i doskonale zilustrowane w artykule Dziewita i Bartosika [23] nie jest więc celowe przywoływanie szczegółowych danych

z tego zakresu. Autorzy zasygnalizowali, że spośród genomów złożonych z wielu replikonów najbardziej skomplikowaną organizację strukturalną ma genom gatunku *Borrelia burgdorferi* i on właśnie będzie przedmiotem naszego opisu.

### 3. *Borrelia burgdorferi* – ogólna charakterystyka

*Borrelia burgdorferi* została po raz pierwszy wyizolowana z ciała kleszcza (rodzaj *Ixodes*) w roku 1982 i uznana za czynnik etiologiczny jednostki chorobowej zwanej boreliozą lub chorobą z Lyme znanej od roku 1975 [52].

Bakteria ta bytuje w jelicie kleszcza, skąd poprzez układ krwionośny może przemieszczać się do innych tkanek, organów, m.in. ślinianek. Ssaki, łącznie z człowiekiem, ulegają zakażeniu w wyniku przedostania się śliny lub wymiocin zakażonego kleszcza przez barierę skórną podczas ukąszenia. Borelioza z Lyme to choroba przewlekła, układowa, charakteryzująca się objawami skórnymi (rumień wędrujący), neurologicznymi, kardiologicznymi czy stawowymi. Obraz kliniczny choroby jest bardzo zróżnicowany, a w przebiegu choroby można wyróżnić kilka etapów [46, 51].

*B. burgdorferi* to gatunek reprezentujący rodzinę *Spirochaetaceae* w obrębie rzędu *Spirochaetales*. Pod względem morfologicznym jest to krętek o dość długich (15–20 µm) i cienkich (0,2–0,3 µm) komórkach. Komórki są ruchliwe, posiadające tzw. rzęski peryplazmatyczne, zakotwiczone w biegunach komórki, które poruszając się w przestrzeni peryplazmatycznej w przeciwnych kierunkach wprawiają komórkę w ruch obrotowy [50]. Ze względu na dwuwarstwowość osłon komórkowych krętki te bywają zaliczane do bakterii gramujemnych, co jednak nie jest słuszne z uwagi na znaczące różnice w architekturze błony zewnętrznej (np. bardzo nieliczne białka transbłonowe) i jej składzie chemicznym (np. brak fosfodwutyloaminy i lipopolisacharydu, obecność licznych glikolipidowych antygenów, których jednocukrowym składnikiem jest galaktoza) [6].

Bakterie te żyją w różnych okresach swego cyklu życiowego jako pasożyty zewnątrz lub wewnątrz komórkowe, można je także hodować *in vitro*, lecz ich wymagania pokarmowe w podłożu hodowlanym są bardzo złożone, a czas generacji wydłużony. Złożone wymagania pokarmowe wynikają z ich ograniczonego „wyposażenia enzymatycznego”. Okazało się, że dla *B. burgdorferi* głównym źródłem energii jest glukoza [30] lecz końcowym produktem jej przemian jest kwas mlekowy, gdyż bakteria ta nie dysponuje enzymami cyklu Krebsa oraz oksydacyjnej fosforylacji. Nieobecne są także liczne enzymy związane z biosyntezą aminokwasów, kwasów tłuszczowych, nukleotydów i wielu kofaktorów reakcji enzymatycznych [30]. Te i inne obserwacje bioche-



miczne potwierdzone zostały po określeniu sekwencji nukleotydowej genomu, lecz omawianie ich wykracza poza zaplanowane ramy opracowania.

#### 4. Genom *Borrelia burgdorferi*

Pierwsze obserwacje struktury materiału genetycznego czynnika etiologicznego boreliozy z Lyme pochodziły z analiz elektroforetycznych prowadzonych różnymi technikami. Dzięki nim dowiedziono (z wykorzystaniem PFGE) obecność w komórce dwuniciowej liniowej cząsteczki DNA o wielkości 900 kpz, którą utożsamiono z chromosomem bakteryjnym. Dalsze analizy potwierdzały unikalność organizacji materiału genetycznego *B. burgdorferi*. Już w tych wczesnych badaniach zaobserwowano obecność kilku liniowych i kolistych plazmidów [1, 4, 26], a niektóre eksperymenty dowodziły, że liniowe plazmidy *B. burgdorferi* mają kowalencyjnie zamknięte końce [2].

Sekwencję nukleotydów w genomie *B. burgdorferi* B31 określono w 1997 roku. Okazało się, że genom ten składa się z liniowego chromosomu o długości 910 725 pz i nie mniej niż 17 liniowych i kolistych plazmidów, których długość w sumie przekraczała 533 000 pz, co razem dawało ponad 1,4 Mpz. Jednocześnie pojawiła się hipoteza, że szczep poddany sekwencjonowaniu mógł w wyniku pasażowania utracić trzy plazmidy. Wnioski takie wyciągnięto przez porównanie z innymi izolatami tego szczepu [30]. W 2000 roku Casjens ze współpracownikami [16] dokonał powtórnej analizy genomu tej bakterii, w wyniku której uzyskano sekwencję liniowego chromosomu, dwunastu liniowych oraz dziewięciu kolistych plazmidów (szczegóły w tabeli I).

##### 4.1. Chromosom

Chromosom *B. burgdorferi* stanowi liniowy replikon o zamkniętych końcach typu struktury spinki do włosów. Na jego końcach występują krótkie odwrócone powtórzenia [15]. Dokładnej analizie sekwencji genomu Fraser i wsp. [30] poświęcili osobny artykuł „Genomic sequence of a Lyme disease spirochaetes, *Borrelia burgdorferi*”, z którego pochodzi większość informacji zawarta w tym rozdziale.

Chromosom zawiera 851 potencjalnych otwartych ramek odczytu [91]. W chwili obecnej 59% z nich ma przypisaną określoną funkcję, 12% wykazuje homologię z białkami innych bakterii o niepoznanej dotąd funkcji. Pozostałe 29% to zupełnie nowe niespotykane w innych bakteriach geny. Najprawdopodobniej są one związane z wirulencją *B. burgdorferi*. Replikon ten zawiera 23 geny strukturalnych RNA. Pomimo dość niskiej zawartości par GC (28,6%) w sekwencji nukleotydowej występują

Tabela I  
Zestawienie replikonów wchodzących w skład genomu *B. burgdorferi* (na podstawie: [14])

Replikon	Struktura	Wielkość w pz	Udział par GC (%)
<b>Chromosom</b>	liniowa	910 725	28,6
<b>cp9</b>	kolista	9 386	23,9
<b>cp26</b>	kolista	26 498	26,5
<b>cp32-1</b>	kolista	30 750	29,4
<b>cp32-3</b>	kolista	30 223	28,9
<b>cp32-4</b>	kolista	30 299	29,3
<b>cp32-6</b>	kolista	29 838	29,3
<b>cp32-7</b>	kolista	30 800	29,1
<b>cp32-8</b>	kolista	30 885	29,1
<b>cp32-9</b>	kolista	30 651	29,3
<b>lp5</b>	liniowa	5 228	23,8
<b>lp17</b>	liniowa	16 928	23,1
<b>lp21</b>	liniowa	18 901	20,7
<b>lp25</b>	liniowa	24 177	23,4
<b>lp28-1</b>	liniowa	28 250	32,3
<b>lp28-2</b>	liniowa	29 766	31,6
<b>lp28-3</b>	liniowa	28 601	25,0
<b>lp28-4</b>	liniowa	27 323	24,5
<b>lp36</b>	liniowa	36 849	26,9
<b>lp38</b>	liniowa	38 829	26,1
<b>lp54</b>	liniowa	53 541	28,2
<b>lp56</b>	liniowa	52 971	27,3

Nazwy poszczególnych plazmidów zostały utworzone od skrótów nazw angielskich charakteryzujących strukturę plazmidu oraz od przybliżonej wielkości poszczególnych replikonów, podanych w kpz, a ustalonych na podstawie analiz elektroforetycznych.

cp – skrót od ang. circular plasmid

lp – skrót od ang. linear plasmid

wszystkie kodony. W wypadku gdy jeden aminokwas jest określony przez więcej niż jeden kodon obserwuje się częstsze użycie odpowiednika bogatego w pary AU.

Doświadczenia wykonane przez Picardeau i wsp. [17, 58] dowiodły, że replikacja chromosomu *B. burgdorferi* ma charakter dwukierunkowy symetryczny, nie doprowadziły jednak do poznania szczegółowego mechanizmu. Udało się jedynie ustalić z pewnym przybliżeniem miejsce rozpoczęcia replikacji. Znajduje się ono mniej więcej w połowie długości chromosomu (458 kpz), najprawdopodobniej w obszarze o wielkości 240 pz, pomiędzy genami *dnaA* i *dnaN*. W miejscu tym obserwuje się zmianę polaryzacji nici oraz sekwencje, do których mogłoby się wiązać białko regulatorowe DnaA, co wydaje się być charakterystyczne dla obszaru inicjacji replikacji [34, 58]. Istnieją dwa hipotetyczne modele, według których mogłoby zachodzić powielanie liniowego chromosomu. Obydwa opierają się na założeniu istnienia dwuniciowej, kolistej formy pośredniej, różnią

się jednak mechanizmem jej powstania. Niezależnie od przyjętego modelu, efekt replikacji w obydwu przypadkach jest identyczny [13, 69].

Zauważono, że prawy telomer chromosomu wykazuje pewne podobieństwo do sekwencji plazmidów liniowych (lp17 i lp28-3), jest więc możliwe, że w przeszłości doszło do zjawiska wymiany telomerów pomiędzy tymi replikonami.

W chromosomie *B. burgdorferi* wyróżniono trzy ORFy (*dnaE*, *dnaN*, *dnaX*) charakteryzujące się dużą homologią do czterech (odpowiednio:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\tau$ ) z dziesięciu polipeptydów tworzących polimerazę III DNA u *E. coli*. Wskazuje to na zredukowaną liczbę genów biorących udział w procesie replikacji. Poza tym odnotowano obecność genów kodujących: helikazę (*dnaB*), pryamazę (*dnaG*), polimerazę I DNA (*polA*) i białko DnaA. *B. burgdorferi* posiada też geny topoiizomeraz: jedną typu I (*topA*) oraz dwie typu II (gyrazę i topoiizomerazę IV). Ich obecność w genomie bakterii o liniowym chromosomie wydaje się dziwna. Być może biorą one udział w replikacji chromosomu, w którym występują koliste formy przejściowe wymagające rozdziału. Prawdopodobnie mogą także uczestniczyć we wprowadzaniu pojedynczych nacięć podczas tego procesu. W chromosomie *B. burgdorferi* kodowanych jest szereg enzymów oraz białek, które mogą brać udział w procesach naprawy DNA m.in. polimeraza I, ligaza, endonukleaza III, kompleks białek endonukleazy UvrABC, helikaza (UvrD), MutL, MutS (brak trzeciego z białek (MutH), które bierze udział w odróżnianiu nici matrycowej od nowo zsyntetyzowanej wynika z nieobecności genu kodującego metylazę Dam).

*B. burgdorferi* jest zdolna do rekombinacji homologicznej, czego dowodem jest obecność dużego zestawu genów umożliwiających ten proces (*recA*, *recBCD*, *recG*, *recJ*, *sbcC*, *sbcD* oraz *ruvAB*). W chromosomie nie zidentyfikowano genu *lexA*, tak więc u tej bakterii najprawdopodobniej nie funkcjonuje typowy system SOS. Analiza replikonu wykazała obecność genów kodujących wszystkie trzy podjednostki rdzenia polimerazy RNA ( $\alpha$ ,  $\beta$  oraz  $\beta'$ ), a także trzech czynników  $\sigma$ :  $\sigma^{70}$  stanowiącego czynnik podstawowy u *E. coli* oraz  $\sigma^{54}$  i  $\sigma^{38}$ . Zaobserwowano także obecność genów: *nusA*, *nusB*, *nusG* oraz *rho* regulujących proces terminacji transkrypcji.

Geny rRNA u *B. burgdorferi* są zablokowane w operon umiejscowiony pomiędzy 434 000 pz a 447 000 pz. Cechami unikatowymi dla tej bakterii są tandemiczne powtórzenia zestawu genów dla 23S rRNA i 5S rRNA oraz ich oddzielenie od genu dla 16S rRNA odcinkiem o długości 22 pz. Porządek ten wydaje się być konserwowany u innych gatunków z rodzaju *Borrelia* [54]. W skład operonu wchodzi także geny kodujące tRNA dla alaniny i izoleucyny. Wszystkie jednostki za wyjątkiem tRNA dla izoleucyny są transkrybowane w tym samym kierunku. W skład operonu wchodzi ponadto

cztery niespokrewnione geny. Jeden z nich koduje glikozylazę 3-metyloadeniny, drugi zawiera prawdopodobnie sekwencje charakterystyczne dla białek będących hydro-lazami, a funkcje pozostałych są nieznanne.

W chromosomie odnotowano obecność 31 tRNA ze specyficznością dla wszystkich aminokwasów. Są one zorganizowane w siedem zgrupowań i 13 pojedynczych genów. Zidentyfikowano też wszystkie syntetazy tRNA prócz syntetazy glutaminylo-tRNA. Obecny jest natomiast enzym, który umożliwia przekształcenie tRNA<sup>Glu</sup> w tRNA<sup>Gln</sup> w wyniku reakcji transamidacji. Badania wykazały, że syntetaza lizylo-tRNA *B. burgdorferi* zalicza się do pierwszego typu tych enzymów, który jest charakterystyczny dla *Archaea*, nie stwierdzono natomiast obecności syntetazy lizylo-tRNA typu II właściwej bakteriom i organizmom eukariotycznym [38].

Analiza chromosomu nie wykazała obecności enzymów cyklu kwasu cytrynowego oraz genów łańcucha oddechowego. Pozwala to sądzić, że pirogronian powstały w wyniku przemian katabolicznych glukozy ulega dalszym przekształceniom w wyniku fermentacji, co potwierdza odnalezienie genu dehydrogenazy mleczanowej (*ldh*) oraz kinazy octanowej (*ackA*). Pozostaje to w zgodzie z mikroaerofilną naturą bakterii. Zidentyfikowano geny szlaku pentozofosforanowego. Jest on źródłem siły redukującej. Stwierdzono także obecność enzymów pozwalających na włączenie innych cukrów: glicerolu, fruktozy, maltozy i glukozoaminy w cykl glikolizy. Potencjał błonowy u *B. burgdorferi* jest utrzymywany przez syntetazę ATP, która przeprowadza reakcję w przeciwnym kierunku i działa tu jako ATPaza. Geny kodujące syntetazę ATP są częścią siedmioskładnikowego operonu. Wykazują one większe podobieństwo do odpowiedników występujących u *Eukaryota* oraz należących do *Archaea* niż do sekwencji bakteryjnych.

W chromosomie obecne są geny kodujące enzymy umożliwiające przemiany kwasów tłuszczowych, jednak nie zaobserwowano enzymów odpowiedzialnych za wydłużanie kwasów tłuszczowych. Obecne są też geny warunkujące cykl przemian prowadzący do uzyskania aktywowanej jednostki izoprenu, a także geny kodujące enzymy związane z syntezą i przemianami nukleozydotrifosforanów.

*B. burgdorferi* nie posiada enzymów umożliwiających syntezę N-acetyloglukozoaminy, która jest składnikiem ściany komórkowej. Jej dodatek do pożywki jest więc wymagany dla wzrostu bakterii [3]. W chromosomie znajdują się natomiast geny warunkujące rozkład chityny, która jest polimerem N-acetyloglukozoaminy, a zarazem składnikiem kutykuli kleszcza będącego gospodarzem *B. burgdorferi*. Wydaje się prawdopodobne, że chityna może być źródłem węgla i energii dla bakterii podczas przebywania w ciele kleszcza.

W chromosomie znajduje się 46 otwartych ramek odczytu kodujących białka wiążące oraz transportujące,

odpowiadające 16 transporterom błonowym. Ta stosunkowo mała ilość przENOŚNIKÓW jest kompensowana przez ich szeroką specyficzną substratową. Wyróżniono wśród nich permeazy, transportery typu ABC, system translokacji grupowej i pompę oporności wielolekowej. Nie zaobserwowano systemów transportujących kwasy tłuszczowe, NAD/NADH czy nukleotydy jednak wydaje się, że powinny być one obecne. Być może odbiegają one sekwencją od już znanych przENOŚNIKÓW. Transport glukozy, fruktozy i dwucukrów najprawdopodobniej odbywa się za pośrednictwem systemu fosfotransferazowego. Ryboza, galaktoza i oligopeptydy są z kolei najpewniej transportowane do wnętrza komórki poprzez transportery typu ABC.

W chromosomie odnotowano obecność 54 genów odpowiedzialnych za zdolność ruchu oraz chemotaksję. Są one zablokowane w osiem operonów liczących od 2 do 25 genów. Ruchliwość oraz zdolność jej modulacji pod wpływem czynników zewnętrznych jest cechą niezwykle ważną dla *B. burgdorferi* – geny te stanowią aż 6% całego chromosomu. Nie jest to zaskakujące jeżeli wziąć pod uwagę tryb życia bakterii i budowę aparatu ruchu. Analiza wykazała, że w chromosomie znajduje się kilka kopii genów biorących udział w chemotaksji (*cheR*, *cheW*, *cheA*, *cheY* i *cheB*). Być może jest to związane z różnym stopniem ekspresji tych genów w zależności od warunków środowiska. Istnieje także hipoteza, która dopuszcza, że rzęski na każdym biegunie komórki podlegają regulacji za pomocą innych produktów ekspresji genów *che*.

Istotnym elementem kodowanym w chromosomie są białka powierzchniowe. Okazało się, że w przypadku *B. burgdorferi* prawie wszystkie zidentyfikowane dotąd tego typu białka należą do klasy lipoprotein i stanowią ponad 8% sekwencji kodującej chromosomu. Odnotowano natomiast obecność tylko dwóch z trzech enzymów koniecznych do powstania lipoproteiny z białka zsyntetyzowanego w wyniku translacji. Inne doświadczenia sugerują jednak obecność kompletu enzymów, być może trzeci z nich (*lnt*) odznacza się zbyt niskim podobieństwem sekwencji do obecnie znanych homologów. *B. burgdorferi* zawiera zestaw genów, których produkty umożliwiają transport lipoprotein przez błonę wewnętrzną. Jest to system sekrecji homologiczny do systemu z *E. coli*.

Pomimo obserwacji sugerujących, że ekspresja genów *B. burgdorferi* zależy od wielu różnych czynników, nie udało się zidentyfikować wielu typowych systemów regulacji. Co prawda odnotowano obecność homologów białek szoku cieplnego (*groES*, *groEL*, *grpE*, *dnaJ*, *hslV*, *dnaK*, i *htpG*), jednak nie odnaleziono właściwego im czynnika  $\sigma$ , który kontroluje ten proces u *E. coli*. Nie wiadomo więc do końca w jaki sposób odbywa się ta regulacja. W chromosomie obecne są też geny, których produkty biorą udział w modulacji odpowiedzi na dro-

dze układu dwuskładnikowego. Z analiz tych wynika, że systemy regulacyjne u *B. burgdorferi* znacznie odbiegają od dotąd poznanych.

## 4.2. Plazmidy

Na zsekwencjonowany genom *B. burgdorferi* B31 składa się prócz liniowego chromosomu 9 kolistych i 12 liniowych plazmidów. Replikony te zawierają w sumie 782 otwarte ramki odczytu, a średni udział sekwencji kodujących waha się od 30% do 92%. Inne izolaty odznaczają się podobnym, acz nie identycznym, zestawem replikonów. Analizy pokazują, że mogą one nieść co najmniej trzy dodatkowe plazmidy [14, 65].

Wcześniej doświadczenia badające strukturę plazmidów wykazały, że replikony liniowe u *B. burgdorferi* odznaczają się dużą komplementarnością zasad wzdłuż sekwencji oraz posiadają kowalencyjnie zamknięte końce [2]. Badania molekularne wykazały duże podobieństwo kilku plazmidów. Na ich podstawie wyróżniono rodzinę cp32 oraz rodzinę lp28. Wiele podobieństw pomiędzy innymi pozachromosomowymi replikonami jest zapewne wynikiem tasowania materiału genetycznego. Plazmidy liniowe wykazują dużo większy potencjał rekombinacyjny o czym świadczy ich niezwykle podobieństwo. Analizy sugerują, że wiele replikonów liniowych powstało na skutek duplikacji i rearanżacji przypadkowych sekwencji. Dowodzi tego ogromna liczba genów tworząca rodziny paralogiczne [14, 16]. Analizy molekularne znanych sekwencji telomerów struktur liniowych wykazały duże podobieństwo zarówno pomiędzy plazmidami oraz plazmidami i chromosomem. Wyróżniono siedem grup podobieństw. Zauważono, że tylko prawy koniec plazmidu lp54 nie wykazuje podobieństwa do żadnej innej sekwencji. Tak duża zgodność telomerów może być wynikiem licznych rearanżacji pomiędzy fragmentami plazmidów. Istnieje hipoteza według której prawy koniec chromosomu miałby pochodzić z któregoś z plazmidów [16]. Zauważono również podobieństwo telomerów plazmidów liniowych do sekwencji poxwirusów [37].

### 4.2.1. Plazmid cp26

Replikon cp26 to jedyny plazmid, którego utraty nigdy nie zaobserwowano. Liczy on 26 498 pz, zawiera 29 ORFów, a ponieważ jest obecny we wszystkich izolatach przypuszczano, że zawiera w swojej sekwencji geny niezbędne dla funkcjonowania *B. burgdorferi*. Doświadczenia prowadzone przez B y r a m i współpracowników [10] wytypowały gen *resT* kodujący resolwazę telomerów, która wydaje się być konieczna dla prawidłowej replikacji chromosomu bakteryjnego oraz innych liniowych replikonów *B. burgdorferi*. Prawdopodobnie *resT* nie jest jedynym genem niezbędnym do funkcjonowania

tej bakterii obecnym na plazmidzie cp26. Dotychczas udało się przypisać funkcję do 15 ORFów obecnych w cp26. Zidentyfikowano zespół genów (*BBB10*, *BBB11*, *BBB12*, *BBB13*) odpowiedzialnych za utrzymanie plazmidu w komórce. Wykazano obecność genów kodujących: hipotetyczny transporter chitobiozy (*BBB04*, *BBB05*, *BBB06*), guaniny czy ksantyny (*BBB22*, *BBB23*), element permeazy oligopeptydów (*BBB16*), a także element systemu fosfotransferazowego (*BBB29*) [10]. Z istotnych genów wirulencji obecnych na replikonie cp26 należy wymienić gen *ospC* kodujący lipoproteinę powierzchniową. Ekspresja tego białka wzrasta znacząco w przypadku kiedy kleszcz, w ciele którego znajduje się *B. burgdorferi*, odżywia się krwią, a temperatura otoczenia osiągnie 32–37°C [66]. Wykazano, że białko to jest niezbędne do zainfekowania myszy [35].

#### 4.2.2. Rodzina cp32

Rodzina cp32 składa się z 13 kolistych replikonów, jednak w zsekwencjonowanym szczepie B31 jest ona reprezentowana tylko przez 7 plazmidów. Ich wielkość waha się w granicach od 29 838 pz do 30 885 pz. Zawierają od 38 do 45 ORFów, co stanowi średnio 92% ich całej sekwencji. Replikony wykazują homologię względem siebie prawie wzdłuż całej swej długości. Wyróżniono trzy regiony gdzie obserwuje się większą różnorodność sekwencji. Znajdują się one w obszarach: 17 kpz, 22 kpz oraz 27 kpz, co odpowiada kolejno: genowi *mlp* (kodującemu lipoproteinę), prawdopodobnemu zestawowi genów związanemu z segregacją plazmidów potomnych oraz genowi *erp*, również kodującemu lipoproteinę [16].

Występowanie zróżnicowania wśród tych genów warunkuje różnorodność, a zarazem zmienność białek istotnych dla cyklu życiowego *B. burgdorferi*. Ekspresja lipoprotein powierzchniowych Erp wzrasta w czasie infekowania gospodarza ssaczego. Ich funkcją jest wiązanie czynnika H, znajdującego się w surowicy gospodarza, podczas aktywacji dopełniacza na drodze alternatywnej. Wiązanie czynnika H przez białko Erp nie pozwala na rozpoznanie bakterii jako obcej komórki i chroni ją tym samym przed odpowiedzią układu immunologicznego [67].

Współistnienie wielu wariantów lipoprotein kodowanych na plazmidach z rodziny cp32 jest możliwe zapewne dzięki istnieniu niewielkich różnic w genach odpowiedzialnych za utrzymanie replikonu w komórce.

Mimo tak wielu podobieństw pomiędzy poszczególnymi członkami rodziny cp32 istnieją też geny specyficzne tylko dla części z nich. Do takich przypadków należą m.in. geny *bdr* czy *rev* [16]. Gen *revA* koduje białko powierzchniowe wiążące fibronektynę [8], natomiast produktem genu *bdr* jest białko o niepoznanej

dotąd funkcji, sugeruje się jednak, że nie jest ono prezentowane na powierzchni komórki bakteryjnej [80].

Do innych znanych genów obecnych na plazmidach z rodziny cp32 należą m.in. geny *blyAB* kodujące cholinę lub system cholinowy pochodzenia bakteriofagowego [20].

Istnieje hipoteza, według której rodzina cp32 powstała wskutek zjawiska rekombinacji. Wyróżniono cztery typy plazmidów cp32, odmienne względem siebie w dwóch rejonach znajdujących się w obszarze 2–5 kpz oraz około 17 kpz. W każdym z tych dwóch miejsc istnieją dwa warianty sekwencji. Najprostszym zjawiskiem tłumaczącym istnienie wspomnianych już czterech typów byłaby rekombinacja.

Sugeruje się, że plazmidy z rodziny cp32 mogą być profagami  $\phi$ BB-1. Przemawia za tym fakt konserwowanego ułożenia genów oraz podobna wielkość wszystkich plazmidów z grupy cp32. Analizy molekularne sugerują obecność operonu związanego z cyklem litycznym. Jednak stan obecnej wiedzy nie pozwala jednoznacznie ustosunkować się do tej hipotezy [25].

Z rodziną cp32 zdają się być związane trzy plazmidy: cp9, lp54 oraz lp56). Plazmid cp9 powstał najprawdopodobniej w wyniku delecji fragmentu o długości około 21 kpz z plazmidu cp32 posiadającego gen *rev*, gdyż jego obecność odnotowano w tym plazmidzie. Ponadto doszło do kilku pojedynczych delecji, inwersji i wymian genowych. Replikon ten zawiera 11 otwartych ramek odczytu, z czego dwie mają przypisaną funkcję. Gen *epmA* koduje białko powierzchniowe [16]. W 2000 roku odkryto replikon podobnej wielkości oraz wykazujący pewne podobieństwo do plazmidu cp9. Plazmid ten zawiera inny allel genu *epmA*. Nadano mu nazwę cp9-2 oraz postulowano zmianę nazwy dla plazmidu z cp9 na cp9-1 [48].

Replikony lp56 i lp54 powstały w wyniku bardziej skomplikowanych zdarzeń. Odgrywają one też większą rolę w wirulencji *B. burgdorferi*, zostaną więc omówione oddzielnie.

#### 4.2.3. Plazmid lp56

Plazmid lp56 zawiera w swojej sekwencji kopię plazmidu z rodziny cp32. Nie jest ona identyczna z żadną dotychczas poznaną, ale wykazuje pewne podobieństwo do replikonów cp32-4, cp32-6 czy cp32-9. Najprawdopodobniej doszło do otworzenia kolistej struktury cp32 i włączenia jej w sekwencję liniowego przodka lp56 tak, że obecnie lokuje się ona pomiędzy 6585 pz a 36 935 pz. Wydaje się, że zdarzenie to miało miejsce stosunkowo niedawno [16]. Miejsca integracji przodków lp56 wykazują się krótkim podobieństwem rzędu 2 pz. Sugeruje to, że zdarzenie to nie nastąpiło na drodze rekombinacji homologicznej. Brak wyraźnych odwróconych powtórzeń w obszarze integracji raczej wyklucza udział

integraz. Wydaje się, że w tym procesie nie pośredniczyły też transpozazy nie zauważono bowiem obecności terminalnych powtórzeń, które mogłyby być przez nie wygenerowane [14].

Replikon zawiera 82 ORFy, osiem pseudogenów. Wśród genów o przypisanej funkcji tylko cztery są charakterystyczne dla plazmidu lp56, pozostałe występują także na plazmidach z rodziny cp32. Gen *BBQ67* koduje metylotransferazę DNA wykazującą specyficzność do adeniny, która może stanowić składnik systemu restrykcyjnego. Odnotowano też obecność białka zewnątrz błonowego będącego produktem genu *BBQ03*, antygeny P35 (produkt *BBQ05*) oraz genu *BBQ08* związanego z utrzymaniem plazmidu w komórce [16].

#### 4.2.4. Plazmid lp54

Ostatnim plazmidem wykazującym duże podobieństwo do rodziny cp32 jest replikon lp54. Zauważono, że składa się on z dziewięciu bloków wykazujących homologię do cp32. Są one ułożone w tej samej orientacji i kolejności na obu replikonach. Wydaje się, że również w tym przypadku doszło do rozerwania kolistej struktury cp32 i włączenia jej w sekwencję liniowego przodka. Obecność kilku zestawów genów rozdzielonych innymi sekwencjami świadczy o licznych późniejszych insercjach, co pozwala stwierdzić, że powstanie tego plazmidu jest starsze ewolucyjnie niż powstanie replikonu lp56.

Plazmid ten zawiera 76 otwartych ramek odczytu, z czego 26 ma swoje paralogi w rodzinie cp32. Interesujący wydaje się fakt, że lipoproteiny *Erp* i *Mlp* występujące w plazmidach cp32 zostały zastąpione w tym replikonie przez niehomologiczne lipoproteiny kodowane przez geny *dbpAB* oraz *ospAB* [16].

Analizy molekularne dowiodły, że plazmid lp54 zawiera najwięcej genów, których ekspresja jest warunkowana przez temperaturę otoczenia. Sugeruje to duży udział tego replikonu w modulacji cyklu życiowego *B. burgdorferi*. Zidentyfikowano na nim kilka genów istotnych zarówno dla przeżycia w ciele kleszcza jak i w stałocieplnym gospodarzu [55].

Do ważnych białek zapewniających powodzenie infekcji w wektorze, a kodowanych na lp54 należą białka *OspA* i *OspB*. Ich ekspresja podczas przebywania *B. burgdorferi* w ciele kleszcza utrzymuje się na wysokim poziomie. To lipoproteiny pełniące rolę adhezyn w jelicie kleszcza. Badania dowodzą, że uszkodzenie tych genów osłabia zdolności kolonizacyjne [78].

W infekcji gospodarza ssaczego biorą udział białka *DbpA* i *DbpB*, które także są adhezynami pośredniczącymi w wiązaniu się do włókien kolagenowych i komórek eukariotycznych [27].

Większość zidentyfikowanych genów koduje białka powierzchniowe i lipoproteiny. Odnotowano jednak

obecność kilku genów, których produkty mogą być istotne dla zdobywania substancji odżywczych przez *B. burgdorferi*. Przykładem może być transporter oligopeptydów typu ABC (*BBA34*) i poryna błony zewnętrznej (gen – *oms28*). Plazmid lp54 koduje też enzym odpowiedzialny za syntezę TMP (*thyX*) [30].

#### 4.2.5. Plazmid lp36

Plazmid lp36 o długości 36 849 pz zawiera 54 otwarte ramki odczytu. Doświadczenia przeprowadzone w 2007 r. wykazały, że wprowadzenie, drogą iniekcji, bakterii pozbawionych tego replikonu nie jest w stanie wywołać infekcji u myszy. Brak plazmidu nie ma wpływu na przetrwanie w ciele kleszcza, lecz obniża stopień infekcyjności *B. burgdorferi* podczas przenoszenia bakterii z wektora na gospodarza. Sugeruje się, że jednym z genów za to odpowiedzialnych jest *adeC* kodujący deaminazę adeniny, enzymu związanego z odzyskiwaniem i metabolizmem adeniny [41]. Innym genem obecnym na replikonie lp36 istotnym w cyklu życiowym *B. burgdorferi* jest *BBK32* kodujący białko wiążące fibronektynę [59].

#### 4.2.6. Plazmid lp25

Plazmid lp25 składa się z 24 177 pz i zawiera 32 otwarte ramki odczytu. Znamy potencjalną funkcję tylko kilku z nich. Najistotniejszym białkiem kodowanym na tym replikonie jest enzym potrzebny do syntezy NADu (*PncA*). Enzym ten jest wymagany do przeżycia w ciele myszy, nie jest natomiast konieczny do wzrostu *in vitro*. Zauważono jednak, że szczepy pozbawione plazmidu lp25 odznaczają się słabszym wzrostem oraz dużo mniejszym stopniem infekcyjności [60].

#### 4.2.7. Plazmidy z grupy lp28

Do grupy replikonów określanych mianem lp28 zalicza się plazmidy, których wielkość waha się od 26 921 pz do 29 766 pz. Największym udziałem sekwencji kodujących odznacza się lp28-2 (86%). Pozostałe trzy plazmidy są prawdopodobnie w trakcie intensywnej ewolucji co odzwierciedla dużo mniejszy odsetek sekwencji kodujących [16].

Szczepy pozbawione lp28-1 są zdolne jedynie do krótkotrwałej infekcji myszy. Świadczy to o istotnym wpływie tego replikonu na wirulencję *B. burgdorferi*. Jest to prawdopodobnie związane z regionem *vlsE* składającym się z części podlegającej ekspresji oraz dwóch wyciszonych kaset *vls*. Regiony ciche rekombinują z *vlsE*, co pozwala na istnienie kilku wariantów białka *VlsE*. Proces ten ma miejsce tylko gdy bakteria znajduje się w ciele gospodarza stałocieplnego i pozwala uniknąć odpowiedzi układu immunologicznego. Obecność tego

regionu stwierdzono dotychczas u wszystkich patogen-nych *B. burgdorferi* [61]. Plazmid lp28-1 koduje ponadto lipoproteinę Erp.

Inne plazmidy z grupy lp28 nie są prawdopodobnie niezbędne dla przetrwania w ciele kleszcza lub myszy, jednak niosą geny dające potencjalną przewagę selekcyjną podczas wzrostu. Na przykład plazmid lp28-4 koduje pompę oporności wielolekowej (BBI26) i enzym biorący udział w przemianach adeniny (BBI06), a replikon lp28-3 zawiera gen, którego produktem jest poryna błony zewnętrznej (Oms28) [30].

Zauważono, że plazmid lp28-2 zawiera pełną kopię genu wykazującą podobieństwo do genu transpozazy, jednak nie jest on otoczony odwróconymi powtórzeniami. Powyżej tej sekwencji znajduje się potencjalne miejsce wiązania rybosomu, natomiast poniżej kodonu stop zidentyfikowano strukturę typu szpilki do włosów. Ta transpozaza może stanowić funkcjonalne białko umożliwiające tak duże rearanżacje w genomie *B. burgdorferi*. Sugeruje się, że lp28-2 koduje też helikazę DNA biorącą udział w replikacji [16].

#### 4.2.8. Pozostałe replikony liniowe

Liniowy replikon o długości 5 228 pz (lp5) wykazuje dużą homologię do replikonu o wielkości 18 753 pz (lp21). Tylko jeden z 6 jego genów nie ma swojego odpowiednika na lp21. Wydaje się, że lp21 powstał na drodze integracji elementu o długości 12,8 kpz do lp5. Ten fragment charakteryzuje się obecnością regionu o wielkości 11 kpz złożonego z powtórzeń o długości 63 pz. Na razie nie udało się ustalić ich funkcji. Wiele genów obecnych na tych dwóch replikonach jest prawdopodobnie fragmentami innych genów obecnych na pozostałych plazmidach *B. burgdorferi*. Nie stwierdzono aby którykolwiek z tych replikonów był wymagany dla prawidłowego przebiegu cyklu życiowego bakterii.

Kolejnym stosunkowo mało poznanym plazmidem jest lp17. Liczy on 16 829 pz i zawiera 25 otwartych ramek odczytu. Na razie nie udało się poznać funkcji żadnej z nich [16]. Być może replikon ten nie jest niezbędny dla zajścia prawidłowego cyklu życiowego bakterii.

Plazmid lp38 o długości 38 829 pz zawiera 52 otwarte ramki odczytu. Badania dowodzą, że nie jest on czynnikiem niezbędnym dla przetrwania w którymkolwiek gospodarzu, jednak jego obecność zwiększa poziom wirulencji *B. burgdorferi*. Na replikonie tym jest kodowana lipoproteina powierzchniowa – OspD [53]. Nie jest to jedyny gen w genomie kodujący białko o takich właściwościach. Jego obecność zwiększa więc jedynie różnorodność, co pozwala na efektywniejsze unikanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Obecny stan wiedzy sugeruje, że plazmid ten nie jest konieczny do wzrostu bakterii *in vivo*, jednak niesie geny mogące

dawać pewną przewagę selekcyjną, czego przykładem może być białko wiążące ATP będące składnikiem transportera typu ABC kodowane przez gen *BBJ26* [30].

#### 5. Pangenom *Borrelia burgdorferi sensu stricto*

Po zsekwencjonowaniu genomu szczepu B31 rozpoczęła się era badań porównawczych, która ma na celu m.in. poznanie pangenomu *B. burgdorferi*, czyli zestawu wszystkich genów danego gatunku. Dotyczy ona zarówno składu genomu jak i poziomu ekspresji poszczególnych genów u różnych izolatów *B. burgdorferi* często różniących się poziomem infekcyjności. W 2003 roku Iyer ze współpracownikami [39] przeprowadził doświadczenie opierające się na zbadaniu obecności wszystkich plazmidów za wyjątkiem liniowych replikonów: lp5 i lp21 oraz kolistego plazmidu cp9 wśród 21 izolatów *B. burgdorferi*. Bakterie zostały wyizolowane od chorych na boreliozę z Lyme z próbki skóry pobranej na obrzeżu rumienia lub z próbki krwi. Wśród izolatów wyróżniono 5 par próbek pobranych z dwóch miejsc od tego samego chorego. Tylko w jednym przypadku zauważono zmianę profilu plazmidowego. Dotyczyła ona plazmidu cp32-8, jednak wydaje się, że nie ma ona wpływu na stopień infekcyjności gospodarza stałocieplnego. Badania te sugerują, że do najczęściej spontanicznie traconych replikonów należą plazmidy: lp56, lp38 oraz fragment lp28-1 (brak ich u około 33% przebadanych próbek). Jednak jedna trzecia prób odznacza się obecnością wszystkich plazmidów uwzględnionych w doświadczeniu.

Podobne doświadczenia, przeprowadzili już wcześniej w 2000 roku Purser i Norris [61]. Badali różnorodność 19 izolatów pod kątem występowania plazmidów poznanych podczas sekwencjonowania szczepu B31. Badania te sugerują istnienie korelacji pomiędzy obecnością plazmidów lp25 i lp28-1 a stopniem infekcyjności, jednak zależność ta w wypadku lp28-1 jest znacznie słabsza. Zauważono, że istnieje grupa replikonów, która jest obecna we wszystkich izolatach, bez względu na ich stopień infekcyjności oraz grupa plazmidów, której utrata nie jest w jakikolwiek sposób związana z obniżeniem stopnia infekcyjności.

Obecnie w bazie NCBI znajduje się 14 zdeponowanych sekwencji genomowych różnych szczepów *B. burgdorferi* [65]. Wszystkie one charakteryzują się obecnością liniowego chromosomu o długości od 887 933 pz do 1 019 864 pz oraz różnym zestawem kolistych i liniowych plazmidów (szczegóły w Tabeli II) (zaskakująca informacja o kolistej strukturze chromosomu *B. burgdorferi* ZS7 [90] została zweryfikowana poprzez kontakt e-mailowy z dr. Casjensem). Ogółem, badając pangenom *B. burgdorferi*, odkryto 38 plazmidów, 15 z nich ma charakter liniowy, a 23 kolisty. Istnieje grupa

Tabela II

Udział plazmidów w genomie poszczególnych szczepów *B. burgdorferi* (na podstawie [65])

Szczep <i>B. burgdorferi</i>	Plazmid													inny																							
	lp28										cp26				cp32																						
	lp5	lp17	lp21	lp25	1	2	3	4	5	6	7	8	lp36		lp38	lp54	lp56	cp9	cp26	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13					
B31	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-			
ZS7	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
64b	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
CA-11.2a	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
29805	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
WT91-23	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
94a	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
72a	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
118a	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Bol26	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
156a	-	+	*	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
297	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
JD1	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
N40	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

W przypadku plazmidów, których sekwencja odpowiada więcej niż jednemu replikonowi znanemu u *B. burgdorferi* B31, w tabeli odnotowano je jako jeden plazmid.

Odpowiednie wyjaśnienia znajdują się poniżej.

Tabela nie uwzględnia wariantów plazmidu cp9. U poszczególnych szczepów, jeżeli nie zaznaczono inaczej, występuje wariant cp9-1, utożsamiany z cp9.

1 plazmid cp32-3+10 o wielkości 48 168 pz

2 plazmid cp32-3-8 o wielkości 61 062 pz

3 plazmid lp3c-28-4 o wielkości 54 623 pz

4 zawiera najprawdopodobniej dwa replikony: plazmid cp9-3 o wielkości 8 706 pz, znaleziono też sekwencję wykazującą podobieństwo do cp9-1

5 plazmid cp9-3 o wielkości 8 692 pz

6 plazmid cp32-7-9 o wielkości 60 942 pz

7 plazmid cp32-1+5 o wielkości 60 739 pz

\* założenie teoretyczne na podstawie podobieństwa sekwencji niepotwierdzone eksperymentalnie

pozachromosomowych replikonów, której obecność stwierdzono w każdym dotąd zsekwencjonowanym szczepie *B. burgdorferi*. Zalicza się tu plazmidy: lp17, lp36, lp54 i cp26. Należy zwrócić też uwagę na plazmid lp28-4, którego obecności nie zaobserwowano tylko w szczepie *B. burgdorferi* CA-11.2a. Okazuje się, że szczep ten posiada jednak replikon lp36-28-4 na którym może znajdować się część genów z plazmidu lp28-4. Można więc wysnuć hipotezę, że plazmid lp28-4 również należy do grupy replikonów niezbędnych dla funkcjonowania *B. burgdorferi*.

Badania nad pangenomem dowiodły, że w skład genomów poszczególnych szczepów *B. burgdorferi* wchodzi replikony podobnej wielkości jak te zsekwencjonowane w szczepie B31. Zidentyfikowano dwa nowe plazmidy – cp18 i cp18-2, powstałe najprawdopodobniej przez delecję fragmentu 14 kbp z plazmidu będącego przodkiem rodziny cp32, gdyż wykazują one duży stopień homologii do replikonów zaliczanych do tej rodziny [68]. Już w 1994 roku dokonano odkrycia i zsekwencjonowania małego kryptycznego plazmidu cp8.3 wyizolowanego ze szczepu *B. burgdorferi* Ip21. Replikon ten liczy 8 303 bp i jest niestabilny w warunkach *in vitro*. Jego cechą charakterystyczną jest obecność w sekwencji dwóch prawie identycznych, kopii odwróconych powtórzeń o długości 184 bp okalających sekwencję o długości 2 675 bp zawierającą trzy ORFy. Sugeruje się, że część sekwencji odwróconych powtórzeń może stanowić sygnał inicjacji transkrypcji i translacji dla znajdujących się pomiędzy nimi ORFów. Nigdzie indziej w genomie *B. burgdorferi* Ip21 nie stwierdzono obecności podobnych powtórzeń [22]. Poza tym odnotowano więcej wariantów znanych już plazmidów: odkryto kolejne plazmidy należące do rodzin cp32 oraz rodziny lp28; zidentyfikowano też dwa nowe warianty plazmidu cp9.

W 2003 dokonano porównania sekwencji genomu szczepu B31 z częściowo zsekwencjonowanymi genomami szczepów JD1 oraz N40. Okazało się, że największą różnorodnością odznaczają się geny kodujące białka biorące udział w procesie wirulencji – głównie OspC. Badacze sugerują, że głównym źródłem tej różnorodności może być proces rekombinacji. Wykazano również, że większość plazmidów ewoluuje w tempie około 2–4 razy szybszym niż sekwencja chromosomu. Ciekawym spostrzeżeniem jest fakt, że plazmidy cp26 i lp54, które wydają się być niezbędne dla wzrostu *B. burgdorferi*, zmieniają się w tempie podobnym do chromosomu [62].

## 6. *Borrelia burgdorferi* a inne *Borrelia*

Rodzaj *Borrelia* skupia mikroorganizmy chorobotwórcze będące patogenami ssaków. Łączy je podobny cykl życiowy, jednak objawy wywoływane przez poszczególne mikroorganizmy są różne – stanowią odrębne

jednostki chorobowe. W rodzaju *Borrelia* wyróżnia się grupę bakterii wywołującą boreliozę – tzw. *Borrelia burgdorferi sensu lato* skupiającą: *B. burgdorferi*, *B. afzelii* oraz *B. garinii*; ale także *B. recurrentis* czy *B. hermsii* powodujące dur powrotny.

Obecnie w bazie NCBI znajduje się 10 sekwencji genomowych oraz 2 sekwencje chromosomowe mikroorganizmów z rodzaju *Borrelia* z wyłączeniem *B. burgdorferi* (zestawienie z *B. burgdorferi* w Tabeli III). Wszystkie one charakteryzują się obecnością liniowego chromosomu, którego wielkość waha się od 889 kbp do blisko 1012 kbp. Analizy porównawcze ukazują, że skład genomy chromosomu jak i samo ułożenie genów są mocno konserwowane wewnątrz rodzaju *Borrelia*. Wydaje się też, że występowanie dużej liczby plazmidów jest cechą charakterystyczną dla mikroorganizmów z tego rodzaju. Największą liczbą plazmidów (21) odznacza się *B. burgdorferi*. Natomiast trudno jest jednoznacznie wskazać gatunek czy szczep o najmniejszej liczbie pozachromosomowych replikonów. Tabela III ukazuje, że *B. garinii* PBi zawiera tylko dwa plazmidy, jednak wynika to jedynie z niedoskonałości metod badawczych. Trudności te wynikają z dużego podobieństwa niektórych fragmentów sekwencji oraz z występowania powtórzeń w genomie [32]. Podobne problemy towarzyszyły już sekwencjonowaniu materiału genetycznego *B. burgdorferi* B31. W przypadku *B. hermsii* w pełni znamy tylko sekwencję chromosomu, jednak wiadomo, że gatunek ten posiada kolisty replikon o wielkości 32 kbp zawierający wiele ortologów ORFów zlokalizowanych na plazmidach z rodziny cp32 u *B. burgdorferi* oraz plazmidy należące do rodziny lp28. Materiał genetyczny *B. hermsii* wykazuje też hybrydyzację, w różnym stopniu, do wszystkich pozachromosomowych replikonów *B. burgdorferi* B31 [19, 79]. Pozwala to przypuszczać, że na genom tego gatunku składa się również wiele plazmidów.

W każdym zsekwencjonowanym genomie znajduje się replikon wykazujący pewne podobieństwo do plazmidu cp26. Zawsze zawiera on gen *resT* kodujący resolwazę telomerów, która jest niezbędna dla prawidłowej replikacji liniowych replikonów. Równie często w poznanych genomach występuje plazmid lp54 lub jego odpowiednik. Jego obecności nie zaobserwowano tylko u *B. duttonii* Ly i *B. recurrentis* A1 – obydwa gatunki należą do grupy wywołującej dur powrotny. Nieobecność wspomnianego replikonu może świadczyć o występowaniu na nim genów specyficznych tylko dla wywoływania boreliozy.

Obydwa w pełni zsekwencjonowane gatunki z rodzaju *Borrelia* wywołujące dur powrotny charakteryzują się odmiennym zestawem pozachromosomowych replikonów w stosunku do innych poznanych genomów tej grupy mikroorganizmów. Nawet odpowiednik plazmidu cp26 zawierający gen *resT* odznacza się strukturą liniową



Tabela III  
Porównanie genomów mikroorganizmów z rodzaju *Borrelia* (na podstawie [45, 32, 33, 81–90])

Gatunek / szczep	Wielkość chromosomu w pz	Udział par GC (%) w chromosomie	Liczba plazmidów	Udział plazmidów liniowych	Plazmidy
<i>B. burgdorferi</i> B31	910 725	28%	21	12/21	cp9, cp26, cp32-1, cp32-3, cp32-4, cp32-6, cp32-7, cp32-8, cp32-9, lp5, lp17, lp21, lp25, lp28-1, lp28-2, lp28-3, lp28-4, lp36, lp38, lp54, lp56
<i>B. afzelii</i> ACA-1	903 516	28%	14	8/14	cp32-3, lp28-1, lp17, cp32-4, lp28-3, lp28-7, cp32-1, lp28-2, lp32-10, lp38, lp54, cp32-5, lp28-4, cp26
<i>B. afzelii</i> PKo	905 394	28%	8 <sup>1</sup>	6/8	lp60, lp60-2, lp34, lp32, cp30, lp28, cp27, lp25
<i>B. garinii</i> PBi	904 246	28%	2 <sup>2</sup>	1/2	cp26, lp54
<i>B. garinii</i> Far04	889 112	28%	7	6/7	lp36, lp17, lp28-1, lp25, lp54, cp26, lp32-10
<i>B. garinii</i> PBr	903 870	28%	11	8/11	lp25, lp36, cp32-5, lp28-4, cp26, cp32-10, lp28-3, lp54, lp17, lp28-1, lp28-7
<i>B. spielmanii</i> A14S	1 011 570	28%	8	7/8	lp38, lp28-8, lp36, lp17, lp54, lp28-4, lp28-3, cp26
<i>B. valaisiana</i> VS116	913 294	28%	11	6/11	cp26, lp54, cp32-2-7, cp32-10, lp36, lp25, cp9, lp17, lp28-3, cp32-5, lp28-8
<i>Borrelia</i> sp. SV1	951 833	28%	9	5/9	lp32-12, cp32-3, lp28-2, lp17, cp32-4, cp32-7, cp26, lp28-4, lp54
<i>B. duttonii</i> Ly	931 674	27%	16	15/16	pl15, pl165, pl23, pl23b, pl26, pl27, pl28, pl35, pl36, pl40, pl41, pl42, pl70, pl31, pl32, pl11
<i>B. hermsii</i> DAH	922 307	29%	– <sup>3</sup>	– <sup>3</sup>	–
<i>B. recurrentis</i> A1	930 981	27%	7	7/7	pl23, pl33, pl35, pl37, pl53, pl6, pl124
<i>B. turicatae</i> 91E135	917 330	29%	– <sup>3</sup>	– <sup>3</sup>	–

<sup>1</sup> W pełni odtworzono sekwencję 8 plazmidów; plazmid lp31 składa się z trzech niezłożonych bloków genów.

<sup>2</sup> Sekwencjonowanie prowadzono przy użyciu metody shotgun. W pełni odtworzono jedynie sekwencję dwóch plazmidów – odpowiedników cp26 i lp54.

<sup>3</sup> Brak danych, w bazie NCBI zdeponowane zostały tylko sekwencje chromosomów poszczególnych gatunków z rodzaju *Borrelia*, pozostała część genomu jest w trakcie sekwencjonowania.

i mniejszym rozmiarem (ok. 23 kbp). Najprawdopodobniej różnice te są skorelowane z rodzajem choroby, którą jest w stanie wywołać dany patogen. Gatunki zaliczane do *Borrelia burgdorferi sensu lato* posiadają zwykle podobny profil plazmidów. Wspólną cechą wszystkich mikroorganizmów należących do rodzaju *Borrelia* o zsekwencjonowanych dotąd genomach pozostaje liniowy chromosom oraz szeroki zestaw pozachromosomowych replikonów wśród których zazwyczaj większy udział mają plazmidy liniowe.

## 7. Kwestia ewolucji i współistnienia replikonów genomu *B. burgdorferi*

Pomimo upływu ponad 10 lat od poznania genomu *B. burgdorferi* niezwykła jego struktura wciąż budzi wiele emocji. Towarzyszą one zwłaszcza zagadnieniom powstania i współwystępowania tak wielu, często bardzo podobnych do siebie, replikonów.

Liczne analizy molekularne wykazały istnienie w genomie pięciu genów związanych ze zdolnością do przetrwania plazmidów w komórce oraz ich replikacją. Okazuje się, że każdy z pozachromosomowych elementów *B. burgdorferi* zawiera od jednego do czterech z tych genów. Ich produkty należą do pięciu rodzin paralogicznych (PF32, PF49, PF50, PF57, PF63). Są one utożsamiane z białkami inicjującymi replikację (PF57/ PF63), inne wykazują homologię do ParA. Doświadczenia *in vitro* wykazały też, że białka te mogą oddziaływać między sobą. Do tej pory nie udało się jednak ustalić mechanizmów rządzących rozdziałem plazmidów oraz samym procesem replikacji. Wydaje się, że istnienie tylu replikonów jest możliwe dzięki występowaniu białek pełniących podobne funkcje jednak wykazujących stosunkowo odległe podobieństwo na poziomie sekwencji [18, 21].

Jak już wcześniej wspomniano analizy molekularne wykazały duże podobieństwo większości telomerów replikonów liniowych, a jednocześnie zróżnicowanie

sekwencji w pobliżu telomerów wśród plazmidów pochodzących z różnych izolatów *B. burgdorferi*. Niedawno dowiedziano też, że resolwaza telomerów jest zdolna do tworzenia fuzji pomiędzy różnymi replikonami liniowymi, co umożliwia, w pewnych warunkach, zajście kolejnych zjawisk genetycznych (rekombinacje, delekcje). Wydaje się, że proces ten pełni kluczową rolę jeżeli chodzi o ewolucję replikonów liniowych *B. burgdorferi*.

## 8. Podsumowanie

Wielkości poznanych genomów bakterii patogennych wahają się od 580 kbp u *Mycoplasma genitalium* do 6300 kbp u *Pseudomonas aeruginosa*. Większość bakterii patogennych charakteryzuje się stosunkowo małym genomem. Wynika to z przystosowania się do stabilnego i zasobnego w źródło węgla, energii i azotu środowiska, jakie stanowi dla nich organizm gospodarza. Mikroorganizmy te zredukowały swój genom do absolutnego niezbędnego minimum. Jest to zwłaszcza dobrze zauważalne w przypadku gatunków będących obligatoryjnymi patogenami [49, 76]. *B. burgdorferi* prawdopodobnie pod tym względem nie jest wyjątkiem. Tak niezwykle uorganizowany genom składający się z liniowego chromosomu, tak nieczęsto spotykanego u *Bacteria*, oraz bogatego zestawu plazmidów o strukturze zarówno kolistej jak i liniowej wzbudza jednak duże zainteresowanie i rodzi wiele pytań. Niestety większość z nich pozostaje wciąż bez odpowiedzi.

Do dziś nie jesteśmy w stanie jednoznacznie stwierdzić w jaki sposób chromosom *Borrelia* stał się liniowy. Wszystkie inne mikroorganizmy zaliczane do typu *Spirochaetes* posiadają chromosom kolisty, więc taką strukturę musiał mieć też przodek rodzaju *Borrelia*. Czy linearyzacja chromosomu miała jakiś cel czy była po prostu utrwalonym efektem ewolucji? Ten temat pozostanie zapewne dla naukowców przez jeszcze jakiś czas zagadką. Istnieje natomiast hipoteza ukazująca możliwą drogę zmiany struktury chromosomu. Analizy molekularne dowiodły mianowicie, że na telomerach chromosomu mikroorganizmów z rodzaju *Borrelia* występują charakterystyczne sekwencje o długości 25 pz. Podobne sekwencje odnaleziono u wirusa wywołującego afrykańską gorączkę świń, należącego do rodziny *Asfarviridae*. Okazało się ponadto, że zawartość par AT w genomie tego wirusa jest bardzo podobna do zawartości par AT u *Borrelia* spp. Prawdopodobne jest, że w przeszłości doszło do zdarzenia integracji genomu wirusa do chromosomu przodka *Borrelia*. Fakt, że wirus wywołujący afrykańską gorączkę świń i *Borrelia* spp. są przenoszone przez stawonogi zwiększa możliwość zajścia tego zdarzenia genetycznego. Oczywiście jest to tylko hipoteza. W chromosomach *Borrelia* spp. nie stwierdzono obecności innego materiału genetycznego pochodzącego od

tego wirusa co oznaczałoby, gdyby ta hipoteza okazała się prawdziwa, że w późniejszym czasie uległ on delekcji. Drugą hipotezą jest konwergencja, która doprowadziła do powstania podobnych struktur u dwóch niespokrewnionych bytów [13].

Kolejną cechą wyróżniającą *B. burgdorferi* spośród innych patogenów jest niezwykle pofragmentowany genom składający się z co najmniej 20 plazmidów. Bakterie patogenne zawierają zwykle nie więcej niż jeden pozachromosomowy replikon. Zawarte są na nim głównie geny związane z czynnikami wirulencji. Nie są to geny niezbędne dla funkcjonowania bakterii jednak mogą zapewnić im znaczną przewagę w kontakcie z organizmem gospodarza, by zapewnić im większą mobilność zostały zlokalizowane na plazmidach. Przeciętą bakteria chorobotwórcza odznacza się stosunkowo prostym cyklem życiowym ograniczonym zwykle do jednego typu gospodarza, być może z tego wynika tak mały zestaw pozachromosomowych replikonów.

Należy pamiętać, że *B. burgdorferi* odznacza się bardziej skomplikowanym cyklem życiowym, opartym o gospodarza ssaczego oraz wektor pod postacią stawonoga. Bakteria ta musi być przystosowana do życia w środowisku o stałej temperaturze (ssak), jak i w warunkach zmiennych (stawonóg). Trzeba mieć również na uwadze, że każdy z organizmów gospodarza charakteryzuje się odmiennym zestawem receptorów będących miejscem adhezji dla patogenu, więc bakteria powinna posiadać informację genetyczną umożliwiającą istnienie dwóch różnych dróg sukcesji organizmu gospodarza. Kolonizacja organizmu kleszcza jest możliwa m.in. dzięki ekspresji białek OspA i OspB, które pełnią rolę adhezyn w jelicie kleszcza. Kiedy stawonóg odżywia się krwią pod wpływem zmiany temperatury oraz przyływu substancji odżywczych dochodzi do zmiany ekspresji genów *B. burgdorferi*. W miejsce OspA i OspB zaczyna być produkowane OspC, które jest niezbędne do zainfekowania myszy (gospodarza ssaczego). Równocześnie bakteria przemieszcza się do ślinianek kleszcza by przedostać się do organizmu gospodarza. Dalsze etapy kolonizacji są możliwe dzięki całej grupie białek, które wiążą się z specyficznymi z receptorami w ciele ssaka (np. białka DbpA i DbpB z dekoryną czy białko RevA z fibronektyną). Aby stabilnie utrzymać się w gospodarzu bakteria unika odpowiedzi układu odpornościowego poprzez dynamiczne zmiany antygenów powierzchniowych (kasety *vls*) czy przez wiązanie się lipoprotein Erp z czynnikiem H w surowicy co hamuje układ dopełniacza. Eksperymentalnie udowodniono, że do przeżycia w ciele myszy niezbędny jest enzym, kodowany przez gen *pncA*, związany z syntezą NADu. Istnieje też szereg innych genów, które mogą dawać pewną przewagę selekcyjną. Kodują one m.in. transportery oligopeptydów, chitobiozy czy poryny błony zewnętrznej [69].

Informacje te znajdują się często na osobnych plazmidach, co być może ma na celu złagodzenie skutków utraty któregośkolwiek z replikonów. Analizując sekwencję plazmidów *B. burgdorferi* można zauważyć, że wiele replikonów jest ze sobą powiązanych, gdyż wykazują duże wzajemne podobieństwo. Istnieją hipotezy sugerujące, że wiele plazmidów powstało na skutek duplikacji czy rearanżacji pewnych sekwencji. Utrzymywanie w genomie tak podobnych sekwencji może mieć na celu zapewnienie pewnej zmienności pozwalającej na uniknięcie odpowiedzi układu immunologicznego gospodarza. Jest to oczywiście na razie tylko hipoteza, jednak wciąż pozostaje pytanie czy do zapewnienia takiego procesu potrzeba aż tylu replikonów.

## 9. Piśmiennictwo

1. Barbour A.G.: Plasmid analysis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 475–478 (1988)
2. Barbour A.G., Garon C.F.: Linear plasmids of the bacterium *Borrelia burgdorferi* have covalently closed ends. *Science*, **237**, 409–411 (1987)
3. Barbour A.G., Hayes S.F.: Biology of *Borrelia* species. *Microbiol. Rev.* **50**, 381–400 (1986)
4. Baril C., Richaud C., Baranton G., Saint Girons I.S.: Linear chromosome of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 475–478 (1989)
5. Bentley S.D., Hopwood D.A. i wsp.: Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, **417**, 141–147 (2002)
6. Bergstrom S., Zückert W.R.: Structure, function and biogenesis of the *Borrelia* cell envelope. w: *Borrelia*. Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis (red. D.S. Samuels, J.D. Radolf), Caister Acad. Press, 2010
7. Blattner F.R., Shao Y. i wsp.: The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, **277**, 1453–1462 (1997)
8. Brissette C.A., Bykowski T., Cooley A.E., Bowman A., Stevenson B.: *Borrelia burgdorferi* RevA binds fibronectin. *Infect. Immun.* **77**, 2802–2012 (2009)
9. Brock T.D.: The bacterial nucleus: a history. *Microbiol. Rev.* **52**, 397–411 (1988)
10. Byram R., Stewart P.E., Rosa P.: The essential nature of the ubiquitous 26-kilobase circular replicon of *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* **186**, 3561–3569 (2004)
11. Cairns J.: The chromosome of *Escherichia coli*. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* **28**, 43–46 (1963)
12. Cairns J.: The bacterial chromosome and its manner of replication as seen by autoradiography. *J. Mol. Biol.* **6**, 208–213 (1963a)
13. Casjens S.: Evolution of the linear DNA replicons of the *Borrelia* spirochetes. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 529–534 (1999)
14. Casjens S.: *Borrelia* genomes in the year 2000. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**, 401–410 (2000)
15. Casjens S., Murphy M., DeLange M., Sampson L., van Vugt R., Huang W.M.: Telomers of the linear chromosomes of Lyme disease: spirochaetes nucleotide sequence and possible exchange with linear plasmid telomers. *Mol. Microbiol.* **26**, 581–596 (1997)
16. Casjens S., Palmer N., van Vugt R., Huang W.M., Stevenson B., Rosa P., Lathigra R., Sutton G., Peterson J., Dodson R.J., Haft D., Hickey E., Gwinn M., White O., Fraser C.M.: A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* **35**, 490–516 (2000)
17. Chaconas G.: Replication of the *B. burgdorferi* genome and scrambling of the linear replicons through reverse telomere resolution. w: *Borrelia*. Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis (red. D.S. Samuels, J.D. Radolf), Caister Acad. Press, 2010
18. Chaconas G., Kobryn K.: Structure, function, and evolution of linear replicons in *Borrelia*. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**, 185–202 (2010)
19. Dai Q., Restrepo B.I., Porcella S.F., Raffel S.J., Schwan T.G., Barbour A.G.: Antigenic variation by *Borrelia hermsii* occurs through recombination between extragenic repetitive elements on linear plasmids. *Mol. Microbiol.* **60**, 1329–1343 (2006)
20. Damman C.J., Eggers C.H., Samuels D.S., Oliver D.B.: Characterization of *Borrelia burgdorferi* BlyA and BlyB proteins: a prophage-encoded holing-like system. *J. Bacteriol.* **182**, 6791–6797 (2000)
21. Deneke J., Chaconas G.: Purification and properties of the plasmid maintenance proteins from the *Borrelia burgdorferi* linear plasmid lp17. *J. Bacteriol.* **190**, 3992–4000 (2008)
22. Dunn J.J., Buchstein S.R., Butler L.L., Fisenne S., Polin D.S., Lade B.N., Luft B.J.: Complete nucleotide sequence of a circular plasmid from the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* **176**, 2706–2717 (1994)
23. Dziejwit Ł., Bartosik D.: Genomy prokariotyczne w świetle analiz genomicznych. *Post. Mikrobiol.* **50**, 87–96 (2011)
24. Egan E.S., Fogel M.A., Waldor M.K.: Divided genomes: negotiating the cell cycle in prokaryotes with multiple chromosomes. *Mol. Microbiol.* **56**, 1129–1138 (2005)
25. Eggers C.H., Casjens S., Hayes S.F., Garon C.F., Damman C.F., Oliver D.B., Samuels D.S.: Bacteriophages of spirochetes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**, 365–373 (2000)
26. Ferdows M.S., Barbour A.G.: Megabase-sized linear DNA in the bacterium *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 5969–5973 (1989)
27. Fischer J.R., Parveen N., Magoun L., Leong J.M.: Decorin-binding proteins A and B confer distinct mammalian cell type-specific attachment by *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 7307–7312 (2003)
28. Fleischmann R.D., Venter J.C. i wsp.: Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, **269**, 496–512 (1995)
29. Fraser C.M., Venter J.C. i wsp.: The minimal genome complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*, **270**, 397–403 (1995)
30. Fraser C.M., Venter J.C. i wsp.: Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, **390**, 580–586 (1997)
31. Gherardini F., Boylan J., Lawrence K., Skare J.: Metabolism and physiology of *Borrelia*. w: *Borrelia*. Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis (red. D.S. Samuels, J.D. Radolf), Caister Acad. Press, 2010
32. Glöckner G., Lehmann R., Romualdi A., Pradella S., Schulte-Spechtel U., Schilhabel M., Wilske B., Sühnel J., Platzer M.: Comparative analysis of the *Borrelia garinii* genome. *Nucleic Acids Res.* **32**, 6038–6046 (2004)
33. Glöckner G., Schulte-Spechtel U., Schilhabel M., Felder M., Sühnel J., Wilske B., Platzer M.: Comparative genome analysis: selection pressure on the *Borrelia vls* cassettes is essential for infectivity. *BMC Genomics*, **7**, 211 (2006)

34. Grigoriev A.: Analyzing genomes with cumulative skew diagrams. *Nucleic Acids Res.* **26**, 2286–2290 (1998)
35. Grimm D., Tilly K., Byram R., Stewart P.E., Krum J.G., Bueschel D.M., Schwan T.G., Policastro P.F., Elias A.F., Rosa P.A.: Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 3142–3147 (2004)
36. Himmelreich R., Hilbert H., Plagens H., Pirkl E., Li B.C., Herrmann R.: Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4420–4449 (1996)
37. Hinnebusch J., Barbour A.G.: Linear plasmid of *Borrelia burgdorferi* have a telomeric structure and sequence similar to those of a eukaryotic virus. *J. Bacteriol.* **173**, 7233–7239 (1991)
38. Ibba M., Bono J.L., Rosa P.A., Soll D.: Archaeal-type lysyl-tRNA synthetase in the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 14383–14388 (1997)
39. Iyer R., Kalu O., Purser J., Norris S., Stevenson B., Schwartz I.: Linear and circular plasmid content in *Borrelia burgdorferi* clinical isolates. *Infect. Immun.* **71**, 3699–3706 (2003)
40. Jacob F., Wollman E.L.: Sexuality and the Genetics of Bacteria. Academic Press Inc., New York, 1961
41. Jewett M.W., Lawrence K., Bestor A.C., Tilly K., Grimm D., Shaw P., VanRaden M., Gherardini F., Rosa P.A.: The critical role of the linear plasmid lp36 in the infectious cycle of *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* **64**, 1358–1374 (2007)
42. Kaneko T., Tabata S. i wsp.: Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* **3**, 109–136 (1996)
43. Kois A., Świątek M., Zakrzewska-Czerwińska J.: Struktura chromosomu bakteryjnego. *Post. Hig. Med. Dośw.* **61**, 534–540 (2007)
44. Lederberg J., McCray A.T.: ‘Ome sweet’ omics – a genealogical treasury of words. *The Scientist*, **15**, 8
45. Lescot M., Drancourt M. i wsp.: The genome of *Borrelia recurrentis*, the agent of deadly louse-borne relapsing fever, is a degraded subset of tick-borne *Borrelia duttonii*. *PLoS Genet.* **4**: e1000185 (2008)
46. Marques A.R.: Lyme disease: a review. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **10**, 13–20 (2010)
47. Medini D., Donati C., Tettelin H., Massignani V., Pappuoli R.: The microbial pan-genome. *Curr. Opin. Genet. Develop.* **15**, 589–594 (2005)
48. Miller J.C., Bono J.L., Babb K., El-Hage N., Casjens S., Stevenson B.: A second allele of *eppA* in *Borrelia burgdorferi* strain B31 is located on the previously undetected circular plasmid cp9-2. *J. Bacteriol.* **182**, 6254–6258 (2000)
49. Moreno R.: Genome evolution within the *alpha* Proteobacteria: why do some bacteria not possess plasmids and others exhibit more than one different chromosome? *FEMS Microbiol. Rev.* **22**, 255–275 (1998)
50. Motaleb M.A., Corum L., Bono J.L., Elias A.F., Rosa P., Samuels D.S., Charon N.W.: *Borrelia burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and motility functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 10899–10904 (2000)
51. Murray T.S., Shapiro E.D.: Lyme disease. *Clin. Lab. Med.* **30**, 311–328 (2010)
52. Nau R., Christen H.J., Eiffert H.: Lyme disease – current state of knowledge. *Dtsch. Arztebl Int.* **106**, 72–81 (2009)
53. Norris S.J., Carter C.J., Howell J.K., Barbour A.G.: Low-passage-associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31: characterization and molecular cloning of OspD, a surface-exposed, plasmid-encoded lipoprotein. *Infect. Immun.* **60**, 4662–4672 (1992)
54. Ojaimi C., Davidson B.E., Saint Girons I., Old I.G.: Conservation of gene arrangement and an unusual organization of rRNA genes of the linear chromosomes of the Lyme disease spirochaetes *Borrelia burgdorferi*, *B. garinii* and *B. afzelii*. *Microbiology*, **140**, 2931–2940 (1994)
55. Ojaimi C., Schwartz I. i wsp. Profiling of temperature-induced changes in *Borrelia burgdorferi* gene expression by using whole genome arrays. *Infect. Immun.* **71**, 1689–1705 (2003)
56. Pallen M.J., Wren B.W.: Bacterial pangenomics. *Nature*, **449**, 835–842 (2007)
57. Pettijohn D.E., Worcel A: Prokaryotic DNA in nucleoid structure. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **2**, 175–202 (1976)
58. Picardeau M., Lobry J.R., Hinnebusch B.J.: Physical mapping of an origin of bidirectional replication at the centre of the *Borrelia burgdorferi* linear chromosome. *Mol. Microbiol.* **32**, 437–445 (1999)
59. Probert W.S., Johnson B.J.: Identification of a 47 kDa fibronectin-binding protein expressed by *Borrelia burgdorferi* isolate B31. *Mol. Microbiol.* **30**, 1003–1015 (1998)
60. Purser J.E., Lawrenz M.B., Caimano M.J., Radolf J.D., Norris S.J.: A plasmid-encoded nicotinamidase (PncA) is essential for infectivity of *Borrelia burgdorferi* in a mammalian host. *Mol. Microbiol.* **48**, 753–764 (2003)
61. Purser J.E., Norris S.J.: Correlation between plasmid content and infectivity in *Borrelia burgdorferi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 13865–13870 (2000)
62. Qiu W.G., Schutzer S.E., Bruno J.F., Attie O., Xu Y., Dunn J.J., Fraser C.M., Casjens S.R., Luft B.J.: Genetic exchange and plasmid transfers in *Borrelia burgdorferi sensu stricto* revealed by three-way genome comparisons and multilocus sequence typing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 14150–14155 (2004)
63. Rasko D.A., J. Ravel J. i wsp.: The pangenomic structure of *Escherichia coli*: comparative genome analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J. Bacteriol.* **190**, 6881–6893 (2008)
64. Rocha E.P.: The organization of the bacterial genome. *Annu. Rev. Genet.* **42**, 211–233 (2008)
65. Schutzer S.E., Fraser-Liggett C.M., Casjens S.R., Qiu W-G, Dunn J.J., Mongodin E.F., Luft B.J.: Whole-genome sequences of thirteen isolates of *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* **193**, 1018–1020 (2011)
66. Schwan T.G., Piesman, J., Golde, W., Dolan, M.C., Rosa, P.A.: Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2909–2913 (1995)
67. Skotarczak B. Adaptation factors of *Borrelia* for host and vector. *Ann. Agric. Environ. Med.* **16**, 1–8 (2009)
68. Stevenson B., Casjens S., van Vugt R., Porcella S.F., Tilly K., Bono J.L., Rosa P.: Characterization of cp18, a natural truncated member of the cp32 family of *Borrelia burgdorferi* plasmids. *J. Bacteriol.* **179**, 4285–4291 (1997)
69. Stewart P.E., Byram R., Grimm D., Tilly K., Rosa P.A.: The plasmids of *Borrelia burgdorferi*: essential genetic elements of a pathogen. *Plasmid*, **53**, 1–13 (2005)
70. Tettelin H., Frase C.M. i wsp.: Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial “pan-genome”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 13950–13955 (2005)
71. Tettelin H., Riley D., Cattuto C., Medini D.: Comparative genomics: the bacterial pan-genome. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 472–477 (2008)
72. Thanbichler M. Violler P.H., Shapiro L.: The structure and function of the bacterial chromosome. *Curr. Opin. Genet. Develop.* **15**, 153–162 (2005)

73. Tomb J.F., Venter J.C. i wsp.: The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, **388**, 539–547 (1997)
74. Toro E., Shapiro L.: Bacterial chromosome organization and segregation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**(2) a000349 (2010)
75. Trevors J.T.: Genome size in bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **69**, 293–303 (1996)
76. Węgrzyn G.: The minimal genom paradox. *J. Appl. Genet.* **42**, 385–392 (2001)
77. Worcel A., Burgi E.: On the structure of the folded chromosome of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **71**, 127–147 (1971)
78. Yang X.F., Pal U., Alani S.M., Fikrig E., Norgard M.V.: Essential role for OspA/B in the life cycle of the Lyme disease spirochete. *J. Exp. Med.* **199**, 641–648 (2004)
79. Zhong J., Barbour A.G.: Cross-species hybridization of a *Borrelia burgdorferi* DNA array reveals infection- and culture-associated genes of the unsequenced genome of the relapsing fever agent *Borrelia hermsii*. *Mol. Microbiol.* **51**, 729–748 (2004)
80. Zückert W.R., Meyer J., Barbour A.G.: Comparative analysis and immunological characterization of *Borrelia* Brd protein family. *Infect. Immun.* **67**, 3257–3266 (1999)
81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=5900>
82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=5956>
83. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=5904>
84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=5898>
85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=5748>
86. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=22309>
87. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=22889>
88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=22733>
89. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=5744>
90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=23501>
91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=132>



# PAŁECZKI Z RODZAJU *SERRATIA*: CHARAKTERYSTYKA GATUNKÓW, CHOROBTWÓRCZOŚĆ ORAZ OPORNOŚĆ NA ANTYBIOTYKI *SERRATIA MARCESCENS*

Piotr Celejewski-Marciniak<sup>1\*</sup>, Stefan Tyski<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny  
<sup>2</sup>Zakład Antybiotyków i Mikrobiologii, Narodowy Instytut Leków

Wpłynęło w lipcu 2011 r.

1. Wstęp. 2. Klasyfikacja w obrębie rodzaju *Serratia*. 2.1. Metody fenotypowania szczepów. 2.2. Metody genotypowania szczepów. 3. Czynniki wirulencji – charakterystyka i zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym. 4. Chorobotwórczość. 5. Oporność na antybiotyki. 6. Podsumowanie

## Bacilli of the genus *Serratia*: species characteristics, pathogenicity and antibiotic resistance of *Serratia marcescens*

**Abstract:** Bacilli of the genus *Serratia* belong to *Enterobacteriaceae* family and they play important role as an opportunistic pathogen in nosocomial infections. Genus *Serratia*, consisting of ten species, was stated in 1990<sup>th</sup>, when bacterial systematics has been enlarged by analysis of ribosomal 16S rRNA nucleotide sequences. The most vital traits characterising genus *Serratia* are: particular species' ability to produce red pigment – prodigiosin and extracellular enzymes enabling colonization of the host.

*S. marcescens* is a microbe of a dominant clinical importance, which is isolated from various material. Great ability to colonise human organism, *S. marcescens* owes to number of virulence factors, which facilitate bacterial cells adhesion, protect from host's immune system and simplify tissue penetration. *S. marcescens* is responsible for numerous hospital outbreaks occurring in immunodeficient patients, particularly newborns and patients cured in Emergency Departments. In typing of the strains RAPD and PFGE methods are usually applied. *S. marcescens* is said to be a pathogen resistant to different groups of antibiotics. Resistance genes located on mobile genetic elements, responsible for widespread resistance to carbapenems, are particularly dangerous.

1. Introduction. 2. Classification of genus *Serratia*. 2.1. Phenotyping methods. 2.2. Genotyping methods. 3. Virulence factors. 4. Pathogenicity. 5. Antibiotic resistance. 6. Summary

**Słowa kluczowe:** *Serratia*, *Serratia marcescens*, genotypowanie, fenotypowanie, czynniki wirulencji, oporność na antybiotyki

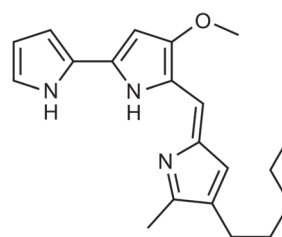
**Key words:** *Serratia*, *Serratia marcescens*, genotyping, phenotyping, virulence factors, antibiotic resistance

## 1. Wstęp

Od czasów starożytnych znane i opisywane były przypadki zabarwienia żywności na kolor krwistoczerwony. Interpretacja takich zjawisk była niezwykle trudna, gdyż do roku 1819 nie znano czynnika wywołującego te niecodzienne zdarzenia. Przez stulecia w tym zjawisku dopatrywano się kontekstu religijnego związanego z pojawianiem się krwi Chrystusa w badanej potrawie. Wątpliwości rozwiązał włoski farmaceuta Bartolomeo B i z i o, który jako członek zespołu badającego jedno z takich „cudownych” zjawisk udowodnił obecność drobnoustroju w badanej próbce żywności (do doświadczenia użyto tradycyjnego włoskiego dania – polenty) oraz potwierdził związek pomiędzy obecnością szczepu *Serratia marcescens*, a krwistoczerwonym zabarwieniem dania [84]. W ten sposób opisał izolację bakterii, której nazwa rodzajowa *Serratia* pochodzi od nazwiska włoskiego inżyniera Serafino S e r r a t i e g o, a nazwa opisowa *marcescens* pochodzi od łacińskiego słowa oznaczającego znikanie, wietrzenie.

Przez dziesięciolecia rodzaj *Serratia* ograniczał się jedynie do drobnoustrojów posiadających zdolność pro-

dukcji czerwonego barwnika – prodigiozyny (Rys. 1). Jest on zaliczany do grupy wtórnych metabolitów, naturalnych barwników aminowych zawierających w swej



Rys. 1. Wzór cząsteczki prodigiozyny

cząsteczce trzy pierścienie pirolowe. Oprócz wybranych przedstawicieli rodzaju *Serratia*, prodigiozynę wytwarzają niektóre szczepy z rodzaju *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Alteromonas* i *Streptomyces* [30]. Podstawowym czynnikiem mającym znaczący wpływ na wydajność produkcji czerwonego barwnika jest temperatura inkubacji. Obserwacje laboratoryjne mają bezpośrednie przełożenie na dane doświadczalne mówiące o spadku produkcji prodigiozyny od trzech do nawet dwudziestu razy, przy podwyższeniu temperatury inkubacji z 30°C do 37°C [38].

\* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Oczki 3, 02-007 Warszawa, e-mail; pcelejewski@wum.edu.pl

Tabela I  
Wpływ maltozy, glukozy oraz temperatury na produkcję prodigiozyny przez szczep *S. marcescens* [14, 32]

Rodzaj podłoża	Temperatura inkubacji oraz stężenie prodigiozyny [mg/ml]		
	28°C	30°C	37°C
Bulion odżywczy	0,52	0,354	0,111
Bulion odżywczy z dodatkiem 0,5% maltozy	1,836	0,79	0,104
Bulion odżywczy z dodatkiem 0,5% glukozy	1,689	0,29	0,104
Bulion z nasionami sezamu	16,68	9,3	0,319
Bulion z nasionami sezamu z dodatkiem 0,5% maltozy	9,43	8,56	1,63
Bulion z nasionami sezamu z dodatkiem 0,5% glukozy	1,47	1,16	0,42

Źródło węgla stanowi kolejny ważny czynnik wpływający na wydajność syntezy prodigiozyny. W pierwszej części eksperymentu prowadzonego przez G r i i wsp. [32] wykazano zróżnicowany wpływ cukrów na syntezę prodigiozyny (Tab. I.). W przypadku bulionu odżywczego, stanowiącego dość ubogie źródło węgla, dodatek maltozy lub glukozy zwiększa syntezę prodigiozyny. Efekt przeciwny uzyskano w przypadku bulionu wzbogaconego sproszkowanymi nasionami sezamu. Uzyskana represja syntezy prodigiozyny jest prawdopodobnie wynikiem nasilenia się zjawiska represji katabolicznej w obecności glukozy i maltozy [32]. Ponadto autorzy podkreślają duże znaczenie kwasów tłuszczowych jako czynników wzmagających syntezę czerwonego barwnika. W dalszych badaniach wykazano, że dodatek sproszkowanych nasion orzechów ziemnych najsilniej stymulował szczepy *S. marcescens* do produkcji prodigiozyny. Bulion z dodatkiem oleju z orzechów ziemnych pozwalał uzyskać dwudziestokrotnie więcej barwnika w podłożu niż taki sam bulion z dodatkiem sproszkowanych orzechów laskowych. Uzyskany wynik wskazuje na podstawowe znaczenie nasyconych kwasów tłuszczowych obecnych w nasionach na wzrost *S. marcescens* i tym samym na produkcję czerwonego barwnika [32].

Synteza prodigiozyny w komórkach bakteryjnych zależy od gęstości zawiesiny hodowlanej lub średnicy pojedynczych kolonii. Bakterie w fazie logarytmicznego wzrostu produkują bardzo niewiele barwnika. Wzrost gęstości hodowli stymuluje syntezę oraz transport czynników regulujących wytwarzanie prodigiozyny [45]. W przypadku hodowli na podłożu stałym, czerwony barwnik wytwarzany jest przez kolonie, których średnica przekracza jeden milimetr [38].

Czerwony pigment wytwarzany przez bakterie z rodzaju *Serratia* prawdopodobnie pełni rolę w procesie oddychania. W ostatnich latach starano się wyjaśnić rolę prodigiozyny w metabolizmie komórkowym i jej unikatowe właściwości. Pierwszą ważną obserwacją było

udokumentowanie efektu proapoptotycznego barwnika uzyskanego wobec wybranych linii komórek nowotworowych z jednoczesnym brakiem takiej reakcji u zdrowych komórek [64]. Dalsze badania doprowadziły do opisanie wpływu prodigiozyny na limfocyty-T i wywołania efektu immunosupresyjnego, który obecnie jest szeroko analizowany w ramach badań klinicznych I i II fazy [99]. Badania prowadzone z udziałem zwierząt wskazują na leczniczy wpływ prodigiozyny w początkowych stadiach niektórych chorób cywilizacyjnych m.in. cukrzycy [100].

## 2. Klasyfikacja w obrębie rodzaju *Serratia*

Odkrycie bakterii zdolnej do produkcji czerwonego barwnika doprowadziło do wyodrębnienia nowego gatunku, który przez wiele lat pozostawał jedynym przedstawicielem rodzaju *Serratia*. Początkowe prace badawcze zawężyły ocenę tego rodzaju bakterii jedynie do zdolności produkcji czerwonego barwnika. Jeszcze w 1975 roku, VIII wydanie Bergey's Manual of Determinative Bacteriology wskazywało na istnienie wyłącznie jednego gatunku w obrębie rodzaju *Serratia*. Obszerne badania biochemiczne przeprowadzone w latach siedemdziesiątych XX wieku przez zespół G r i m o n t ' a zaliczyły do rodzaju *Serratia* obok *S. marcescens* trzy inne gatunki: *S. marinorubia*, *S. liquefaciens* i *S. plymuthica* [36]. Dopiero opublikowanie pracy poświęconej analizie sekwencji nukleotydowych kodujących 16S rRNA w roku 1990, pozwoliło uformować obecnie obowiązującą klasyfikację rodzaju obejmującą 10 gatunków: *S. grimesi*, *S. liquefaciens*, *S. proteamaculans*, *S. fonticola*, *S. plymutica*, *S. ficaria*, *S. entomophila*, *S. odorifera*, *S. marcescens*, *S. rubidaea* [19].

Wszystkie gatunki z wyjątkiem *S. fonticola* posiadają szereg wspólnych cech biochemicznych, które pozwalają na identyfikację i zaklasyfikowanie badanego drobnoustroju do odpowiedniego gatunku. Wybrane, istotne próby biochemiczne przedstawiono w Tabeli II.

Szczepy *S. fonticola* w sposób znaczący odbiegają profilem biochemicznym od pozostałych przedstawicieli rodzaju *Serratia*. W 1965 roku Leclerc i Buttiaux zaproponowali powstanie nowej grupy w obrębie rodziny *Enterobacteriaceae* obejmującej drobnoustroje biochemicznie podobne do rodzaju *Citrobacter*, ale na tyle wyróżniające się, że włączenie ich do jednego rodzaju byłoby niemożliwe. W tej grupie zwanej „*Citrobacter-like bacteria*” *S. fonticola* była obecna do roku 1979, w którym opublikowano wyniki hybrydyzacji DNA-DNA dokumentujące duże podobieństwo sekwencji DNA *S. fonticola* i pozostałych gatunków z rodzaju *Serratia* [29] (Tab. III).

Rodzaj *Serratia* zaliczany jest do względnie beztlenowych, Gram-ujemnych pałeczek z rodziny *Enterobacte-*



Tabela II

Wybrane reakcje biochemiczne charakteryzujące gatunki z rodzaju *Serratia* [14, 19]

Reakcja / Cecha	<i>S. marcescens</i>	<i>S. entomophila</i>	<i>S. ficaria</i>	<i>S. fonticola</i>	<i>S. grimesi</i>	<i>S. liquefaciens</i>	<i>S. odorifera</i>	<i>S. plymuthica</i>	<i>S. proteamaculans</i>	<i>S. rubidaea</i>
Produkcja prodigiozyny	+/-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	+
Zapach ziemniaczany	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+/-
Wytwarzanie indolu	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Rozkład lizyny	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+/-
Rozkład ornityny	+	-	-	+	+	+	+/-	-	+	-
Rozkład argininy	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Hydroliza Tween 80	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Wykorzystanie jako źródło węgla:										
L-arabinoza	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D-arabitol	-	+/-	+	+	-	-	-	-	-	+
L-arabitol	+	+/-	+	+	-	-	+	-	-	-
Erytrytol	+/-	-	+	+	-	-	+/-	-	+/-	+
Maltitol	-	-	+	+/-	+	+/-	-	+	+	+
D-rafinoza	-	-	+	+	+	+	+/-	+	+	+
L-ramnoza	-	-	+	+	-	-	+	-	+/-	-
D-sorbitol	+	-	+	+	+	+	+	+/-	+/-	-
Ksylitom	+	-	+	+/-	-	-	+	-	-	+
D-ksyloza	-	+/-	+	+/-	+	+	+	+	+	+
Wzrost w temperaturze 5°C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Wzrost w temperaturze 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+
Wzrost w temperaturze 40°C	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+/-
Wzrost w obecności 7% NaCl	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+
Wzrost w obecności 8,5% NaCl	+/-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Wzrost w obecności 10% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-

Tabela III

Cechy i reakcje różnicujące *S. fonticola* od pozostałych gatunków rodzaju *Serratia* [14, 19]

Cecha	Rodzaj <i>Serratia</i> z wyjątkiem <i>S. fonticola</i>	<i>S. fonticola</i>
1. Wykorzystanie jako jedynego źródła węgla maślan amonu	+	-
Kaprynian	+	-
Kapronian	+	-
Kaprylan	+	-
D-dulcytol	-	+
L-fukoza	+	-
propionian fenylu	-	+
Tagatoza	-	+
Tyrozyna	+	-
2. Próba Voges-Proskauer'a	+	-
3. Hydroliza żelatyny (żelatynaza)	+	-
4. Hydroliza maślanu (lipaza)	+	-
5. Deoksyrybonukleaza	+	-
6. Procentowa zawartość guaniny i cytozyny w DNA	52-60	49-52

*riaceae*. Ogólne cechy charakteryzujące rodzaj obejmują zdolność do ruchu drobnoustrojów przy pomocy wici, niewielkie wymagania pokarmowe oraz względnie szeroką tolerancję na zróżnicowaną temperaturę inkubacji wahającą się między +10°C a +36°C. Wszystkie szczepy z rodzaju *Serratia* wykazują dodatnie wyniki w próbach na obecność katalazy oraz fermentację glukozy.

### 2.1. Metody fenotypowania szczepów

Unikatowe cechy bakterii takie jak produkcja bakteriocyn, rozpoznawanie drobnoustrojów przez swoiste bakteriofagi oraz zróżnicowany i specyficzny profil antygenów, stanowią ważną cechę diagnostyczną wykorzystywaną w analizie fenotypowej szczepów. Wyniki poszukiwania artykułów naukowych dotyczących poszczególnych gatunków z rodzaju *Serratia* przedstawiono w tabeli IV.

Ponad 92% stanowiły abstrakty publikacji zawierające w dowolnym fragmencie hasło „*Serratia marcescens*”, tak więc szereg danych na temat rodzaju *Serratia*

Tabela IV  
Wyniki wyszukiwania haseł w abstraktowej bazie PubMed

Hasło	Liczba wyników
<i>Serratia marcescens</i>	6213
<i>Serratia entomophila</i>	32
<i>Serratia fonticola</i>	35
<i>Serratia ficaria</i>	19
<i>Serratia grimesii</i>	12
<i>Serratia liquefaciens</i>	240
<i>Serratia odorifera</i>	35
<i>Serratia plymuthica</i>	78
<i>Serratia proteamaculans</i>	51
<i>Serratia rubidaea</i>	35
	$\Sigma = 6750$

Dane na dzień 12.10.2011 r.

ogranicza się wyłącznie do informacji na temat gatunku *S. marcescens*. Takie jednostronne zainteresowanie prawdopodobnie jest uzasadnione izolacją szczepów ze środowiska szpitalnego, które podlegają stałej analizie i w konsekwencji stają się tematem publikacji.

*S. marcescens* z uwagi na dominację potencjalnych czynników chorobotwórczych, wśród klinicznych izolacji bakterii z rodzaju *Serratia*, posiada szczegółowy profil fenotypowy stanowiący podstawę charakterystyki szczepów, obecnie ustępujący miejsca genotypowaniu.

Podstawowy schemat serotypowania szczepów *S. marcescens* opiera się na różnicach w budowie antygeny O stanowiącego element cząsteczki lipopolisacharydu (LPS). Pierwsze prace poświęcone analizie antygenów O szczepów *S. marcescens* pojawiły się w latach sześćdziesiątych XX wieku [20]. Kolejne lata przyniosły doniesienie o identyfikacji nowych serotypów [36, 43, 92]. Obecny schemat opiera się na wykrywaniu 29 antygenów O [7].

Prowadzone badania wykazały szereg problemów związanych z walidacją metod oraz wskazywały na możliwość krzyżowych reakcji różnych antygenów O z jednym przeciwciałem, co uniemożliwiało prawidłową interpretację wyników. Najpoważniejsze trudności dotyczyły antygeny O14, bowiem uzyskana dla niego surowica odpornościowa dawała fałszywie dodatnie wyniki z antygenami O1, O6 i O12 [28]. Analiza oczyszczonej frakcji LPS szczepów o swoistych serotypach w wielu przypadkach ukazała obecność nie jednej, a dwóch powtarzających się jednostek oligosacharydowych o odmiennych własnościach chemicznych [7]. Pierwsza z nich wchodziła w skład cząsteczki polisacharydu o pH obojętnym, co jest typowe dla polisacharydów LPS. Druga jednostka oligosacharydowa miała charakter kwaśny, co wskazywało na pochodzenie otoczkowe. Weryfikacja hipotezy obejmowała w pierwszym etapie potwierdzenie obecności otoczki, a następnie wykonanie reakcji

pęcznienia otoczek (tzw. Quellung Reaction), która potwierdza pozytywną interakcję przeciwciał z antygenami otoczkowymi. Uzyskane dane pozwoliły opracować nowe, bardziej precyzyjne schematy identyfikacji antygenów O u *S. marcescens*, a także umożliwiły wdrożenie nowej procedury serotypowania z wykorzystaniem antygenów otoczkowych tzw. K-antygenów i łączenie obu schematów w jedno oznaczenie wykonywane w postaci testu ELISA [6]. Powyższy schemat serotypowania *S. marcescens* został wprowadzony do rutynowej diagnostyki w jednym z londyńskich szpitali pozwalając na scharakteryzowanie 98% szczepów w badanej kolekcji [5].

Metody opierające się na fagotypowaniu oraz analizie aktywności bakteriocyn zostały dobrze opisane w latach sześćdziesiątych i siedemdziesiątych XX wieku [24, 39, 70]. Od tego czasu praktycznie zaniechano wykorzystywania obu technik do charakterystyki szczepów *S. marcescens*, mimo iż mogłyby stanowić dodatkowy element dopełniający analizę drobnoustrojów izolowanych zarówno ze środowiska szpitalnego jak i ze środowiska naturalnego.

## 2.2. Metody genotypowania szczepów

Techniki fenotypowania stają się metodami przeszłości i ich znaczenie ulega systematycznie postępującej marginalizacji. Następuje dynamiczny rozwój metod genetycznych, które obecnie stanowią nieodłączny element każdego dochodzenia epidemiologicznego oraz każdej kompletnej charakterystyki klinicznych szczepów. Powszechne wykorzystanie metod genetycznych wynika przede wszystkim z dużej czułości, precyzji oraz szybkości wykonania.

Analiza polimorfizmu losowo zampifikowanych fragmentów DNA (RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA) stanowi podstawową metodę genotypowania szczepów *S. marcescens*, stosowaną w celu wstępnej ich charakterystyki. W przypadku takich analiz projektowane primery liczą od 10 do 12 zasad z przewagą guaniny i cytozyny, co odpowiada typowej średniej zawartości zasad GC wynoszącej u szczepów *Serratia* od 52 do 60% [14].

Opisywano przypadki epidemii wywołanych przez jeden szczep *S. marcescens* w różnym czasie u wielu pacjentów, kiedy kosztowne i czasochłonne dochodzenie epidemiologiczne zostało ograniczone jedynie do wykorzystania metody RAPD potwierdzającej tożsamość profili wszystkich badanych izolatów [22]. Prowadzone dochodzenia epidemiologiczne na zróżnicowanych kolekcjach szczepów *S. marcescens* wykazują przydatność metody RAPD oraz potwierdzają możliwość rutynowego jej stosowania w warunkach szpitalnych [71, 78, 95, 97].

Badanie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP – Restriction Fragment Length Polymor-

phism) jest kolejną metodą charakteryzującą genetyczne podobieństwo badanych szczepów. DNA użyty do przeprowadzenia analizy może być pochodzenia genomowego [76, 91] lub rybosomalnego [1, 72]. Do tej pory nie wykorzystano możliwości analizy RFLP dla DNA pochodzenia plazmidowego, mimo iż szczepy kliniczne *S. marcescens* posiadają liczne i różnorodne profile plazmidowe [3].

Metoda AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism jest modyfikacją metody RFLP. Cała analiza zostaje wzbogacona o reakcję PCR, którą prowadzi się po trawieniu enzymami restrykcyjnymi. Mimo stale ukazujących się doniesień naukowych wykorzystujących tę metodę do charakterystyki szczepów z bardzo różnych gatunków, w obrębie rodzaju *Serratia* opublikowano zaledwie jedną oryginalną publikację, w której autorzy opierają się na analizie polimorfizmu długości amplifikowanych fragmentów DNA [13].

Ze wszystkich metod służących genotypowaniu drobnoustrojów, elektroforeza w zmienny polu elektrycznym (PFGE – Pulsed Field Gel Electrophoresis) najbardziej zrewolucjonizowała badania nad pokrewieństwa genomów. Elektroforeza pulsacyjna nadal pozostaje złotym standardem stosowanym w typowaniu szczepów bakteryjnych, także z rodzaju *Serratia*. Typowym enzymem restrykcyjnym stosowanym w badaniu jest rzadko tnący enzym SpeI, rozpoznający obszary sekwencji DNA o podwyższonej zawartości zasad AT. [27, 51, 81]. Alternatywa dla typowania szczepów *S. marcescens* przy użyciu elektroforezy pulsacyjnej została wskazana przez K r a w c z y k i wsp. W badaniu prowadzonym na 88 klinicznych izolatach *S. marcescens* wykazano porównywalną sprawność dyskryminacyjną elektroforezy pulsacyjnej oraz nowej metody ADSRRS-fingerprinting (Amplification of DNA fragments Surrounding Rare Restriction Sites) opracowanej w Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków w Warszawie [59]. Autorzy wskazali na bardzo zbliżone rezultaty uzyskane dzięki obu metodom z podkreśleniem większej prostoty i szybkości analizy w przypadku ADSRRS-fingerprinting [47]. Pomimo podjęcia prób zastąpienia metody PFGE, tańszymi i prostszymi rozwiązaniami w chwili obecnej nie widać alternatywy, która mogłaby odebrać dominującą pozycję elektroforezie pulsacyjnej, jako metodzie wzorcowej, ostatecznie potwierdzającej pokrewieństwo badanych izolatów.

### 3. Czynniki wirulencji – charakterystyka i zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym

Czynniki wirulencji wytwarzane przez drobnoustroje przede wszystkim służą im jako narzędzia ułatwiające kolonizację komórek gospodarza. W przypadku rodzaju *Serratia* mamy do czynienia z szeregiem cech umożliwiających adaptację do trudnych warunków wzrostu

oraz ułatwiających kolonizację komórek gospodarza. Jednym z podstawowych mechanizmów regulujących produkcję różnych czynników wirulencji jest system porozumiewania się komórek tzw. „quorum sensing”. Rodzaj *Serratia* wykorzystuje przede wszystkim do tego celu cząsteczki AHL będące acetylowanymi pochodnymi laktonu homoseryny, które powszechnie pełnią funkcje „hormonów” bakterii Gram-ujemnych. Cząsteczki AHL wytwarzane są w sposób konstytutywny. Przy niewielkim zagęszczeniu komórek bakteryjnych, nowo powstałe cząsteczki AHL są wydalane na zewnątrz komórki. Wraz z zagęszczaniem się hodowli stężenie pochodnych laktonu homoseryny w otoczeniu bakterii jest na tyle duże, że część cząstek zawraca z powrotem do wnętrza komórki, w której wiąże się z białkiem regulatorowym R stymulującym transkrypcję wielu ważnych białek odpowiedzialnych za produkcję enzymów pozakomórkowych, czerwonego barwnika prodigiozyny, adhezję do różnych powierzchni, a także „wzbudzenie ruchowe” tzw. „swarming motility” [33, 79].

Mniej poznany system komunikacji drobnoustrojów z rodzaju *Serratia* opiera się o niskocząsteczkowy induktor zwany AI-2 (ang. Autoinducer-2). Liczba gatunków zarówno bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych, u których potwierdzono obecność AI-2 najprawdopodobniej świadczy o możliwości komunikacji pomiędzy drobnoustrojami różnych gatunków oraz rodzajów [93].

„Wzbudzenie ruchowe” lub „mrowienie” charakterystyczne dla szczepów *Serratia* sp. jest złożonym zjawiskiem zachodzącym w obrębie dojrzałych kolonii. Niesie ze sobą zmiany w morfologii kolonii, a także zmiany fizjologiczne zachodzące wewnątrz komórek drobnoustrojów. Aby proces „mrowienia” mógł zajść prawidłowo, komórki *S. marcescens* muszą skoordynować swoje działanie wykorzystując do tego celu szereg sygnałów. W pierwszym etapie w brzegowych rejonach kolonii, komórki bakteryjne ulegają różnicowaniu i z krótkich, ruchomych pałeczek przeistaczają się w wydłużone, rozlane komórki, które w skoordynowany sposób korzystając z wici przemieszczają się w kierunku zewnętrznym [42]. Cały proces musi odbywać się w sprzyjających warunkach środowiskowych. W laboratorium zjawisko „wzbudzenia ruchowego” obserwowane jest podczas inkubacji szczepów w temperaturze +30°C na podłożu z 0,8% agarozą. Jest to konsekwencja wzmożonej produkcji biosurfaktantu oraz wzmożonej aktywności wici [88].

Adhezja komórek bakterii do podłoża stanowi kluczowy etap zakażenia, który rozpoczyna kaskadę reakcji prowadzącą do kolonizacji danego gospodarza. Powszechność występowania szczepów *S. marcescens* jest w dużej mierze uwarunkowana przez zdolność adhezji komórek bakterii zarówno do powierzchni ożywionych, jak i nieożywionych [50].

Skuteczność adhezji komórek *S. marcescens* zależy m.in. od obecności wici, fimbrii, białek zewnętrzno-błonowych oraz systemu komunikacji „quorum sensing”. Bardzo często prowadzi to do wzrostu szczepów *S. marcescens* w formie biofilmu, który znacznie trudniej poddaje się działaniu antybiotyków i środków dezynfekcyjnych [86].

Właściwości hydrofobowe (CSH – Cell Surface Hydrophobicity) pałeczek z rodzaju *Serratia* zostały opisane w latach trzydziestych XX wieku [65]. Zaliczono je do niespecyficznych czynników adhezji, które ułatwiają kolonizację w obrębie dróg moczowych, szczególnie po wprowadzeniu cewnika oraz podczas stosowania soczewek kontaktowych [77]. Ponadto wykazano dodatni wpływ suboptymalnych stężeń antybiotyków stosowanych w leczeniu [54] oraz efektu poantybiotykowego [55] na właściwości hydrofobowe pałeczek *S. marcescens*.

Ostatnie badania prowadzone przez Lin i wsp. wskazują na istnienie szlaku trzech czynników RssAB-FlhDC-ShlBA, które odgrywają kluczową rolę w różnicowaniu się komórek i regulacji mechanizmów patogeny. Oprócz potencjalnych, niezidentyfikowanych mediatorów, znaczący wpływ na wspomniany szlak ma temperatura w jakiej przebywają drobnoustroje. W 37°C kinaza RssAB ulega aktywacji hamując czynnik FlhDC, który nie może zainicjować produkcji hemolizyny ShlA oraz zewnętrznego białka błonowego ShlB. Komórki *S. marcescens* stają się podatne na tworzenie biofilmu oraz obniżenie cytotoxycywności drobnoustrojów. Spadek temperatury do 30°C stymuluje wytwarzanie hemolizyny oraz powoduje różnicowanie się komórek i „wzbudzenie ruchowe”. W tym stanie komórki bakteryjne charakteryzuje wysoka inwazyjność oraz zjadliwość, która w ustroju gospodarza wywołuje aktywację układu odpornościowego, lizę erytrocytów oraz penetrację bakterii przez komórki nabłonkowe [52].

Wykazano kluczową rolę lipidu A lipopolisacharydu (LPS) *S. marcescens* w inicjacji procesu zapalenia płuc. Lipid A odpowiedzialny jest za indukcję syntezy TNF-alfa, IL-6 oraz tlenu azotu przez makrofagi, której wielkość zależy od stężenia lipidu-A *S. marcescens* w zakażonych tkankach [56].

Ważną i bardzo zróżnicowaną grupę czynników wirulencji stanowią pozakomórkowe enzymy wydzielane przez szczepy *S. marcescens*. Jest to cecha wyróżniająca rodzaj *Serratia* wśród wszystkich pałeczek *Enterobacteriaceae*. Zdolność wytwarzania pozakomórkowych enzymów jest jedną z cech diagnostycznych całego rodzaju oraz poszczególnych gatunków (z wyjątkiem *S. fonticola*) [14].

Do najważniejszych enzymów produkowanych przez *S. marcescens* zaliczane są: nukleaza, chitynazy, lipazy, żelatynazy, kazeinazy, proteazy, hemolizyny.

Endonukleaza syntetyzowana przez *S. marcescens* należy do najlepiej opisanych enzymów wytwarzanych

przez Gram-ujemne pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* [17]. Posiada ona zdolność hydrolizy zarówno DNA jak i RNA. W naturze aktywny enzym występuje w postaci dimeru. Uzyskany doświadczalnie monomer endonukleazy *S. marcescens* posiada takie samo spektrum substratowe, choć badania kinetyki reakcji w warunkach wysokiego stężenia substratu oraz niskiego stężenia enzymu wskazują na sprawniejsze funkcjonowanie układu dimerycznego [17].

Rozkład chityny stanowi ważny element obiegu materii w przyrodzie, w którym szczepy *S. marcescens* odgrywają istotną rolę. Wytwarzanie enzymów z grupy chitynaz uaktywnia się pod wpływem obecności chityny w podłożu wzrostowym [15]. Na podstawie homologii sekwencji aminokwasowej, chitynazy dzielimy na dwie rodziny różniące się mechanizmem reakcji hydrolizy wiązań glikozydowych w cząsteczce chityny. Środowiskowe szczepy *S. marcescens* mogą wytwarzać w sumie 4 różne chitynazy (A, B, C1, C2) [90]. Zainteresowanie chitynazami *S. marcescens* wynika przede wszystkim z potencjału biotechnologicznego, jaki niesie pozyskanie narzędzi do rekultywacji materii nieprzyswajalnej m.in. po zakończonej fermentacji z udziałem grzybów [1].

Lipazy syntetyzowane przez *S. marcescens* jako czynniki ułatwiające penetrację błon białkowo-lipidowych komórek gospodarza, w ostatnich latach znalazły szerokie zastosowanie w naukach farmaceutycznych. Dzięki zdolności do stereoselektywnej hydrolizy wiązań estrowych, lipazy *S. marcescens* stały się tanią i wydajną alternatywą dla produkcji chiralnych substancji leczniczych takich jak flurbiprofen [49], czy diltiazem [26].

Kliniczne szczepy *S. marcescens* mają zdolność produkcji szeregu proteaz, które w bardzo różny sposób ułatwiają kolonizację komórek gospodarza. Jednym z ważnych przykładów jest enzym po raz pierwszy wykryty w szczepie *Serratia* 56K. Proteaza 56K posiada zdolność inicjacji kaskady powstawania czynników zapalnych. Efektem działania tego enzymu była nadprodukcja bradykinin oraz wzrost przepuszczalności naczyń krwionośnych, co skutkowało zainicjowaniem reakcji zapalnej, a także umożliwiała komórkom drobnoustrojów lepszą penetrację tkanek gospodarza [63].

Obecnie prowadzone badania nad enzymami proteolitycznymi *S. marcescens* koncentrują się wokół potencjalnego zastosowania w przemyśle m.in. w katalizie organicznej, w której wykorzystywano aktywność enzymu proteolitycznego stabilnego i aktywnego w rozpuszczalniku organicznym [58].

U *S. marcescens* zidentyfikowano i opisano dwa rodzaje hemolizyn. Pierwszą grupę stanowią toksyny zwiększające przepuszczalność błon komórkowych. Hemolizyna ShlA wykazuje działania hemolityczne i cytotoxycywność na komórki erytrocytów a także wyzwała syntezę czynników prozapalnych w komórkach nabłonkowych, zwiększając inwazyjność szczepu [52]. Druga grupa

hemolizyn zaliczana jest do toksyn o aktywności fosfolipazy-A. Mechanizm działania polega na degradacji cząsteczek fosfolipidów błony komórkowej erytrocytów. Hemolizyna PlaA została zidentyfikowana po raz pierwszy u *S. liquefaciens* [32], a hemolizyna PhIA opisana u *S. marcescens* [87].

#### 4. Chorobotwórczość

*S. marcescens* początkowo uważana była za niegroźny drobnoustroj saprofityczny zasiedlający głównie środowisko wodne. Pierwsze udokumentowane przypadki zakażeń u ludzi stwierdzono na terenie Wielkiej Brytanii na początku XX wieku. Od tego czasu notowano kolejne doniesienia o infekcjach dróg moczowych, wsierdza, zapaleniach opon mózgowych oraz sepsie [8]. Pierwsza potwierdzona epidemia szpitalna *S. marcescens* została spowodowana niedokładnie umyтыми nebulizatorami. Na terenie opisanego oddziału w ciągu dwóch miesięcy zanotowano siedmiokrotny wzrost częstości izolacji *S. marcescens* [82]. Już wtedy autorzy dostrzegali pilną potrzebę uznania *S. marcescens* za patogen człowieka mogący wywoływać poważne zakażenia prowadzące do zgonów.

Obecnie *S. marcescens* bezsprzecznie jest zaliczana do drobnoustrojów wywołujących oportunistyczne zakażenia u ludzi, szczególnie w przypadkach obniżonej odporności, wielokierunkowej antybiotykoterapii, zwłaszcza u noworodków i małych dzieci [4, 16].

Ostatnie dziesięć lat wskazuje na wyraźne nasilenie się problemu zakażeń szpitalnych wywołanych przez *S. marcescens* w oddziałach neonatologicznych i pediatrycznych. W zależności od badanego ośrodka, izolaty *S. marcescens* stanowią od 5 do 16% zakażeń szpitalnych wśród noworodków i niemowląt [25, 35]. W Polsce odsetek zakażeń *S. marcescens* znacznie odbiega od danych europejskich. Szacunkowe dane uzyskane z warszawskich szpitali pediatrycznych mówią o maksymalnie kilku izolacjach *S. marcescens* w ciągu roku, co najprawdopodobniej wynika z wysokich standardów opieki oraz wyszkolenia personelu pracującego w tych placówkach. Światowe doniesienia koncentrują się głównie na opisach przypadków zakażeń będących konsekwencją niedopełnienia procedur sanitarnych, głównie związanych z nieprawidłową higieną i dezynfekcją rąk oraz niestosowaniem rękawic ochronnych przez personel medyczny [57]. Szybko postępujący przebieg zakażenia i wysoka śmiertelność sięgająca prawie 50% wskazują na konieczność stałego monitorowania zakażeń wywołanych przez szczepy *S. marcescens* na oddziałach noworodkowych i pediatrycznych [95], mimo iż w Polsce *S. marcescens* nie jest zaliczana do grupy drobnoustrojów alarmowych.

Jedną z przyczyn epidemii są zanieczyszczone przez drobnoustroje chorobotwórcze produkty lecznicze podawane drogą dożylną np.: epidemia zakażeń

pałeczkami *S. marcescens* spowodowana zanieczyszczonymi roztworami heparyny oraz soli fizjologicznej, dopuszczonymi do obrotu na terenie Stanów Zjednoczonych [12]. Od 3 października 2007 roku do 3 stycznia 2008 roku zgłoszono do amerykańskiego Centrum Zapobiegania i Zwalczenia Chorób (CDC – Centers for Disease Control and Prevention) 162 przypadki izolacji *S. marcescens* z posiewów krwi. Dochodzenie epidemiologiczne potwierdziło błędną procedurę przygotowania jałowych leków przez firmę farmaceutyczną na etapie produkcji przemysłowej. Większość opisywanych przypadków dotyczy zaniedbań i braku wyszkolenia personelu będącego ostatnim ogniwem, przygotowującym i podającym lek pacjentowi. Przykładem są powtarzające się przypadki epidemii wywołanych podaniem skażonego propofolu [42, 66]. Przyczyną były błędne procedury, które umożliwiały podział preparatów jednodawkowych zawierających propofol, co doprowadziło do kontaminacji leku.

#### 5. Oporność na antybiotyki

*S. marcescens* zaliczana jest do drobnoustrojów opornych na liczne grupy antybiotyków. Źródłem wysokiej oporności szczepów są geny zlokalizowane zarówno w chromosomie bakteryjnym jak i w ruchomych elementach genetycznych. Antybiotyki  $\beta$ -laktamowe są często lekami pierwszego rzutu w leczeniu zakażeń wywołanych przez pałeczki Gram-ujemne z rodziny *Enterobacteriaceae*.

Problem stosowania antybiotyków  $\beta$ -laktamowych w zakażeniach *S. marcescens* wynika z coraz częstszej obecności kodowanych chromosomalnie  $\beta$ -laktamaz klasy C w badanych szczepach. W warunkach naturalnych, ekspresja genu *ampC* u szczepów *S. marcescens* jest zwykle minimalna. Dopiero w obecności induktorów takich jak cefazolina, amoksycylina, kwas klawulanowy następuje derepresja *ampC* i szybki wzrost stężenia cefalosporynazy w komórce bakterii. Obecność *ampC* warunkuje wysoką oporność na wszystkie penicyliny, cefalosporyny pierwszej, drugiej i trzeciej generacji, aztreonam oraz brak wrażliwości na inhibitory  $\beta$ -laktamaz takie jak sulbaktam czy kwas klawulanowy.

Nieodpowiednie użycie antybiotyków  $\beta$ -laktamowych może grozić selekcją mutantów z naturalnie wysoką ekspresją genu *ampC*. Leczenie jest trudne i wymaga indywidualnego podejścia. Antybiotykami o udowodnionej skuteczności przeciwko szczepom *S. marcescens ampC*-dodatnim są: cefepim oraz karbapenemy [74], jednakże obniżona przepuszczalność błony komórkowej bakterii może znacznie obniżyć skuteczność terapeutyczną tych leków [89].

Ciekawym i unikatowym zjawiskiem spotykanym u rodzaju *Serratia* jest nieproporcjonalnie długi obszar

niepodlegający translacji (tzw. 5'-UTR) poprzedzający sekwencję mRNA kodującą właściwe geny *ampC*. Dowiedziano, że jest on odpowiedzialny za utworzenie drugorzędowej struktury typu „spinka do włosów”, która znacznie wydłuża okres półtrwania transkryptu, umożliwiając tym samym efektywniejszą produkcję białka [53].

Enzymy typu ESBL ( $\beta$ -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym) u szczepów *S. marcescens* są powszechnie wykrywane w ramach rutynowej diagnostyki szpitalnej. Częstość izolowania szczepów *S. marcescens* ESBL-dodatnich na terenie Polski jest zróżnicowana i wynosi od poniżej 20% [71], przez około 50% [93], do ponad 70% [24, 63] w zależności od miejsca i czasu izolacji, a także metody identyfikacji fenotypu ESBL(+). Dominującą rolę odgrywa enzym ESBL zaliczany do typu CTX-M3, który jest typowy dla izolatów pałeczek *Enterobacteriaceae* z obszaru Europy Środkowej i Wschodniej.

Do chwili obecnej na terenie Polski nie opisano izolacji *S. marcescens* z genem oporności na karbapenemy. Rezerwuarem szczepów niosących geny oporności na karbapenemy jest kontynent Azjatycki, a w szczególności Korea, gdzie w 2005 roku ponad 60% szpitali odnotowało obecność szczepów niosących geny kodujące enzymy MBL (metalo- $\beta$ -laktamazy) [73]. U szczepów *S. marcescens* enzym IMP-1 należący do rodziny MBL został opisany w 1994 roku. Jego cechą charakterystyczną oprócz naturalnego braku wrażliwości na inhibitory  $\beta$ -laktamaz była zdolność przyłączania cząsteczki aztreonamu z jednoczesnym brakiem właściwości hydrolitycznych wobec cząsteczki tego antybiotyku [73]. Sześć lat później w szczepie *S. marcescens* znaleziono i scharakteryzowano kolejny wariant enzymu IMP nazwany IMP-2 [9].

Karbapenemazy serynowe obok enzymów typu MBL są identyfikowane u wielolekoopornych szczepów z rodzaju *Serratia*. Oprócz wykrywania szczepów niosących geny kodujące enzymy typu GES i KPC opisano rodzinę SME charakterystyczną jedynie dla szczepów *S. marcescens*. Pierwszy enzym SME-1 o szerokim spektrum hydrolizy antybiotyków  $\beta$ -laktamowych obejmującym penicyliny, cefalosporyny, karbapenemy i aztreonam opisano w 1982 roku w Londynie [100]. Analiza sekwencji nukleotydowej wykazała największe podobieństwo sekwencji kodującej SME-1 do karbapenemazy NMC-A zidentyfikowanej u szczepu *Enterobacter cloacae* NOR-1 [69]. W sekwencji aminokwasowej SME-1 zidentyfikowano wszystkie 5 aminokwasów, których położenie jest konserwowane dla enzymu kodowanego chromosomalnie. Doniesienie potwierdziła analiza sekwencji otaczającej otwartą ramkę odczytu genu *Sme-1*, która nie wykazała obecności żadnych sekwencji związanych z transpozonomami i innymi ruchomymi elementami genetycznymi [69].

W chwili obecnej znane są trzy różne enzymy SME (SME-1, SME-2 i SME-3), które charakteryzuje podobne,

szerokie spektrum substratowe. Różnice między poszczególnymi enzymami manifestowane są zmiennym powinowactwem do poszczególnych antybiotyków [80].

Wysoce niepokojącym zjawiskiem jest pojawienie się szczepów *S. marcescens* opornych na karbapenemy i jednocześnie nie posiadających genów oporności na te antybiotyki. Inną przyczyną oporności *S. marcescens* na karbapenemy może być synergiczny wpływ jednoczesnej obecności w komórce chromosomalnego genu *ampC* oraz braku błonowego białka OmpF. Jest to sytuacja wyjątkowa, gdyż dotychczasowe doniesienia wskazywały jedynie na udział plazmidowych genów *ampC* na możliwość powstania szczepu z rodziny *Enterobacteriaceae* opornego na karbapenemy. Wyniki uzyskane przez S u h i wsp. pokazują po raz pierwszy możliwość nabycia takiej oporności przez szczepy niosące geny *ampC* w chromosomie [89].

Antybiotyki aminoglikozydowe są ważną grupą leków stosowanych między innymi przy ciężkich, zagrażających życiu zakażeniach wywoływanych przez drobnoustroje Gram-ujemne. Oporność na aminoglikozydy szczepów *Serratia* może być związana z modyfikacją cząsteczki antybiotyku przez enzymy bakteryjne [46] oraz z aktywnym wypompowywaniem antybiotyków (efflux) [21]. Nowo odkryty enzym RmtB determinuje u *Serratia* oporność na liczną grupę antybiotyków aminoglikozydowych m.in. na kanamycynę, tobramycynę (szczególnie ważne w zakażeniach okulistycznych), amikacynę, arbekacynę, gentamycynę, sisomycynę oraz isepamicynę [21].

Szerokie spektrum oporności szczepów *S. marcescens* obejmuje także kolejną ważną terapeutycznie grupę leków przeciwbakteryjnych – fluorochinolonów. Podstawowymi mechanizmami oporności większości bakterii Gram-ujemnych, w tym szczepów *S. marcescens* są zmiany w obrębie gyrazy DNA oraz topoizomerazy IV stanowiące docelowe miejsca działania chemioterapeutyków oraz aktywne usuwanie cząsteczki fluorochinolonu przy udziale pomp błonowych [10].

Scharakteryzowano cztery typy pomp wśród szczepów *S. marcescens*. Największą rodzinę stanowią pompy typu RND (Resistance-Nodulation-Cell Division), które wykorzystując błonowy gradient protonów są zdolne do usuwania różnych grup antybiotyków i środków dezynfekcyjnych. Znane typy pomp występujące u szczepów *S. marcescens* zestawiono w Tabeli V.

Innym, niedawno poznany mechanizm oporności jest wytwarzanie białek PRP (Pentapeptide Repeat Proteins), które chroniąc mechanizm replikacyjny bakterii, nie dopuszczają cząsteczek fluorochinolonów do gyrazy DNA i topoizomerazy IV.

Tetracykliny stanowią dużą grupę antybiotyków, stosowanych powszechnie od dziesięcioleci. W niektórych rejonach (głównie na terenie Stanów Zjednoczonych Ameryki Północnej i Wielkiej Brytanii) oporność klinicznych szczepów *S. marcescens* na tetracykliny wyno-

Tabela V  
Typy pomp oraz zakres substratowy pomp zidentyfikowanych u *S. marcescens*

Pompy	Oporność na	Piśmiennictwo
RND-SdeAB	CIP, NOR, OFC, BET, CPH	[48], [11]
RND-SdeCDE	NOV	[10]
RND-SdeXY	TIG, TET, CPR, CIP	[19], [44]
SMR-SsmE	BET, AKF	[61]
MFS-SmfY	DAPI, NOR, CHB, AKF, BET	[85]
ABC-SmdAB	NOR, TET, DAPI	[59]

AKF – akrylawina, BET – bromek etyldyny, CHB – chlorek benzalkonium, CIP – cyprofloksacyna, CPH – chloramfenikol, CPR – cefpiron, DAPI – 4',6-diamidyno-2-fenylindol, OFC – ofloksacyna, NOR – norfloksacyna, NOV – nowobicycyna TET – tetracyklina, TIG – tigecyklina

siła nawet 97%, co eliminowało możliwość użycia tych antybiotyków [83].

Mimo iż obecnie wiele izolowanych szczepów *S. marcescens* wykazuje oporność na tertacykliny, bardzo niewiele wiadomo na temat genów determinujących tę oporność [31]. Podstawowym mechanizmem zidentyfikowanym u *S. marcescens* jest „efflux” [44] (Tab. V).

## 6. Podsumowanie

Bakterie z rodzaju *Serratia* stanowią dość słabo poznaną grupę drobnoustrojów z rodziny *Enterobacteriaceae*. Częste zmiany w systematyce oraz bezsporna przewaga gatunku *S. marcescens* wśród izolatów z materiału klinicznego w porównaniu do innych gatunków *Serratia* są powodem prowadzenia praktycznie jednostronnych badań skupionych wokół „pałeczki krwawej”.

*S. marcescens* jest drobnoustrojem powszechnie spotykanym w środowisku naturalnym oraz izolowanym od chorych. Szczególne grupy ryzyka narażone na zakażenia oportunistyczne wywoływane przez *S. marcescens* to osoby z obniżoną odpornością, noworodki a także osoby w podeszłym wieku. Szereg czynników wirulencji oraz mechanizmów oporności na antybiotyki umożliwia zjadliwym szczepom inwazję, oraz utrudnia podjęcie właściwych działań w celu poprawy zdrowia chorego.

Prowadzone badania nad mechanizmami oporności na antybiotyki pozwalają na lepszą charakterystykę izolowanych szczepów i podjęcie bardziej skutecznych działań na rzecz ograniczenia zjawiska narastania oporności na antybiotyki.

## Piśmiennictwo

- Ahmad K.M., Hamid R., Ahmad M., Abdin M.Z., Javed S.: Optimization of culture media for enhanced chitinase production from a novel strain of *Stenotrophomonas maltophilia* using response surface methodology. *J. Microbiol. Biotech.* **20**, 1597–1602 (2010)

- Alonso R., Aucken H.M., Perez-Diaz J.C., Cookson B.D., Baquero F., Pitt T.L.: Comparison of serotype, biotype and bacteriocin type with rDNA RFLP patterns for the type identification of *Serratia marcescens*. *Epidem. Infect.* **111**, 99–107 (1993)
- Alvarez J.S., Regueiro B.: R plasmids from clinical isolates of *Serratia marcescens*. *J. Hosp. Infect.* **1**, 133–139 (1980)
- Arslan U., Erayman I., Kirdar S., Yuksekkaya S., Cimen O., Tuncer I., Bozdogan B.: *Serratia marcescens* sepsis outbreak in a neonatal intensive care unit. *Ped. Internat.* **52**, 208–212 (2010)
- Aucken H.M., Pitt T.L.: Antibiotic resistance and putative virulence factors of *Serratia marcescens* with respect to O and K serotypes. *J. Med. Microbiol.* **47**, 1105–1113 (1998)
- Aucken H. M., Wilkinson S. G., Pitt T. L.: Identification of capsular antigens in *Serratia marcescens*. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 59–63 (1997)
- Aucken H.M., Wilkinson S.G., Pitt T.L.: Re-evaluation of the serotype of *Serratia marcescens* and separation into two schemes based on lipopolisaccharide (O) and capsular polysaccharide (K) antigen. *Microbiol.* **144**, 639–653 (1998)
- Barnaum D.A., Thackeray E.L., Fish N.A.: An outbreak of mastitis caused by *Serratia marcescens*. *Can. J. Compar. Med. Vet. Sci.* **22**, 392–395 (1958)
- Shibata N.: *Serratia marcescens* blaIMP-2 gene for metallo-beta-lactamase IMP-2, complete cds. NCBI Gene Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), Acc. No: AB182996
- Begik S., Worobec E.A.: Characterization of the *Serratia marcescens* SdeCDE multidrug efflux pump studied via gene knockout mutagenesis. *Can. J. Microbiol.* **54**, 411–416 (2008)
- Begik S., Worobec E.A.: The role of the *Serratia marcescens* SdeAB multidrug efflux pump and TolC homologue in fluoroquinolone resistance studied via gene-knockout mutagenesis. *Microbiol.* **154**, 454–461 (2008)
- Blossom D., Noble-Wang J., Su J., Pur S., Chernaly R., Shams A., Jensen B., Pascoe N., Gullion J., Casey E., Hayden M., Arduino M., Dudnitz D.S., Raad I., Trenholme G., Srinivasan A.: Multistate outbreak of *Serratia marcescens* bloodstream infections caused by contamination of prefilled heparin and isotonic sodium chloride solution syringes. *Arch. Inter. Med.* **169**, 1705–1711 (2009)
- Boer M.G.J., Brunsveld-Reinders A.H., Salomons E.M.A., Dijkshoorn L., Bernards A. T., Van Den Berg P.C.M., Van Den Broek P.J.: Multifactorial origin of high incidence of *Serratia marcescens* in a cardio-thoracic ICU: Analysis of risk factors and epidemiological characteristics. *J. Infect.* **56**, 446–454 (2008)
- Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. (red.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Wyd. Springer, New York (2005), Tom II, część B, str. 799–811
- Brurberg M.B., Eijsink V.G.H., Haandrikman A.J., Venema G., Nes I.F.: Chitinase B from *Serratia marcescens* BJLZOO is exported to the periplasm without processing. *Microbiol.* **141**, 123–131 (1995)
- Buffet-Bataillon S., Rabier V., Betremieux P., Beuchee A., Bauer M., Pladys P., Le Gall E., Cormier M., Jolivet-Gougeon A.: Outbreak of *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit: contaminated unmedicated liquid soap and risk factors. *J. Hosp. Infect.* **72**, 17–22 (2009)
- Chen C., Krause K., Pettitt B.M.: Advantage of being a dimer for *Serratia marcescens* endonuclease? *J. Phys. Chem. B*, **113**, 511–521 (2009)
- Chen J., Kuroda T., Huda M.N., Mizushima T., Tsuchiya T.: An RND-type multidrug efflux pump SdeXY from *Serratia marcescens*. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**, 176–179 (2003)
- Dauga C., Grimont F., Grimont P.A.D.: Nucleotide sequences of 16S rRNA from ten *Serratia* species. *Res. Microbiol.* **141**, 1139–1149 (1990)

20. Davis B.R., Woodward J.M.: Some relationships of the somatic antigens of a group of *Serratia marcescens* cultures. *Can. J. Microbiol.* **3**, 591–597 (1957)
21. Doi Y., Yokoyama K., Yamana K., Wachino J., Shibata N., Yagi T., Shibayama K., Kato H., Arakawa Y.: Plasmid-Mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 491–496 (2004)
22. Dundar D., Meric M., Vahaboglu H., Willke A.: Pseudo-outbreak of *Serratia marcescens* in a tertiary care hospital. *New Microbiol.* **32**, 273–276 (2009)
23. Empel J., Baraniak A., Literacka E., Mrówka A., Fiett J., Sadowy E., Hryniewicz W., Gniadkowski M., Beta-PL Study Group: Molecular survey of  $\beta$ -lactamases conferring resistance to newer  $\beta$ -lactams in *Enterobacteriaceae* isolates from Polish hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 2449–2454 (2008)
24. Farmer F.F.: Epidemiological differentiation of *Serratia marcescens*: Typing by bacteriocin sensitivity. *Appl. Microbiol.* **23**, 226–231 (1972)
25. Foglia E.E., Fraser V.J., Elward A.M.: Effect of nosocomial infections due to antibiotic-resistant organisms on length of stay and mortality in the pediatric intensive care unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **28**, 299–306 (2007)
26. Gao L., Xu J.-H., Li X.-J., Liu Z.-Z.: Optimization of *Serratia marcescens* lipase production for enantioselective hydrolysis of 3-phenylglycidic acid ester. *J. Industr. Microbiol. Biotech.* **31**, 525–530 (2004)
27. Garza-Gonzalez E., Mendoza-Ibarra S.I., Liaca-Diaz J.M., Gonzalez G.M.: Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase producing *Enterobacteriaceae* isolates at a tertiary-care centre in Monterrey, Mexico. *J. Med. Microbiol.* **60**, 84–90 (2011)
28. Gaston M.A., Pitt T.L.: O-antigen specificities of the serotype strains of *Serratia marcescens*. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 2697–2701 (1989)
29. Gavini F., Ferragut C., Izard D., Trinel P.A., Leclerc H., Levebvre B., Mossel D.A.A.: *Serratia fonticola*, a new species from water. *Int. J. System. Bacteriol.* **29**, 92–101 (1979)
30. Gerber N.N.: Prodigiosin-like pigments. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **3**, 469–785 (1975)
31. Gilmour M.W., Thomson N.R., Sanders M., Parkhill J., Taylor D.E.: The complete nucleotide sequence of the resistance plasmid R478: defining the backbone components of incompatibility group H conjugative plasmids through comparative genomics. *Plasmid*, **52**, 182–202 (2004)
32. Giri A., Anandkumar N., Muthukumar G., Pennathur G.: A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiol.* **4**, 1–10 (2004)
33. Gospodarek E., Bogiel T., Zalas-Więcek P.: Communication between microorganisms as a basis for production of virulence factors. *Polish J. Microbiol.* **58**, 191–198 (2009)
34. Graham P.L., Begg M.D., Larson E., Della-Latta P., Allen A., Saiman L.: Risk factors for late onset gram-negative sepsis in low birth weight infants hospitalized in the neonatal intensive care unit. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **25**, 113–117 (2006)
35. Givscov M., Olsen L., Molin S.: Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for extracellular phospholipase A1 from *Serratia liquefaciens*. *J. Bacteriol.* **170**, 5855–5862 (1988)
36. Grimont P.A.D., Grimont F., Dulong de Rosnay H.L.C.: Taxonomy of the genus *Serratia*. *J. Gen. Microbiol.* **98**, 39–66 (1977)
37. Grimont P.A.D., Grimont F., Le Minor S., Davis B., Pigache F.: Compatible results obtained from biotyping and serotyping in *Serratia marcescens*. *J. Clin. Microbiol.* **10**, 425–432 (1979)
38. Haddix P.L., Werner T.F.: Spectrofotometric assay of gene expression: *Serratia marcescens* pigmentation. *Bioscience*, **26**, 3–13 (2000)
39. Hamilton R.L., Brown W.J.: Bacteriophage typing of clinically isolated *Serratia marcescens*. *Appl. Microbiol.* **24**, 899–906 (1972)
40. Han S.B., Park S.H., Jeon Y.J., Kim Y.K., Kim H.M., Yang K.H.: Prodigiosin blocks T-cell activation by inhibiting interleukin 2Ra expression and delays progression of autoimmune diabetes and collagen – induced arthritis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**, 415–425 (2001)
41. Harshley R.M.: Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Ann. Rev. Microbiol.* **57**, 249–273 (2003)
42. Henry B., Plante-Jenkins C., Ostrowska K.: An outbreak of *Serratia marcescens* associated with the anesthetic agent propofol. *Am. J. Inf. Contr.* **29**, 312–315 (2001)
43. Holst O., Aucken H.M., Seltmann G.: Structural and serological characterisation of the O-specific polysaccharide of the lipopolysaccharide from proposed new serotype 029 of *Serratia marcescens*. *J. Endotox. Res.* **4**, 215–220 (1997)
44. Hornsey M., Ellington M.J., Doumith M., Hudson S., Livermore D.M., Woodford N.: Tigecycline resistance in *Serratia marcescens* associated with up-regulation of the SdeXY-HasF efflux system also active against ciprofloxacin and cefpirome. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 479–482 (2010)
45. Khanafari A., Assadi M.M., Fakhr F.A.: Review of prodigiosin, pigmentation in *Serratia marcescens*. *J. Biol. Sci.* **6**, 1–13 (2006)
46. Kim C., Hesek D., Zajicek J., Vaculenko S.B., Mobashery S.: Characterization of the bifunctional aminoglycoside-modifying enzyme ANT(3'')-IIi/AAC(6'')-IId from *Serratia marcescens*. *Biochemistry*, **45**, 8367–8377 (2006)
47. Krawczyk B., Naumiuk Ł., Lewandowski K., Baraniak A., Gniadkowski M., Samet A., Kur J.: Evaluation and comparison of random amplification of polymorphic DNA, Pulsed-Field-Gel Electrophoresis and ADSRRS-fingerprinting for typing *Serratia marcescens* outbreaks. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **38**, 241–248 (2003)
48. Kumar A., Worobec E.A.: Cloning, sequencing, and characterization of the SdeAB multidrug efflux pump of *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 1495–1501 (2005)
49. Kwang-Woo L., Bae H.-A., Lee Y.-H.: Molecular cloning and functional expression of *esf* gene encoding enantioselective lipase from *Serratia marcescens* ES-2 for kinetic resolution of optically active (S)-flurbiprofen. *J. Microbiol. Biotech.* **17**, 74–80 (2007)
50. Labbate M., Zhu H., Thung L., Bandara R., Larsen M.R., Willcox M., Givskov M., Rice S.A., Kjelleberg S.: Quorum-sensing regulation of adhesion in *Serratia marcescens* MG1 is surface dependent. *J. Bacteriol.* **189**, 2702–2711 (2007)
51. Ligozzi M., Fontana R., Aldegheri M., Scalet G., Cascio G.L.: Comparative evaluation of an Automated Repetitive-Sequence-Based PCR instrument versus Pulsed-Field Gel Electrophoresis in the setting of a *Serratia marcescens* nosocomial infection outbreak. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 1690–1695 (2010)
52. Lin C.-S., Horng J.-T., Yang C.-H., Tsai Y.-H., Su L.-H., Wie C.-F., Chen C.-C., Hsieh S.-C., Lu C.-C., Lai H.-C.: RssAB-FlhDC-ShlBA as a major pathogenesis pathway in *Serratia marcescens*. *Infect. Immun.* **78**, 4870–4881 (2010)
53. Mahlen S.D., Morrow S.S., Abdalhamid B., Hanson N.D.: Analyses of AmpC gene expression in *Serratia marcescens* reveal new regulatory properties. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**, 791–802 (2003)
54. Majtan V., Majtanova L.: Effect of subinhibitory concentration of quinolones on hydrophobicity and motility of *Serratia marcescens*. *Microbios*, **102**, 79–88 (2000)



55. Majtanova L., Majtan V.: Postantibiotic effects of gentamycin and netilmycin on *Serratia marcescens*: Effects on hydrophobicity and motility. *Folia Microbiol.* **45**, 45–49 (2000)
56. Makimura Y., Asai Y., Ogawa S., Ogawa T.: Chemical structure and immunobiological activity of lipid A from *Serratia marcescens* LPS. *J. Med. Microbiol.* **56**, 1440–1446 (2007)
57. Manning M.L., Archibald L.K., Bell L.M., Banerjee S.N., Jarvis W.R.: *Serratia marcescens* transmission in a pediatric intensive care unit: a multifactorial occurrence. *Am. J. Infect. Contr.* **29**, 115–119 (2001)
58. Mao-Hua W., Wu B., Ren W., He B.F.: Screening, characterization and cloning of a solvent-tolerant protease from *Serratia marcescens* MH6. *J. Microbiol. Biotech.* **20**, 881–888 (2010)
59. Masny A., Plucienniczak A.: Fingerprinting of bacterial genomes by amplification of DNA fragments surrounding rare restriction sites. *BioTechniques*, **31**, 930–936 (2001)
60. Matsuo T., Chen J., Minato Y., Ogawa W., Mizushima T., Kuroda T., Tsuchiya T.: SmdAB, a heterodimeric ABC-type multidrug efflux pump, in *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **190**, 648–654 (2008)
61. Minato Y., Shahcheraghi F., Ogawa W., Kuroda T., Tsuchiya T.: Functional gene cloning and characterization of the SsmE multidrug efflux pump from *Serratia marcescens*. *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 516–519 (2008)
62. Młynarczyk A., Szymanek K., Sawicka-Grzelak A., Pazik J., Buczkowska T., Durlak M., Lagiewska B., Pacholczyk M., Chmura A., Pączek L., Młynarczyk G.: CTX-M and TEM as predominant types of extended spectrum beta-lactamases among *Serratia marcescens* isolated from solid organ recipients. *Transplant. Proc.* **41**, 3253–3255 (2009)
63. Molla A., Matsumoto K., Oyamada I., Katsuki T., Maeda H.: Degradation of protease inhibitors, immunoglobulins, and other serum proteins by *Serratia* protease and its toxicity to fibroblasts in culture. *Infect. Immun.* **53**, 522–529 (1986)
64. Montaner B., Navarro S., Pique M., Vilaseca M., Martinell M., Giralte E., Gil J., Perez-Tomas R.: Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. *Brit. J. Pharmacol.* **131**, 585–593 (2000)
65. Mudd S., Mudd E.: The penetration of bacteria through capillary spaces. *J. Exp. Med.* **40**, 633–645 (1924)
66. Muller A.E., Huisman I., Roos P.J., Rietveld A.P., Klein J., Harbers J.B.M., Dorresteyn J.J., Steenbergen J.E., Vos M.C.: Outbreak of severe sepsis due to contaminated propofol: lesson to learn. *J. Hosp. Infect.* **76**, 225–230 (2010)
67. Munford R.S.: Sensing Gram-negative bacterial lipopolysaccharides: a human disease determinant? *Infect. Immun.* **76**, 454–464 (2008)
68. Naas T., Vandel L., Sougakoff W., Livermore D.M., Nordmann P.: Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A  $\beta$ -lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1262–1270 (1994)
69. Nasu M.: Bacteriocin (marcescin) typing of clinically isolated *Serratia marcescens*. *Tohoku J. Exper. Med.* **133**, 33–43 (1981)
70. Naumiuk Ł., Baraniak A., Gniadkowski M., Krawczyk B., Rybak B., Sadowy E., Samet A., Kur J.: Molecular epidemiology of *Serratia marcescens* in two hospitals in Danzig, Poland, over a 5-year period. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 3108–3116 (2004)
71. Okhravi N., Adamson P., Matheson M.M., Towler H.M.A., Lightman S.: PCR-RFLP mediated detection and speciation of bacterial species causing *Endophthalmitis*. *Investig. Ophthalm. Visual Sci.* **41**, 1438–1447 (2000)
72. Osmo E., Arakawa Y., Wacharotayankun R., Ohta M., Horii T., Ito H., Yoshimura F., Kato N.: Molecular characterization of an enterobacterial metallo- $\beta$ -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 71–78 (1994)
73. Pai H., Kang C.I., Byeon J.H., Lee K.D., Park W.B., Kim H.B., Kim E.C., Oh M.D., Choe K.W.: Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC-type  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 3720–3728 (2004)
74. Park Y.J., Yu J.K., Lee S., Oh Eun-Jee, Woo Gun-Jo: Prevalence and diversity of *qnr* alleles in Amp-C-producing *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens*: a multicentre study from Korea. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**, 868–871 (2007)
75. Parvaz P., Tille D., Meugnier H., Perraud M., Chevallier P., Ritter J., Fabry J., Sepetjan M.: A rapid and easy PCR-RFLP method for genotyping *Serratia marcescens* strains isolated in different hospital outbreaks and patient environments in the Lyon area, France. *J. Hosp. Infect.* **51**, 96–105 (2002)
76. Pinna A., Zanetti S., Sechi L.A., Carta F.: *In vitro* adherence of *S. epidermidis*, *S. marcescens* and *P. aeruginosa* to AcrylSof intraocular lenses. *J. Cataract Refract. Surg.* **31**, 2430–2431 (2005)
77. Polyzou A., Sofianou D., Pournaras S., Tsakris A.: RAPD-fingerprinting of *Serratia marcescens* after formaldehyde inactivation of DNase activity. *Lett. Appl. Microbiol.* **30**, 419–421 (2000)
78. Poulter S., Carlton T.M., Spring D.R., Salmond G.P.: The *Serratia* LuxR family regulator CarR<sub>3906</sub> activates transcription independently of cognate quorum sensing signals. *Mol. Microbiol.* **80**, 1120–1131 (2011)
79. Queenan A.M., Shang W., Schreckenberger P., Lolans K., Bush K., Quinn J.: SME-3, a novel member of the *Serratia marcescens* SME family of carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 3485–3487 (2006)
80. Rabier V., Bataillon S., Jolivet-Gougeon A., Chaplain J.M., Beuchee A., Betremieux P.: Hand washing soap as a source of neonatal *Serratia marcescens* outbreak. *Acta Paediatr.* **97**, 1381–1385 (2008)
81. Ringrose R.E., Mckown B., Felton F.G., Barclay B.O., Muchmore H.G., Rhoades E.R.: A hospital outbreak of *Serratia marcescens* associated with ultrasonic nebulizers. *Annals Internal Med.* **69**, 719–729 (1968)
82. Sabath L.D.: Current concepts: drug resistance of bacteria. *New Engl. J. Med.* **280**, 91–94 (1969)
83. Sehdev P.S., Donnenberg M.S.: Answer to Arcanum. *Clin. Infect. Dis.* **29**, 925 (1999)
84. Shahcheraghi F., Minato Y., Chen J., Mizushima T., Ogawa W., Kuroda T., Tsuchiya T.: Molecular cloning and characterization of a multidrug efflux pump, SsmFy, from *Serratia marcescens*. *Biol. Pharm. Bulletin.* **30**, 798–800 (2007)
85. Shanks R.M.Q., Stella N.A., Kalivoda E.J., Doe M.R., O'Dee D.M., Lathrop K.L., Guo F.L., Nau G.J.: A *Serratia marcescens* OxyR homolog mediates surface attachment and biofilm formation. *J. Bacteriol.* **189**, 7262–7272 (2007)
86. Shimuta K., Ohnishi M., Iyoda S., Gotoh N., Koizumi N., Watanabe H.: The hemolytic and cytolytic activities of *Serratia marcescens* phospholipase A (PhlA) depend on lysophospholipid production by PhlA. *BMC Microbiol.* **9**, 261 (2009)
87. Soo P.-C., Wei J.-R., Horng Y.-T., Hsieh S.-C., Ho S.-W., Lai H.-C.: Characterization of the *dapA-nlpB* genetic locus involved in regulation of swarming motility, cell envelope architecture, hemolysin production, and cell attachment ability in *Serratia marcescens*. *Infect. Immun.* **73**, 6075–6084 (2005)
88. Suh B., Bae I.K., Kim J., Jeong S.H., Yong D., Lee K.: Outbreak of meropenem-resistant *Serratia marcescens* mediated by chromosomal AmpC  $\beta$ -lactamase overproduction and outer membrane protein loss. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 5057–5061 (2010)
89. Synstad B., Vaaje-Kolstad G., Cederkvist F.H., Saua S.F., Horn S.J., Eijsink V.G., Sorlie M.: Expression and characterization of

- endochitinase C from *Serratia marcescens* BJL200 and its purification by one-Step general chitinase purification method. *Biosci. Biotech. Biochem.* **72**, 715–723 (2008)
90. Traub W.H., Eiden A., Leonhard B., Bauer D.: Typing of nosocomial strains of *Serratia marcescens*: comparison of restriction enzyme cleaved genomic DNA fragment (PFGE) analysis with bacteriocin typing, biochemical profiles and serotyping. *Zentralbl. Bakteriol.* **284**, 93–106 (1996)
91. Traub W.H.: Serotyping of *Serratia marcescens*: detection of two new O-antigen (O25 and O26). *Int. J. Med. Microbiol.* **275**, 495–499 (1991)
92. Ulatowska B., Czajkowski H., Gospodarek E., Mikucka A., Występowanie  $\beta$ -laktamaz typu ESBL u pałeczek z rodziny *Serratia*. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **52**, 17–24 (2000)
93. Van Houdt R., Givskov M., Michiels C. W.: Quorum sensing in *Serratia*. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**, 407–424 (2007)
94. Voelz A., Muller A., Gillien J., Le C., Dresbach T., Engelhart S., Exner M., Bates C. J., Simon A.: Outbreaks of *Serratia marcescens* in neonatal and pediatric intensive care units: Clinical aspects, risk factors and management. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, **213**, 79–87 (2010)
95. Vogel L., Jones G., Triep S., Koek A., Dijkshoorn L.: RAPD typing of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates using standardized reagents. *Clin. Microbiol. Infect.* **5**, 270–276 (1999)
96. Webster C.A., Towner K.J.: Use of RAPD-ALF analysis for investigating the frequency of bacterial cross-transmission in an adult intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* **44**, 254–260 (2000)
97. Williams R.P., Gott C.L., Qadri S.M.H., Scott R.H.: Influence of temperature of incubation and type of growth medium on pigmentation in *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **106**, 438–443 (1971)
98. Williamson N.R., Fineran P.C., Leeper F.J., Salmond G.P.C.: The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 887–899 (2006)
99. Wolska K.I., Grudniak A.M., Kraczkiewicz-Dowjat A., Kurek A.: Różnorodne funkcje wybranych pigmentów bakteryjnych. *Post. Mikrobiol.* **40**, 105–114 (2010)
100. Yang Y.J., Wu P.J., Livermore D.M.: Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 755–758 (1990)

Edyta Konecka<sup>1\*</sup>, Adam Kaznowski<sup>1</sup>, Jakub Baranek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Poznań

Wpłynęło w maju 2011 r.

1. Wprowadzenie. 2. Chorobotwórczość *B. thuringiensis* dla bezkręgowców i jej uwarunkowanie. 3. Chorobotwórczość *B. thuringiensis* dla kręgowców. 4. *B. thuringiensis* w zwalczaniu szkodników upraw roślin. 5. Podsumowanie

### The usage of *Bacillus thuringiensis* for bioinsecticide production

**Abstract:** *Bacillus thuringiensis* is a bacterium that produces crystal inclusions during sporulation. The protein crystals of Cry toxins are active against insect pests but not against non-target organisms. The activity of Cry proteins makes the *B. thuringiensis* crystalline toxins useful in producing pesticides containing crystals and spores. The toxicity of *B. thuringiensis* for insects is also determined by substances synthesized during the vegetative stage of bacteria growth: Sip protein, chitinase or Vip protein. Some *B. thuringiensis* strains produce virulence agents that affect vertebrates. Enterotoxin or  $\beta$ -exotoxin could be responsible for harmful impact on human health, therefore insecticides should not contain bacterial spores.

1. Introduction. 2. The pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* for invertebrates and its determination. 3. The pathogenicity of *B. thuringiensis* for vertebrates. 4. *B. thuringiensis* in plant protection against pests. 5. Summary

**Słowa kluczowe:** *Bacillus thuringiensis*, toksyny krystaliczne, szkodniki roślin, środek ochrony roślin

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*, crystalline toxins, plant pests, insecticide

## 1. Wprowadzenie

Gatunek *B. thuringiensis* obejmuje chemoorgano-heterotroficzne Gram-dodatnie laseczki wytwarzające endspory. Bakterie zostały odkryte w materiale pobranym od larw *Bombyx mori* (jedwabnik morowy) przez Ishawata w Japonii w 1901 r. Nazwa gatunkowa została wprowadzona przez Berlina dla laseczek wyhodowanych z gąsienic *Ephestia kühniella* (mklik mączny) w Turyngii w 1911 r. [52].

Szczepy *B. thuringiensis* często były izolowane z gleby, wody, padłych owadów i powierzchni roślin [72]. Martin i Travers [53] wyisobnili *B. thuringiensis* z próbek gleby zebranych we Wschodniej Azji, Nowej Zelandii, Afryki, Ameryki Południowej i Europie. Dużą liczbę *B. thuringiensis* stwierdzono w materiale pobranym z magazynowanego zboża i mąki oraz w pyłe powstającym podczas mlenia kukurydzy. Bakterie *B. thuringiensis* wyhodowano także z gniazd ptaków i nietoperzy oraz wody pobranej ze stawu [9]. Szczepy *B. thuringiensis* obecne były również w kurzu, pajęczynie, wymazach pobranych z powierzchni ścian budynków oraz w odchodach ptaków [54] i z przewodów pokarmowych ssaków [75].

Pod względem fenotypowym i genetycznym *B. thuringiensis* wykazuje wysokie podobieństwo z *B. cereus* i *B. mycoides*. W różnicowaniu *B. cereus* i *B. thuringiensis* stwierdzono użyteczność metod molekularnych opartych na analizie sekwencji genów 16S rRNA, 23S rRNA i *gyrB* [4, 49]. Cechą wyróżniającą *B. thuringiensis* od

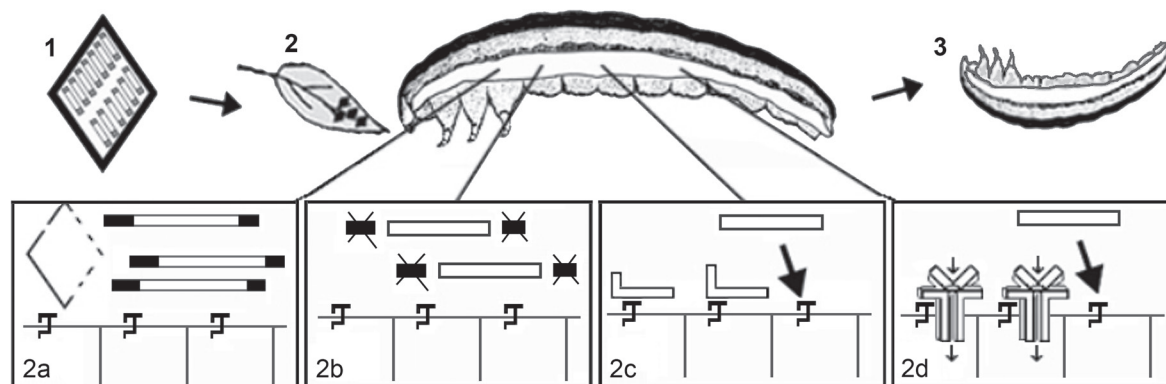
blisko spokrewnionych gatunków jest zdolność syntezy białkowych toksyn krystalicznych Cry i Cyt o aktywności owadobójczej [37, 65]. Toksyny *B. thuringiensis* są aktywne dla niektórych owadów z rzędu *Lepidoptera* (motyle), *Diptera* (muchówki), *Coleoptera* (chrząszcze), a także *Hymenoptera* (błonkoskrzydłe), *Homoptera* (równoskrzydłe), *Orthoptera* (prostoskrzydłe) i *Mallophaga* (wszoły). Ponadto, białka Cry mogą być toksyczne dla niektórych nicieni, roztoczy i pierwotniaków [67]. *B. thuringiensis* powoduje zakażenie przewodu pokarmowego bezkręgowców. Na skutek działania białek krystalicznych dochodzi do paraliżu układu pokarmowego bądź paraliżu ogólnego, larwa owada zaprzestaje żerować i zamiera [72].

## 2. Chorobotwórczość *B. thuringiensis* dla bezkręgowców i jej uwarunkowanie

Bakterie *B. thuringiensis* mogą być chorobotwórcze dla niektórych owadów, nicieni, roztoczy i pierwotniaków. Patogenność tych bakterii uwarunkowana jest działaniem toksyn krystalicznych Cry i Cyt [79]. Ponadto, szczepy *B. thuringiensis* mogą także wytwarzać inne czynniki wirulencji dla bezkręgowców: białka Vip [67],  $\beta$ -egzotoksyna zwana turyngienzyną [15], proteina P20 [81], chitynaza [66] oraz proteiny Sip [24].

Podczas sporulacji w komórce bakteryjnej powstaje jeden lub kilka białkowych kryształów zawierających od 1 do 5 nieaktywnych form toksyn Cry i Cyt

\* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii, Wydział Biologii UAM; ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań; tel. (+48) 61 8295935; e-mail: edkon@amu.edu.pl



Rys. 1. Mechanizm działania toksyn Cry *B. thuringiensis*

Kryształy (1) spożywane są przez owada z pokarmem (2). W jelicie owada następuje rozpuszczenie kryształów białkowych i uwolnienie protoksyn (2a). Protoksyny ulegają aktywacji do formy czynnej poprzez proteolityczne odcięcie części łańcucha aminokwasowego (2b). Aktywne toksyny przyłączają się do receptorów błon komórek epitelialnych i zmieniają konformację przestrzenną (2c). Białka Cry wbudowują się w błony enterocytów, oligomeryzują i tworzą kanały (2d). W wyniku paraliżu owad zamiera (3).

[3, 22]. Szczepy *B. thuringiensis* mogą wytwarzać kryształy o kształcie: dwupiramidowym, sześciennym, owalnym lub nieregularnym. Owadobójcze działanie kryształu jest wyższe niż toksyczność poszczególnych białek wchodzących w jego skład, co wskazuje na synergistyczne działanie niektórych toksyn [38]. Słaby antagonizm zaobserwowano w przypadku toksyn Cry11A i Cry4B oraz Cry11A i Cyt1A [38].

Toksyny Cry różnicuje się na grupy o podobieństwie sekwencji aminokwasów wynoszącym co najmniej 45%. W obrębie grup wyróżnia się podgrupy białek o podobieństwie sekwencji aminokwasów równym 75 i 95% [17]. Liczba poznanych grup toksyn Cry wynosi 60. Wyróżnia się także 2 grupy białek Cyt [18].

Stwierdzono toksyczne działanie białek Cry1, Cry2, Cry7, Cry8, Cry9, Cry15, Cry22, Cry32, Cry51 i Cry54 dla owadów należących do rzędu *Lepidoptera*, np.: *Lymantria dispar* [62], *Bombyx mori* [79], *Trichoplusiani* [79, 83], *Spodoptera littoralis* [48], *Plutella xylostella* [79] i *Helicoverpa armigera* [76]. Toksyny Cry należące do grup 1, 2, 4, 7, 9, 10, 11, 16, 17, 19, 20, 21, 24, 25, 27, 29, 30, 32, 39, 40, 44, 47, 48, 49 i 54 są czynnikami etiologicznymi zakażeń u owadów z rzędu *Diptera*, np.: *Aedes aegypti* [7, 76], *Anopheles stephensi*, *Culex pipens*, *Culex quinquefasciatus* [79, 83], i *Chironomus tepperi* [38]. Wykazano także aktywność bójczą Cry1, Cry3, Cry7, Cry8, Cry14, Cry18, Cry22, Cry23, Cry34, Cry35, Cry36, Cry37, Cry43 i Cry55 dla *Leptinotarsa decemlineata* [11], *Pyrrhalta luteola*, *Anomala cuprea* i innych owadów należących do rzędu *Coleoptera* [79, 83]. Toksyna Cry5 jest patogenna dla szkodników z rzędu *Hymenoptera*: *Diprion pini* oraz *Cephacia abietis* [28]. Niektóre białka krystaliczne Cry są również bójcze dla owadów z rzędu *Hemiptera*, *Siphonoptera* [79], *Homoptera*, *Orthoptera* i *Mallophaga* [67]. Ponadto, wykazano, że niektóre białka Cry mogą być toksyczne dla nicieni [43, 58, 79] roztoczy i pierwotniaków [67].

W budowie toksyn Cry wyróżnia się 3 domeny. N-końcowa domena I zbudowana jest z 7 antyrównoległych łańcuchów helisy  $\alpha$ . Centralna helisa  $\alpha 5$  otoczona jest przez pozostałe. W skład domeny II wchodzi 3 antyrównoległe struktury harmonijek  $\beta$  ( $\beta$ -sheets), każda położona pod kątem ok.  $120^\circ$  względem pozostałych. Domena II zawiera 3 antyrównoległe struktury harmonijek  $\beta$  ułożonych warstwowo ( $\beta$ -sandwich). Białko Cyt zbudowane jest z pojedynczej domeny, w której 2 helisy  $\alpha$  otaczają struktury  $\beta$  [22, 67].

Domena I, II i III białek Cry rozpoznaje specyficzny receptor w błonie komórek epitelialnych jelita środkowego owada i wiąże się do niego [21]. Domena I i III biorą udział w tworzeniu kanałów w błonie komórek jelita owada [12, 22, 29, 67].

W jelicie środkowym owada kryształ ulega rozpuszczeniu i następuje proteolityczna aktywacja protoksyn do formy czynnej [48]. U owadów *Lepidoptera* i *Diptera* enzymami proteolitycznymi są proteazy serynowe, natomiast u owadów z rzędu *Coleoptera* proteazy cysteinowe i asparaginowe. Po związaniu się toksyny z receptorem błony komórki epitelialnej następuje zmiana konformacji cząsteczek toksyn i ich wbudowanie w błonę komórek jelita [22]. W błonie, cząsteczki białek oligomeryzują i tworzą kanały [29, 62]. Wykazano, że receptorem wiążącym Cry jest aminopeptydaza N [16], alkaliczna fosfataza [61] lub białko przypominające kadherynę (cadherin-like protein) [29]. U niektórych owadów toksyny mogą wiązać się do białka rąbka szczoteczki komórek nabłonka jelita BBMV (brush border membrane vesicle protein) [28, 39]. W efekcie dochodzi do zakłócenia przepuszczalności błony i lizy komórek jelita środkowego owada [37]. Mechanizm działania białka Cry przedstawiono na rysunku 1.

Toksyny Cyt różnicuje się na dwie grupy pod względem podobieństwa sekwencji aminokwasów [18]. Białka Cyt są toksyczne dla owadów z rzędu *Diptera* oraz mogą

powodować lizę komórek kręgowców [23]. Opisano synergistyczny efekt działania toksyn Cyt i białek owadobójczych Cry *B. thuringiensis* oraz *B. sphaericus* [23, 77].

Niektóre białka wytwarzane przez *B. thuringiensis* wykazują synergistyczne działanie względem białek krystalicznych. Białko P20 (20 kDa) stymuluje ekspresję genów *cry1Ac* i *cry11A*. Ponadto, stwierdzono, że aktywność toksyny Cyt1Aa jest uzależniona od obecności P20. Przypuszcza się, że to białko uczestniczy w tworzeniu kryształu [81]. Geny kodujące syntezę P20 zlokalizowane są w plazmidzie, podobnie jak geny warunkujące syntezę białek krystalicznych [8].

Enzym chitynaza wykazuje działanie synergistyczne wraz z białkami owadobójczymi *B. thuringiensis* w zwalczaniu *Lymantria dispar*, *Choristoneura fumiferana* i *Culicoides nubeculosus*. Obok *B. thuringiensis* geny kodujące syntezę chitynazy stwierdzono między innymi u *Serratia marcescens*, *Bacillus lentus* i *B. cereus*. Przypuszcza się, że chitynaza powodując perforacje w błonie komórek jelita umożliwi wejście patogena do hemocelu owada [66].

Pomimo efektywnego owadobójczego działania białek krystalicznych, niektóre szkodniki roślin nie są wrażliwe na ich działanie. Przykładem jest *Agrotis ipsilon*, powszechnie występujący szkodnik wielu upraw, w tym zbóż. Zwalczanie tego owada jest trudne, gdyż tylko stadium larwalne jest wrażliwe na działanie insektycydów. W walce z *Agrotis ipsilon* wykazano skuteczność białek Vip (vegetative insecticidal proteins) *B. thuringiensis* wytwarzanych podczas wegetatywnej fazy wzrostu bakterii. Również zwalczanie *Trichoplusia ni*, szkodnika warzyw, kwiatów ozdobnych, tytoniu i bawełny, mogłoby być skuteczne przy zastosowaniu białka Vip3. Stwierdzono wysoką aktywność tej toksyny dla larw *T. ni* odpornych na działanie proteiny Cry1Ac wytwarzanej przez rośliny transgeniczne, którymi żywią się gąsienice owada [29]. Innymi szkodnikami wrażliwymi na działanie Vip są: *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea* i *Ephestia kühniella*. Białka Vip dzieli się na trzy grupy na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasów [18]. Mechanizm aktywności bójczej Vip nie został w pełni wyjaśniony. Sposób działania tych toksyn różni się od białek Cry, dlatego Vip mogą stanowić alternatywę dla zwalczania owadów odpornych na działanie protein krystalicznych [26]. Po aktywacji proteolitycznej białka Vip wiążą się do protein BBMV jelita środkowego owada. Wykazano, że toksyna Vip3A-G tworzy pory w błonach komórkowych jelita, Vip3A-F nie ma takiej zdolności [51]. W wyniku działania toksyn dochodzi do paraliżu układu pokarmowego i lizy komórek epitelialnych jelita środkowego owada. Szcep *B. thuringiensis* HD1, wykorzystywany do produkcji środków ochrony roślin, zawiera gen kodujący syntezę Vip3A [56]. Geny kodujące syntezę białek Vip są obecne w plazmidach, które warunkują także wytwarzanie toksyn Cry [3] lub w chromoso-

mie [27]. Technika stosowaną do wykrycia genów *vip* pozwalającą również na różnicowanie grup genów jest PCR-RFLP [35].

Innym czynnikiem wirulencji *B. thuringiensis* dla owadów jest termostabilna  $\beta$ -egzotoksyna będąca analogiem ATP, hamująca działanie polimerazy RNA zależnej od DNA [68]. Ze względu na toksyczne działanie  $\beta$ -egzotoksyny w stosunku do kręgowców, szczepy bakteryjne wykorzystywane do produkcji środków ochrony roślin nie mogą wykazywać zdolności jej syntezy [15, 34]. Obecność tej toksyny można wykryć testem immunoenzymatycznym ELISA [5]. Część cząsteczka egzotoksyny zbudowana jest z reszty glukozy, adenozyliny i kwasu alarowego. Geny kodujące syntezę i mechanizm sekrecji toksyny typu I zlokalizowane są w plazmidzie zawierającym również geny białek krystalicznych [25]. Ich ekspresja jest częściowo zależna od sekwencji zawartych w DNA chromosomalnym. Wykazano zależność pomiędzy przynależnością danego szczepu *B. thuringiensis* do serowaru i zdolnością wytwarzania tych toksyn. Około 80% szczepów *B. thuringiensis* serowar *thuringiensis* i ok. 90% *B. thuringiensis* serowar *darmstadiensis* syntetyzuje  $\beta$ -egzotoksynę. Nie stwierdzono tej właściwości u szczepów serowarów: *alesti*, *sotto*, *aizawai*, *morrisoni* [34].

Działanie owadobójcze dla owadów z rzędu *Coleoptera* wykazuje sekrecyjne białko Sip (secreted insecticidal protein). Spektrum jego aktywności jest podobne do Cry3A i Cry3Bb. Stwierdzono toksyczność Sip w stosunku do *Leptinotarsa decemlineata*, *Diabrotica undecimpunctata howardi* oraz *Diabrotica virgifera virgifera* [24].

Rzadko odnotowuje się bakteriozy powodowane przez *B. thuringiensis* przebiegające jako epizoocje. Przykładem była epizoocja *Ephestia cautella* w magazynie kukurydzy w Kenii [14]. Innym przykładem wystąpienia masowego zakażenia spowodowanego *B. thuringiensis* serowar *aizawai* odnotowano u larw *Mythimna loreyi* zebranych z uprawy zboża w Hiszpanii w 1989 roku [63]. Stwierdzono także 1 przypadek epizoocji wśród *Carpocapsa pomonella* w sadzie owocowym w Czechach [84]. *B. thuringiensis* był również czynnikiem etiologicznym epizoocji *Cephalcia falleni* w Gorczańskim Parku Narodowym [72]. W latach 1990–1999 odnotowano powtarzające się epizoocje powodowane przez szczepy *B. thuringiensis* w laboratoryjnych hodowlach *Cydia pomonella* prowadzonych na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu oraz w Instytucie Ochrony Roślin – Państwowym Instytucie Badawczym w Poznaniu [45, 46].

### 3. Chorobotwórczość *B. thuringiensis* dla kręgowców

W piśmiennictwie odnotowano przypadek wystąpienia zmian chorobowych u człowieka na skutek bezpośredniego rozpylenia insektycydu zawierającego spory

i kryształły do oka. Z materiału pobranego z powstałego wrzodu rogówki wyhodowano bakterie *B. thuringiensis*. Zastosowanie gentamycyny i cefazoliny pozwoliło na całkowite wyleczenie pacjenta. Wyhodowanie *B. thuringiensis* z materiału pobranego z rogówki świadczyła o obecności bakterii w rogówce, ale nie świadczyła o udziale tych bakterii w tworzeniu wrzodu. Nie wyklucza się, że inne bakterie, niż *B. thuringiensis*, mogły być odpowiedzialne za powstałe w oku zmiany chorobowe [70].

W 1995 roku wyosobniono z materiału pobranego z ropnia od francuskiego żołnierza, powstałego na skutek urazów spowodowanych eksplozją miny lądowej w byłej Jugosławii, Gram-dodatnie laseczki wytwarzające kryształły białkowe i przeprowadzające hemolizę typu beta. Izolat oznaczono jako *B. thuringiensis* subsp. *konkukian* i prowadzono dalsze badania na myszach o obniżonej odporności immunologicznej. Wyniki doświadczeń sugerują zdolność *B. thuringiensis* do wywołania martwicy tkanki mięśniowej u zakażonych myszy [32]. Śmierć zwierząt nastąpiła po ośmiu godzinach od podania donosowo zawiesziny spor bakteryjnych w liczbie  $10^8$ . Przeprowadzenie podobnego doświadczenia z użyciem mutanta *B. thuringiensis* subsp. *konkukian*, nie mającego zdolności syntezy białek krystalicznych, dało identyczne wyniki, co wskazuje na inne toksyny warunkujące patogenność tych bakterii w stosunku do myszy. Czynniki wirulencji tych bakterii może być hemolizyna, fosfolipaza C i sfingomielinaza [33]. Podanie myszom, zainfekowanym wirusem grypy A, bakterii *B. thuringiensis* subsp. *konkukian* oraz *B. thuringiensis* wyhodowanych z biopreparatu handlowego wykazało ich patogenność, co wskazuje na istnienie potencjalnego zagrożenia stosowania niektórych insektycydów dla osób chorych na grypę. Wydaje się konieczne wprowadzenie odpowiednich środków bezpieczeństwa w przypadku osób pracujących z roślinami chronionymi preparatami *B. thuringiensis* [33]. Według Siegela [70] liczba spor *B. thuringiensis* chorobotwórcza dla myszy jednak wielokrotnie przekracza liczbę spor obecną po rozpyleniu stosowanego bioinsektycydu w  $1 \text{ m}^3$  powietrza, co wskazuje na niskie zagrożenie tych środków dla zdrowia ludzi.

Alergiczne reakcje skórne oraz wzrost stężenia przeciwciał IgE i IgG opisano u osób mających kontakt z bioinsektycydem *B. thuringiensis* Javelin. Z materiału pobranego od ludzi z nadwrażliwością wyhodowano bakterie o identycznym profilu DNA jak z *B. thuringiensis* wyhodowanego z pestycydu, co wskazuje, że drobnoustrój ten może być czynnikiem indukującym wyżej wymienione zmiany [6].

Obecność bakterii mających gen kodujący wytwarzanie enterotoksyny stwierdzono w kale osób pracujących w miejscu upraw chronionych insektycydami *B. thuringiensis*. Genotypowanie szczepów wykazało, że bakterie *B. thuringiensis* izolowane od ludzi i wyhodowane

z pestycydów miały identyczne wzory DNA. Nie zaobserwowano jednak objawów chorobowych u ludzi [41].

W latach 1984 i 85 wyhodowano *B. thuringiensis* z materiału pobranego od 55 osób zamieszkujących okolice Lane County w stanie Oregon (USA), gdzie stosowano insektycyd zawierający spory i kryształły *B. thuringiensis*. U 52 osób nie odnotowano objawów chorobowych. U pozostałych trzech osób stwierdzono zapalenie płuc, zapalenie pęcherzyka żółciowego i kamicy żółciową oraz wystąpienie ropnia. Brak jednoznacznych przesłanek wskazujących na *B. thuringiensis* jako czynnika etiologicznego wyżej wymienionych chorób nie pozwala zaliczyć tych bakterii do patogenicznych dla człowieka [30].

Niektórzy autorzy odnotowali jednak przypadki szkodliwego wpływu *B. thuringiensis* dla zwierząt. Opisano jeden śmiertelny przypadek krowy wskutek zapalenia gruczołu mlecznego spowodowanego przez *B. thuringiensis* [19]. Wyhodowany szczep bakteryjny z biopreparatu Dipel indukował stres oksydacyjny w komórkach wątroby szczura. Obecność patogena prowadziła do powstania reaktywnych form tlenu oraz wpływała na aktywność enzymów detoksyfikacyjnych: peroksydazy glutationowej, dysmutazy ponadtlenkowej oraz peroksydazy lipidowej i reduktazy glutationowej [69]. Wykazano także potencjalną chorobotwórczość szczepów *B. thuringiensis* wytwarzających  $\beta$ -egzotoksynę. W komórkach kory mózgowej szczura toksyna powodowała wzrost aktywności cykazy adenylowej i zwiększenie stężenia cAMP, co może zaburzać transdukcje sygnałów w układzie neuroendokrynowym, w których pośredniczy cAMP. Toksyna podawana wziewnie powodowała zaburzenia funkcjonowania układu oddechowego szczura [78].

Określono zdolność wytwarzania enterotoksyny chorobotwórczej dla zwierząt, w tym ludzi, przez szczepy *B. thuringiensis* wykorzystywane do produkcji środków ochrony roślin [19, 20]. Wykazano, że bakterie wyhodowane bioinsektycydów Bactimos, Dipel, Florbac i Foray mają zdolność syntezy tej toksyny. Pomimo braku danych o udziale enterotoksyny w chorobotwórczości *B. thuringiensis* dla ludzi, sugeruje się wprowadzenie zakazu stosowania szczepów wytwarzających tą toksynę do produkcji pestycydów [19]. Bakterie *B. thuringiensis* syntetyzujące enterotoksynę izolowano także z produktów żywnościowych [20]. Niektóre *B. thuringiensis* obok enterotoksyny mają także zdolność wytwarzania hemolizyny [31].

Ze względu na duże podobieństwo fenotypowe i genetyczne *B. thuringiensis* i *B. cereus* oraz brak możliwości różnicowania tych dwóch gatunków przy użyciu konwencjonalnych testów, przypuszcza się, że *B. thuringiensis* może być czynnikiem etiologicznym chorób powodowanych przez szczepy identyfikowane mylnie jako *B. cereus* [20].

W ostatnich latach podjęto badania nad możliwością wykorzystania białek *B. thuringiensis* w leczeniu niektórych chorób człowieka. Szczepy bakteryjne reprezentujące serowary: *dakota*, *neoleonensis*, *shandongiensis* i *coreanensis* wytwarzają białko wchodzące w skład kryształu wykazujące aktywność cytotoxyczną w stosunku do białaczkowych limfocytów T człowieka. Białko to rozpoznawało i specyficznie wiązało się do komórek nowotworowych nie powodując uszkodzenia „zdrowych” limfocytów T. Ponadto, nie hemolizowało erytrocytów owczych i nie miało właściwości owadobójczych. Nie stwierdzono jego podobieństwa z toksynami Cry i Cyt [50, 57]. Wykazano także, że kryształy zawierające białko o aktywności cytotoxyczej dla komórek nowotworowych miały kształt dwupiramidowy o zaokrąglonych końcach. To samo białko miało zdolność niszczenia komórek raka szyjki macicy [82]. Zidentyfikowano także białko o identycznych, jak wyżej wymienione, właściwościach, które dodatkowo wykazywało aktywność cytotoxyczną dla komórek nowotworowych okrężnicy [40] oraz wątroby [44].

#### 4. *B. thuringiensis* w zwalczaniu szkodników upraw roślin

Środki ochrony roślin zawierające spory i kryształy białkowe *B. thuringiensis* stanowią alternatywę dla chemicznych insektycydów [80]. Selektywne działanie

[42] i duża skuteczność w walce ze szkodnikami upraw roślinnych sprawiają, że zainteresowanie biopesticydami zwiększa się. Syntetyczne preparaty chemiczne, w przeciwieństwie do insektycydu biologicznego, zaburzają oddziaływanie w łańcuchach pokarmowych w ekosystemach, mają negatywny wpływ na organizmy nie będące szkodnikami, a ich długotrwałe stosowanie indukuje odporność u owadów [72]. Pesticydy oparte na *B. thuringiensis* nie indukują pojawienia się odporności u owadów (odnotowano tylko jeden przypadek wystąpienia odporności u *Plutella xylostella*) [67]. Produkcja biopreparatu nie wymaga dużych nakładów finansowych w porównaniu z wytwarzaniem chemicznych środków ochrony roślin, np.: koszt produkcji insektycydu zawierającego spory i kryształy *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* jest około czterdziestokrotnie mniejszy niż pestycydu chemicznego [67].

Aktualnie preparaty zawierające spory i kryształy *B. thuringiensis* są najczęściej stosowanymi wśród biologicznych środków ochrony roślin. W 1995 ogóln światowa sprzedaż bioinsektycydów przyniosła zysk 90 milionów dolarów i stanowiła 2% na rynku pestycydów. Szacuje się, że rocznie do celów ochrony upraw wykorzystuje się  $2,3 \times 10^6$  kg biopreparatów. W 1998 roku, w Stanach Zjednoczonych było 200 zarejestrowanych produktów opartych na *B. thuringiensis* [67]. Preparaty owadobójcze zawierające spory i toksyny *B. thuringiensis* zostały wymienione w tabeli I.

Tabela I  
Handlowe preparaty oparte na *B. thuringiensis* stosowane w ochronie upraw roślin [42, 59]

Bioinsektycyd	Producent	Szczep <i>B. thuringiensis</i>	Zwalczana grupa owadów
Biobit, Dipel, Foray	Abbott Laboratories	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	<i>Lepidoptera</i>
Bactec Bernan	Bactec Corp.		
BMP 123	Becker Microbial Products, Inc.		
Condor, Crymax, Cutlass, Raven	Ecogen Inc.		
Forwabit	Forward International Ltd.		
Costar, Javelin, Thuricide, Vault	Thermo Trilog		
Bactosid K	Sanex Inc.		
Agrobac	Tecomag		
Troy-BT	Troy Biosciences Inc.		
MVP, MVP II, M-Peril	Mycogen Corp.		
Bactimos, Gnatrol, Skeetal, VectoBac	Abbott Laboratories	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	<i>Diptera</i>
Aquabac, Aquabac Primary Powder	Becker Microbial Products, Inc		
Vectocide	Sanex Inc.		
Novodor	Abbott Laboratories	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i>	<i>Coleoptera</i>
M-trak	Mycogen Corp.		
Bactec Corp.	Bactec Bernan		
Xen Tari	Abbott Laboratories	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>	<i>Lepidoptera</i>
Agree, Design	Thermo Trilog		
Mattch	Mycogen Corp.		

W ochronie upraw leśnych najczęściej stosowanym pestycydem jest biopreparat oparty na szczepach *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 wytwarzających toksyny Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac oraz Cry2Aa. Insektycyd zawierający spory i kryształ *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 jest stosowany do zwalczania *Choristoneura fumiferana* w Kanadzie, *Lymantria monacha* w Polsce, *Lymantria dispar* w USA i Kanadzie oraz na Dalekim Wschodzie, *Thaumetopea pityocampa* w Hiszpanii i Francji [67].

Produkty handlowe oparte na *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* okazały się najbardziej efektywne z biopestycydów w walce z komarowatymi (*Culicidae*) i meszkowatymi (*Simuliidae*) należącymi do rzędu *Diptera*. Odkrycie *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* miało miejsce w 1977 roku, w którym odnotowano pojawienie się odporności owadów należących do *Diptera* na stosowane syntetyczne pestycydy chemiczne. Wykazano, że toksyny Cry4A, Cry4B, Cry10A, Cry11A i Cyt1A wytwarzane przez *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* mają aktywność bójczą dla *Diptera*. Obserwowana aktywność toksyczna białek krystalicznych stała się szczególnie interesująca ze względu na udział komarowatych i meszkowatych w przenoszeniu czynników chorobotwórczych dla człowieka. Dalsze badania wykazały, że inne niż *israelensis* szczepy *B. thuringiensis* także syntetyzują białka krystaliczne o aktywności bójczej dla *Diptera*. Zaskakującym było odkrycie, że toksyny Cry17A, Cry18A i Cry19A owadobójcze w stosunku do komarowatych są wytwarzane także przez *Clostridium bifermentans* subsp. *malaysia* [67].

Badania przeprowadzone w Peru i Ekwadorze wykazały skuteczność preparatu Abate, zawierającego spory i kryształ *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, w zwalczaniu owadów *Anopheles* przenoszących *Plasmodium vivax*, czynnik etiologiczny malarii. Jednocześnie nie zaobserwowano szkodliwego wpływu insektycydu na ludzi, ptaki, ryby, krewetki i pszczoły [47].

Szczepy *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* używane są w produkcji insektycydów zwalczających *Galleria mellonella* i *Plutella xylostella*. Liczebność szkodników z rzędu *Coleoptera*, głównie *Leptinotarsa decemlineata* jest ograniczana przy zastosowaniu biopreparatów zawierających *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* [71].

Warunkiem wprowadzenia pestycydu do użycia jest brak jego szkodliwego wpływu na zdrowie ludzi. Ze względu na możliwość wytwarzania przez *B. thuringiensis* czynników wirulencji dla człowieka dąży się do opracowania bioinsektycydu pozbawionego spor bakteriowych.

W 1996 roku po raz pierwszy wprowadzono na rynek rośliny transgeniczne zawierające w swoim genomie geny kodujące syntezę toksyn Cry. Wprowadzenie roślin zmodyfikowanych genetycznie redukuje koszty, czas i wysiłek poświęcony ochronie upraw oraz stanowi przyjazny

dla środowiska sposób zwalczania szkodników [60]. Sądzi się, że transgeniczne uprawy mogą przyczynić się do mniejszego rozprzestrzeniania się mykotoksyn powodujących nowotwory wątroby u ludzi. Szkodniki zbóż żerując na łodygach i kłosach roślin powodują ich uszkodzenia, co umożliwia kiełkowanie zarodników grzyba *Fusarium* sp. wytwarzającego toksyny. Zmniejszenie liczebności szkodników przyczynia się do ograniczenia kiełkowania zarodników grzyba, co wykazano w doświadczeniu z użyciem transgenicznego zboża [10]. Ekspresja genów *cry* w komórkach ryżu pozwoliła na podniesienie ilości plonów w wyniku negatywnego wpływu toksyn krystalicznych na szkodniki: *Sciropophaga incertulans*, *Chilo suppressalis*, *Cnaphalocrocis medinalis* oraz *Marasmis* spp. [1], co ma szczególne znaczenie, gdyż ryż jest podstawowym składnikiem diety dla blisko dwóch miliardów ludzi na świecie [36]. Wysoką skuteczność w walce ze szkodnikami roślin zaobserwowano w następstwie wprowadzenia genów *cry* do genomu bawełny [2], topoli, kawy, kukurydzy i rzepaku [73].

Zwiększająca się liczba roślin zmodyfikowanych genetycznie może przyczynić się do powstania odporności u owadów na białka Cry [13, 74]. Poszukuje się związków, które działając łącznie z toksyną krystaliczną zmniejszą ryzyko wystąpienia oporności u szkodników roślin. Przykładem jest integracja Cry1Ac z domeną wiążącą galaktozę łańcucha rycyny, która stanowi dodatkowe miejsce wiążące białko Cry do komórek owada [55].

Prawdopodobieństwo pojawienia się oporności u owadów na białka Cry wytwarzane przez rośliny modyfikowane jest większe niż na insektycydy zawierające kryształy *B. thuringiensis* ze względu na to, że rośliny transgeniczne wywierają ciągłą presję selekcyjną na populacje owadów [60].

Jednym ze sposobów poprawy jakości roślin jest otoczkowanie nasion przed ich wysianiem. Dodanie białka Cry do warstwy otoczki lub do nasion przed otoczkowaniem chroni nasiona przed szkodnikami. Przykładem są nasiona kukurydzy, do których wprowadzono toksyny Cry zapewniając im ochronę przed atakiem ploniarki zbożówki [64].

## 5. Podsumowanie

Bakterie *B. thuringiensis* mogą syntetyzować zróżnicowaną gamę czynników wirulencji dla owadów. Największe zainteresowanie wzbudzają białka Cry z powodu wysokiej toksyczności tych protein dla szkodników upraw roślinnych oraz braku szkodliwego wpływu na komórki kręgowców. Kryształy białkowe *B. thuringiensis* znalazły zastosowanie w produkcji efektywnych biopestycydów stając się alternatywą dla chemicznych środków ochrony roślin. Trwają intensywne poszukiwania



nowych szczepów *B. thuringiensis*, które mogłyby być wykorzystane do produkcji skuteczniejszych preparatów owadobójczych niż te dostępne na rynku. Istnieje również tendencja do eliminowania z preparatów owadobójczych form przetrwalnych *B. thuringiensis* ze względu na możliwość wytwarzania przez formy wegetatywne czynników warunkujących chorobotwórczość tej bakterii dla człowieka. Ponadto, toksyny krystaliczne mogą być wytwarzane przez rośliny transgeniczne stanowiąc skuteczny sposób ochrony upraw, ale rośliny modyfikowane genetycznie, w przeciwieństwie do pestycydów opartych na *B. thuringiensis*, mogą indukować pojawienie się oporności na białka Cry u owadów. Dodatkowo, aktywność niektórych toksyn krystalicznych dla nicieni może być użyteczna w walce z pasożytami roślin i zwierząt.

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2009–2012 jako projekt badawczy Nr N N310 079936.

## Piśmiennictwo

- Alam M. F., Datta K., Abrigo E., Vasquez A., Senadhira D., Datta S.K.: Production of transgenic deepwater indica rice plants expressing a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIA(b)* gene with enhanced resistance to yellow stem borer. *Plant Sci.* **135**, 25–30 (1998)
- Alchanatis V., Navon A., Glazer I., Levski S.: An image analysis system for measuring insect feeding effects caused by biopesticides. *J. Agric. Engng Res.* **77**, 289–296 (2000)
- Aronson A.: Sporulation and  $\delta$ -endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cell. Mol. Life. Sci.* **59**, 417–425 (2002)
- Bavykin S.G., Lysov Y.P., Zakhariev V., Kelly J.J., Jackman J., Stahl D.A., Cherni A.: Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and *gyrB* gene sequence analysis to determinate phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 3711–3730 (2004)
- Bekheit H.K.M., Lucas A.D., Gee S.J., Harrison R.O., Hammock B.D.: Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the  $\beta$ -exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Agric. Food Chem.* **41**, 1530–1536 (1993)
- Bernstein I.L., Bernstein J.A., Miller M., Tierzieva S., Bernstein D.I., Lummus Z., Selgrade M.K., Doefler D.L., Seligy V.L.: Immune responses in farm workers after exposure to *Bacillus thuringiensis* pesticides. *Environ. Health Perspect.* **107**, 575–581 (1999)
- Berón C.M., Salerno G.L.: Cloning and characterization of a novel crystal protein from a native *Bacillus thuringiensis* isolate highly active against *Aedes aegypti*. *Curr. Microbiol.* **54**, 271–276 (2007)
- Berry C., O'Neil S., Ben-Dov E., Jones A.F., Murphy L., Quail M.A., Holden M.T.G., Harris D., Zaritsky A., Parkhill J.: Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5082–5095 (2002)
- Bernhard K., Jarrett P., Meadows M., Butt J., Ellis D.J., Roberts G.M., Pauli S., Rodgers P., Burges H.D.: Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insects pests. *J. Invert. Pathol.* **70**, 59–68 (1997)
- Betz F.S., Hammond B.G., Fuchs R.L.: Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis* – protected plants to control insect pests. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **32**, 156–173 (2000)
- Bradley D., Harkey M.A., Kim M.K., Biever K.D., Bauer L.S.: The insecticidal CryIB crystal protein of *Bacillus thuringiensis* ssp. *thuringiensis* has dual specificity to Coleopteran and Lepidopteran larvae. *J. Invert. Pathol.* **65**, 162–173 (1995)
- Bravo A., Gill S.S., Soberón M.: Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, **49**, 423–435. (2007)
- Bravo A., Soberón M.: How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends Biotechnol.* **26**, 573–579 (2008)
- Burges H.D., Hurst J.A.: Ecology of *Bacillus thuringiensis* in storage moths. *J. Invert. Pathol.* **30**, 131–139 (1977)
- Carlberg G., Tikkanen L., Abdel-Hameed A.H.A.: Safety testing of *Bacillus thuringiensis* preparations, including thuringiensin, using the *Salmonella* assay. *J. Invert. Pathol.* **66**, 68–71 (1995)
- Chen J., Aimanova K.G., Pan S., Gill S.S.: Identification and characterization of *Aedes aegypti* aminopeptidase N as a putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxin. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **39**, 688–696 (2009)
- Crickmore N., Zeigler D.R., Feitelson J., Schnepf E., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Dean D.H.: Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 807–813 (1998)
- Crickmore N., Zeigler D.R., Schnepf E., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Bravo A., Dean D.H.: *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/) (2010), data potwierdzenia ważności adresu: 06 sierpień 2010
- Damgaard P.H.: Diarrhoeal enterotoxin production by strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from commercial *Bacillus thuringiensis* – based insecticides. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **12**, 245–250 (1995)
- Damgaard P.H., Larsen H.D., Hansen B.M., Bresciani J., Jørgensen K.: Enterotoxin – producing strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from food. *Lett. Appl. Microbiol.* **23**, 146–150 (1996)
- de Maagd R.A., Kwa M.S.G., Van Der Klei H., Yamamoto T., Schipper B., Vlak J.M., Stiekema W.J., Bosch D.: Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1537–1543 (1996)
- de Maagd R.A., Bravo A., Berry C., Crickmore N.: How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Gen.* **17**, 193–199 (2001)
- de Maagd R.A., Bravo A., Berry C., Crickmore N., Schnepf H.E.: Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **37**, 409–433 (2003)
- Donovan W.P., M.R. Walters: Discovery and characterization of Sip1A: a novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 713–719 (2006) (praca jest dziełem 14 autorów)
- Espinasse S., Gohar M., Chaufaux J., Buisson C., Perchat S., Sanchis V.: Occurrence of a common binding site in *Mamestra brassicae*, *Phthorimaea operculella*, and *Spodoptera exigua* for the insecticidal crystal proteins CryIA from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4182–4186 (2002)
- Fang J., Xu X., Wang P., Zhao J.Z., Shelton A.M., Cheng J., Feng M.G., Shen Z.: Characterization of Chimeric *Bacillus thuringiensis* Vip3 Toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 956–961 (2007)

27. Franco-Riviera A., Benintende G., Cozzi J., Baizabal-Aguirre V.M., Valdez-Alarcón J.J., López-Meza J.E.: Molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from Argentina. *Anton. v. Leeuwenhoek*, **86**, 87–92 (2004)
28. García-Robles I., Sánchez J., Gruppe A., Martínez-Ramírez A.C., Rausell C., Real M. D., Bravo A.: Mode of action of *Bacillus thuringiensis* PS86Q3 strain in hymenopteran forest pests. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**, 849–856 (2001)
29. Gómez I., Sánchez J., Miranda R., Bravo A., Soberón M.: Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix  $\alpha$ -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett.* **513**, 242–246 (2002)
30. Green M.G., Heumann M., Sokolow R., Foster L.R., Bryant R., Kkeels M.: Public health implications of the microbial pesticide *Bacillus thuringiensis*: an epidemiological study, Oregon, 1985–86. *Am. J. Public Health*, **80**, 848–852 (1990)
31. Hansen B.M., Hendriksen N.B.: Detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 185–189 (2001)
32. Hernandez E., Ramiés F., Ducoureaux J.P., Cruel T., Cavallo J.D.: *Bacillus thuringiensis* subsp. *konkukian* (serotyp H34) superinfection: case report and experimental evidence of pathogenicity in immunosuppressed mice. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 2138–2139 (1998)
33. Hernandez E., Ramiés F., Gros P., Cavallo J.D.: Super-infection by *Bacillus thuringiensis* H34 or 3a3b can lead to death in mice infected with the influenza A virus. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **29**, 177–181 (2000)
34. Hernández C.S., Martínez C., Pocar M., Caballero P., Ferré J.: Correlation between serovars of *Bacillus thuringiensis* and type I  $\beta$ -exotoxin production. *J. Invert. Pathol.* **82**, 57–62 (2003)
35. Hernández-Rodríguez C.S., Pérez-Guerrero S., Aldebis H.K., Vargas-Osuna E., Ferré J.: Binding of individual *Bacillus thuringiensis* Cry proteins to the olive moth *Prays oleae* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *J. Invert. Pathol.* **100**, 131–133 (2009)
36. High S.M., Cohen M.B., Shu Q.Y., Aitosaar I.: Achieving successful deployment of *Bt* rice. *Trends. Plant Sci.* **9**, 286–292 (2004)
37. Höfte H., Whiteley H.R.: Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* **53**, 242–255 (1989)
38. Hughes P.A., Stevens M.M., Park H.W., Federici B.A., Dennis E.S., Akhurst R.: Response of larval *Chironomus tepperi* (Diptera: Chironomidae) to individual *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxins and toxin mixtures. *J. Invert. Pathol.* **88**, 34–39 (2005)
39. Ihara H., Himeno M.: Study of the irreversible binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa to brush border membrane vesicles from *Bombyx mori* midgut. *J. Invert. Pathol.* **98**, 177–183. (2008)
40. Ito A., Sasaguri Y., Kitada S., Kusaka Y., Kuwano K., Masutomi K., Mizuki E., Akao T., Ohba M.: A *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytotoxic action to human cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 21282–21286 (2004)
41. Jensen G.B., Larsen P., Jacobsen B.L., Madsen B., Smidt L., Andrup L.: *Bacillus thuringiensis* in fecal samples from greenhouse workers after exposure to *B. thuringiensis*-based pesticides. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4900–4905 (2002)
42. Joong K.B., Côté J.C.: A review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Tech. Bull.* **29**: 1–18 (2000)
43. Jouzani G.S., S. Akbari: Molecular detection of nematocidal crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains of Iran and evaluation of their toxicity of free-living and plant-parasitic nematodes. *Can. J. Microbiol.* **54**, 812–822 (2008) (praca jest dziełem 11 autorów)
44. Kitada S., Abe Y., Maeda T., Shimada H.: Parasporin-2 requires GPI-anchored proteins for the efficient cytotoxic action to human hepatoma cells. *Toxicol.* **264**, 80–88 (2009)
45. Konecka E., Kaznowski A., Ziemnicka J., Ziemnicki K.: Molecular and phenotypic characterisation of *Bacillus thuringiensis* isolated during epizootics in *Cydia pomonella* L. *J. Invert. Pathol.* **94**, 56–63 (2007)
46. Konecka E., Kaznowski A., Ziemnicka J., Ziemnicki K., Paetz H.: Analysis of cry Gene Profiles in *Bacillus Thuringiensis* Strains Isolated During Epizootics in *Cydia pomonella* L. *Curr. Microbiol.* **55**, 217–222 (2007)
47. Kroeger A., Horststick O., Riedl C., Kaiser A., Becker N.: The potential for malaria control with the biological larvicide *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in Peru and Ecuador. *Acta Tropica*, **60**, 47–57 (1995)
48. Kumar N.S., Venkateswerlu G.: Endogenous protease-activated 66-kDa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* active against *Spodoptera littoralis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **159**, 113–120 (1998)
49. La Duc M.T., Satomi M., Agata N., Venkateswaran K.: *gyrB* as a polygenetic discriminator for members of the *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* group. *J. Microbiol. Methods*, **56**, 383–394 (2004)
50. Lee D.W., Katayama H., Akao T., Maeda M., Tanaka R., Yamashita S., Saitoh H., Mizuki E., Ohba M.: A 28 kDa protein of the *Bacillus thuringiensis* serovar *shandongensis* isolate 89-T-34-22 induces a human leukemic cell-specific cytotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta*, **1547**, 57–63 (2001)
51. Lee M.K., Walters F.S., Hart H., Palecar N., Chen J.S.: The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab  $\delta$ -endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 4648–4657 (2003)
52. Lonc E., Andrzejczak S.: Bioróżnorodność toksyn *Bacillus thuringiensis* i ich zastosowanie. *Post. Mikrobiol.* **44**, 253–263 (2005)
53. Martin P.A., Travers R.S.: Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2437–2442 (1989)
54. Meadows M.P., Ellis D.J., Butt J., Jarrett P., Burges H.D.: Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1344–1350 (1992)
55. Mehlo L., Gahakwa D., Nghia P.T., Loc N.T., Capell T., Gatehouse J.A., Gatehouse A.M.R., Christou P.: An alternative strategy for sustainable pest resistance in genetically enhanced crops. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 7812–7816 (2005)
56. Milne R., Liu Y., Gauthier D., van Frankenhuyzen K.: Purification of Vip3Aa from *Bacillus thuringiensis* HD-1 and its contribution to toxicity of HD-1 to spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) and gypsy moth (*Lymantria dispar*) (Lepidoptera). *J. Invert. Pathol.* **99**, 166–172 (2008)
57. Mizuki E., Ohba M., Akao T., Yamashita S., Saitoh H., Park Y.S.: Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: *in vitro* cell-killing action on human cancer cells. *J. Appl. Microbiol.* **86**, 477–486 (1999)
58. Mohammed S.H., M. Saedy M.A., Enan M.R., Ibrahim N.E., Ghareeb A., Salah. A., Moustafa S.A.: Biocontrol efficiency of *Bacillus thuringiensis* toxins against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *J. Cell. Mol. Biol.* **7**, 57–66 (2008)
59. Navon A.: *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection – reality and prospects. *Crop Protect.* **19**, 669–676 (2000)
60. Peferoen M.: Progress and prospects for field use of *Bt* genes in crops. *Trends Biotechnol.* **15**, 173–177 (1997)
61. Perera O.P., Willis J.D., Adang M.J., Jurat-Fuentes J.L.: Cloning and characterization of the Cry1Ac-binding alkaline phosphatase

- phatase (HvALP) from *Heliothis virescens*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **39**, 294–302 (2009)
62. Peyronmet O., Vachon V., Schwartz J.L., Laprade R.: Ion channels induced in planar lipid bilayers by the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Aa in the presence of gypsy moth (*Lymantria dispar*) brush border membrane. *J. Membr. Biol.* **184**, 45–54 (2001)
63. Pocar M., Caballero P.: Molecular and insecticidal characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain isolated during a natural epizootic. *J. Appl. Microbiol.* **89**, 309–316 (2000)
64. Podlaski S.: Nowoczesne sposoby poprawy jakości nasion – otoczkowanie i taśmowanie nasion. *Hodowla Roślin i Nasiennictwo*, **2**, 15–21 (1992)
65. Raymond B., Johnston P.R., Nielsen-LeRoux Ch., Lereclus D., Crickmore N.: *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends Microbiol.* **18**, 189–194 (2010)
66. Sampson M.N., Gooday G.W.: Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. *Microbiology*, **144**, 2189–2194 (1998)
67. Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D.R., Dean D.H.: *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* **62**, 775–806 (1998)
68. Šebesta K., Sternbach H.: The specificity of inhibition of DNA-dependent RNA polymerase by *Bacillus thuringiensis* exotoxin. *FEBS Lett.* **8**, 233–235 (1970)
69. Shaban N.Z., Helmy M.H., El-Kersh M.A.R., Mahmoud B.F.: Effects of *Bacillus thuringiensis* toxin on hepatic lipid peroxidation and free-radical scavengers in rats given alpha-tocopherol or acetylsalicylate. *Compar. Biochem. Physiol. C*, **135**, 405–414 (2003)
70. Siegel J.P.: The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis* – based insecticides. *J. Invert. Pathol.* **77**, 13–21 (2001)
71. Sierpińska A.: *Bacillus thuringiensis*-stan obecny i perspektywy wykorzystania w ograniczaniu liczebności owadów liściożernych. *Sylwan*, **9**, 63–67 (1997)
72. Sierpińska A.: *Bacillus thuringiensis* w ochronie lasu – alternatywa dla insektycydów chemicznych. *Prac. Inst. Leśn. A*, **2**, 71–99 (2000)
73. Sun M., Yu Z.: Recent developments in the biotechnology of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol. Adv.* **18**, 143–145 (2000)
74. Świąćicka I., Buczek J., Fiedoruk K.: *Bacillus thuringiensis* – w zwalczaniu owadów. *Medycyna Wet.* **57**, 859–962 (2001)
75. Świąćicka I., De Vos P.: Properties of *Bacillus thuringiensis* isolated from bank voles. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 60–64 (2003)
76. Tan F., Zhu J., Tang J., Tang X.: Cloning and characterization of two novel crystal protein genes, *cry54Aa1* and *cry30Fa1*, from *Bacillus thuringiensis* strain BtMC28. *Curr. Microbiol.* **58**, 654–659 (2009)
77. Tanapongpipat S., Luxananil P., Promdonkoy B., Chewawiwat N., Audtho M., Panyim S.: A plasmid encoding a combination of mosquito-larvicidal genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* confers toxicity against a broad range of mosquito larvae when expressed in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **228**, 259–263 (2003)
78. Tsai S.F., Liu B.L., Liao J.W., Wang J.S., Hwang S., Wang S.C., Tzend Y.M., Ho S.P.: Pulmonary toxicity of thuringiensin administered intratracheally in Sprague-Dawley rats. *Toxicol.* **186**, 205–216 (2003)
79. van Frankenhuyzen K.: Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J. Invert. Pathol.* **101**, 1–16 (2009)
80. Weinzierl R., Henn T., Koehler P.G.: Microbial insecticides. <http://edis.ifas.ufl.edu/IN081> (1998), data potwierdzenia ważności adresu: 06 sierpień 2010
81. Xu Y., Nagai M., Bagdasarın M., Smith T.W., Walker E.D.: Expression of the p20 gene from *Bacillus thuringiensis* H-14 increases Cry11A toxin production and enhances mosquito-larvicidal activity in recombinant gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3010–3015 (2001)
82. Yamashita S., Akao T., Mizuki E., Saitoh H., Higuchi K., Park Y. S., Kim H. S., Ohba M.: Characterization of the anti-cancer-cell parasporal proteins of a *Bacillus thuringiensis* isolate. *Can. J. Microbiol.* **46**, 913–919 (2000)
83. Zeigler D.R.: *Bacillus thuringiensis* & *Bacillus cereus*. *Bacillus Genetic Stock Center Catalog of Strains*. Seventh edition, vol. 2., The Ohio State University, USA (1999)
84. Zimmermann G., Weiser J.: Pathogens and diseases (w) Tortricide pests – their biology, natural enemies and control. World crop pests, red. L.P.S. der Geest, H.H. Evenhuis, 5, Elsevier, Amsterdam, 1991, s. 253-271



Mariusz Krupiński<sup>1</sup>, Jerzy Długoński<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, Uniwersytet Łódzki  
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

Wpłynęło w lipcu 2011 r.

1. Wprowadzenie. 2. Charakterystyka nonylofenoli. 3. Zdolność drobnoustrojów do eliminacji nonylofenoli. 4. Produkty pośrednie rozkładu nonylofenoli. 5. Uwagi końcowe.

### Biodegradation of nonylphenols by some microorganisms

**Abstract:** In recent years much effort has been put into finding and studying microorganisms that have the ability to effectively reduce highly bioactive and toxic xenobiotics. Among them are alkylphenols, especially nonylphenol, which is highly toxic and tends to bio-accumulate. Nonylphenol mainly found as a technical nonylphenol (tNP) which is a mixture of different isomers (approximately 30 to 100) with variously branched side chain. This xenobiotic possess the ability to mimic endogenous hormones and can interact with natural estrogen receptors therefore it may induce adverse effects in many organisms. Most of the nonylphenol present in the environment results from biological and physico-chemical degradation of nonylphenol polyethoxylates (NPEO) which are widely used for domestic and industrial purposes. However, at present little is known about nonylphenol further degradation, especially about microbiological degradation pathways and possible intermediates. Partial biodegradation of nonylphenol has been observed in both pure and mixed cultures where it is cometabolically transformed mainly to hydroxylated metabolites. Few pure cultures of bacteria and filamentous fungi are able to use nonylphenol as the sole source of carbon and energy. Degradability of nonylphenol isomers is strongly dependent on the structure of the alkyl chain. There is a strong correlation between biotransformation of individual isomers and their  $\alpha$ -substitution pattern. Most studies suggest that biodegradation of nonylphenol may be initiated via oxidative breakdown of the alkyl chain or oxidative attack on the aromatic ring. Among microbial enzymes potential candidates for catalysis of nonylphenol transformation are hydroxylases of cytochrome P450 or lignin-degrading enzymes such as laccase, manganese peroxidases and lignin peroxidases.

1. Introduction. 2. Characterization of nonylphenols. 3. The ability of microorganisms to degrade of nonylphenols. 4. Intermediates of nonylphenols degradation. 5. Summary remarks.

**Słowa kluczowe:** biodegradacja, nonylofenole, cytochrom P450

**Key words:** biodegradation, nonylphenols, cytochrome P450

## 1. Wprowadzenie

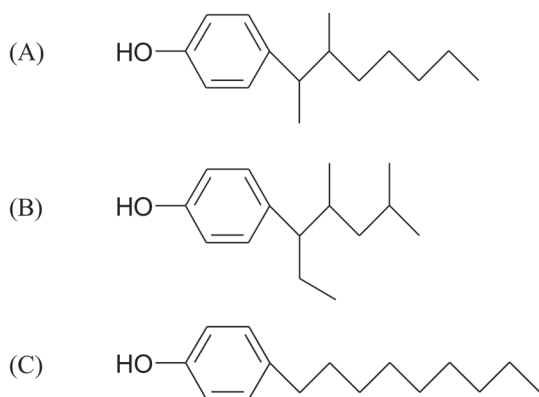
Działalność gospodarcza człowieka oraz postępująca urbanizacja stwarzają stałe zagrożenie skażenia naszego otoczenia ksenobiotykami. Ich obecność w środowisku jest bezpośrednio lub pośrednio przyczyną wielu niepożądanych procesów, przyczyniając się do zakłócenia równowagi biologicznej, jak również powstawania niekorzystnych zmian na poziomie ekosystemów. Toksyczne efekty oddziaływania polutantów na ludzi i zwierzęta, objawiają się między innymi: alergiami, zaburzeniami w funkcjonowaniu narządów, a także procesami nowotworzenia [7]. Szczególnie niebezpieczną grupę zanieczyszczeń stanowią alkilofenole (AP) zakłócające prawidłowe funkcjonowanie układu hormonalnego u ludzi i zwierząt. Typowym przedstawicielem tej grupy związków są nonylofenole (NPs) – ksenoestrogeny stosowane przy wytwarzaniu wielu produktów powszechnie używanych w gospodarstwach domowych. Jednocześnie NPs zaliczane są do substancji niebezpiecznych, których eliminacja powinna być priorytetem

w ochronie środowiska [48, 49]. Mimo wprowadzanych zakazów i ograniczeń ilość ich stale utrzymuje się na niedopuszczalnym poziomie w glebie, osadach dennych, toni wodnej, a w konsekwencji w organizmach zwierząt i ludzi [13, 14, 27, 28, 35]. Stąd też stały wzrost zainteresowania poszukiwaniem skutecznych metod degradacji tych ksenobiotyków z użyciem drobnoustrojów.

## 2. Charakterystyka nonylofenoli

Nonylofenole są związkami pochodzenia antropogenicznego. Szczególnie cenną bazę surowcową w procesach produkcyjnych stanowią *para*-nonylofenole (4-nonylofenole). Występują one w postaci kilkudziesięciu izomerów różniących się stopniem rozgałęzienia fragmentu alkilowego cząsteczki (Rys. 1). W formie mieszaniny od 30 do nawet 80–100 izomerów określanej skrótem tNP (techniczny nonylofenol), wykorzystywane są jako półprodukty do wytwarzania bardziej złożonych związków znajdujących zastosowanie w różnorodnych

\* Autor korespondencyjny: Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii Uniwersytetu Łódzkiego; ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: [jdlogo@biol.uni.lodz.pl](mailto:jdlogo@biol.uni.lodz.pl)



Rys. 1. Chemiczna struktura wybranych izomerów *para*-nonylofenolu

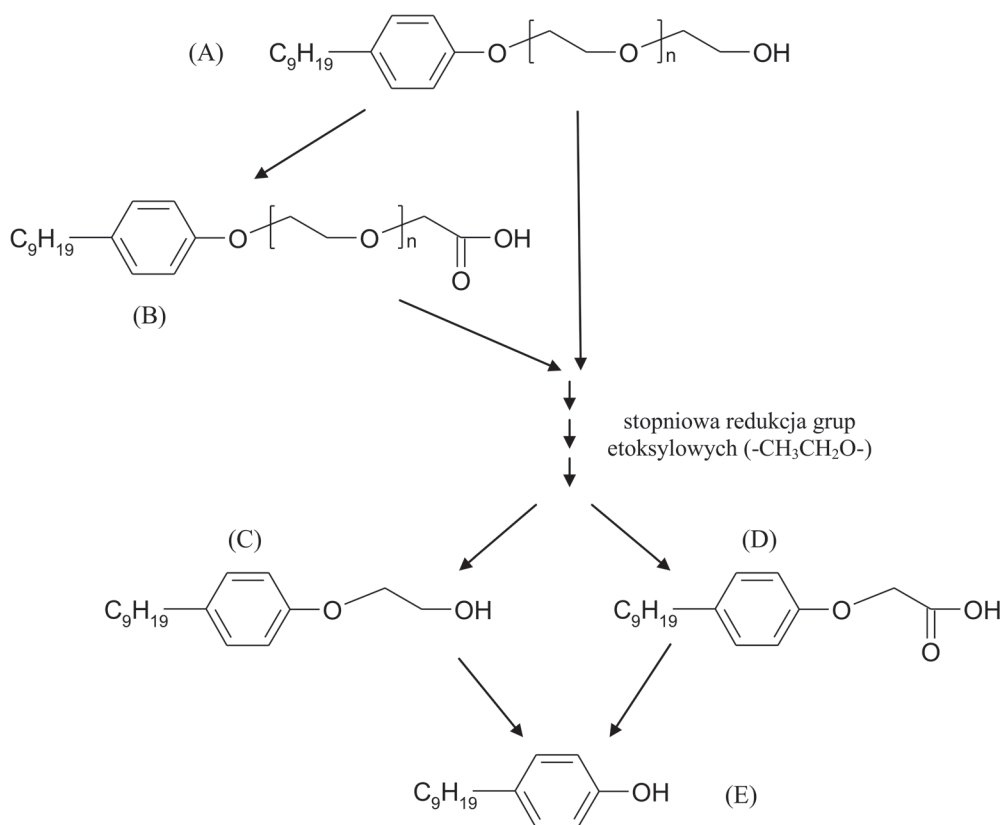
(A) – 4-(1,2-dimetylo-heptylo) fenol; (B) – 4-(1-etylo-2,4-dimetylopentylo) fenol; (C) – 4-*n*-nonylofenol (*n* – non-brenched)

gałęziach gospodarki [23, 25, 31, 35]. Techniczny nonylofenol zawiera także niewielkie ilości 2-nonylofenoli i 4-decylofenoli. Stosowane są one najczęściej do wytwarzania oksyetylenowanych nonylofenoli (NPEO), które stanowią komponenty m.in. środków piorących i czyszczących, kosmetyków, wyrobów plastikowych, materiałów kompozytowych, farb, lakierów, smarów, jak również wykorzystywane są przy produkcji tekstyliów i wyrobów papierniczych [17, 31, 42]. Rozkład tych związków z udziałem drobnoustrojów, a także czynni-

ków fizykochemicznych prowadzi do wytworzenia form *mono*- i *di*-etoksyloowanych oraz samych 4-nonylofenoli (Rys. 2) [17, 35, 42]. Niewielka ilość tych ksenobiotyków jest także uwalniana do otoczenia w trakcie procesów technologicznych, w których związki te znajdują bezpośrednie zastosowanie [28].

NPs charakteryzują się stosunkowo wysoką opornością na procesy degradacyjne oraz łatwo ulegają bioakumulacji [1, 11, 28]. Uwalniane do środowiska stwarzają zagrożenie dla zdrowia i życia wielu organizmów przede wszystkim ze względu na swoje endokrynne właściwości. Posiadają zdolność do zaburzenia funkcjonowania układu hormonalnego wielu organizmów poprzez naśladowanie endogennych hormonów i interakcję z naturalnymi receptorami [5, 37, 42]. Udowodniono, iż obecność NPs w pożywieniu przyczynia się do zmniejszenia płodności, powstawania deformacji ciała, a także zwiększenia śmiertelności zwierząt [3, 6]. NPs, mogą także wywoływać niekorzystne efekty w organizmie ludzkim jak np.: zmniejszenie objętości ejakulatu, przedwczesne pokwitanie, czy dysfunkcje tarczycy [2, 10, 35].

Obecność NPs wykazano w wielu elementach biosfery m.in. glebie, wodach gruntowych, osadach dennych, rzekach, jeziorach, powietrzu czy opadach atmosferycznych [10, 35]. Jako związki długo utrzymujące się w środowisku naturalnym (okres połowicznego rozpadu



Rys. 2. Drogi mikrobiologicznej degradacji polioksyetylenowanych nonylofenoli [17, 35, 42]

(A) – polioksyetylenowany nonylofenol; (B) – karboksylan polietoksylowanegononylofenolu; (C) – *mono*-etoksylowany nonylofenol; (D) – kwas nonylofenylooctowy; (E) – nonylofenol

w glebie i osadach dennych, wynosi od 28 do 104 dni), stwarzają realne zagrożenie dla funkcjonowania całych ekosystemów [13, 20, 42]. Ksenoestrogeny te wykazano także w próbkach tkanek oraz płynów fizjologicznych pobranych od ludzi. Wydaje się, iż główną przyczyną obecności NPs w organizmie człowieka jest skażona żywność [30, 35].

### 3. Zdolność drobnoustrojów do eliminacji nonylofenoli

Eliminacja ksenobiotyków, w tym NPs, ze skażonych środowisk jest procesem złożonym obejmującym szereg przemian o charakterze fizykochemicznym i biologicznym, często nachodzących na siebie. Należy także zaznaczyć, iż eliminacja NPs ze środowiska przez mikroorganizmy, w wielu przypadkach nie jest równoznaczna z ich degradacją oraz detoksykacją. Szereg drobnoustrojów posiada jedynie zdolność do adsorpcji NPs na powierzchni komórki i/lub gromadzenia ich w wewnętrznych strukturach komórkowych. Przykładem mogą być mikroalgi *Isochrysis galbana* hodowane w obecności 4-nonylofenolu (100 µg/l), u których po jednej godzinie inkubacji, 5% wyjściowej ilości ksenoestrogenu było zaadsorbowane na powierzchni komórek, a aż 77% uległo akumulacji wewnątrzkomórkowej (przy braku rozkładu alkilofenolu) [14]. Stanowi to poważne zagrożenie dla prawidłowego funkcjonowania łańcuchów troficznych, w których glony spełniają kluczową rolę jako pokarm dla innych organizmów [13, 14, 42]. Również u grzyba mikroskopowego *Paecilomyces lilacinus* oraz szczepów grzybów z rodzajów: *Cunninghamella*, *Mucor*, *Fusarium*, *Rhodotorula*, mimo wyraźnego spadku zawartości toksycznego substratu, nie udało się stwierdzić obecności produktów degradacji nonylofenolu (w zastosowanych układach doświadczalnych), co sugeruje iż ulegał on jedynie związaniu ze strukturami komórkowymi badanych drobnoustrojów [19, 36, 37, 43, 44].

Jedną z najważniejszych, ale jeszcze nie w pełni poznanych dróg eliminacji NPs jest rozkład z udziałem drobnoustrojów. Biodegradacja omawianych związków jest najczęściej procesem wieloetapowym i zachodzi zazwyczaj przy udziale konsorcjów mikroorganizmów, które niejednokrotnie wykazują działanie synergiczne [11, 17, 21]. Zakres i szybkość przemian biodegradacyjnych uwarunkowane są szeregiem czynników, spośród których za najważniejsze są uważane: dostępność ksenobiotyku, potencjał metaboliczny i degradacyjny drobnoustroju, warunki natlenienia oraz obecność w środowisku łatwo przyswajalnych substratów energetycznych i budulcowych [32, 39].

Wyzisolowano i zidentyfikowano szereg drobnoustrojów zdolnych do degradacji, a także całkowitej

mineralizacji NPs, zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych [17, 19, 39]. Szlaki mikrobiologicznego rozkładu NPs zostały dotychczas najlepiej poznane i scharakteryzowane u bakterii. Większość z nich należy do rzędu *Sphingomonadales* np. *Sphingomonas* sp. TTNP3 [17], *Sphingomonas cloacae* [22], *Sphingomonas xenophaga* Bayram [24], czy *Sphingobium amiense* [40]. Szczepy te cechuje przede wszystkim wysoka wydajność w trakcie eliminacji ksenoestrogenu z podłoża hodowlanego. Wykazano, że niektóre szczepy *Sphingomonas* sp. są zdolne do usuwania około 100 mg/l NPs dziennie [17]. *S. amiense* [40], *S. xenophaga* Bayram [24] i *S. cloacae* [22] wykazują ponadto zdolność do metabolizowania poszczególnych izomerów w nieobecności innych egzogennych źródeł węgla i energii. Większość mikroorganizmów rozkładających 4-nonylofenol, przekształca go aktywnie tylko w obecności kosubstratów takich jak: glukoza [33], ekstrakt maltozowy [9, 26], czy ekstrakt drożdżowy [11, 12].

Wśród drobnoustrojów wykazujących zdolność do biodegradacji NPs i mogących wykorzystywać je jako jedyne źródło węgla, występują także grzyby mikroskopowe: *Candida aquatextoris* [41], *Candida maltoza* [15] oraz *Aspergillus versicolor* IM 2161 [27]. Stanowią one przykłady niewielu scharakteryzowanych dotychczas, pod względem zdolności do rozkładu, NPs, szczepów grzybowych. Spośród nich najwyższą efektywnością omawianego procesu cechuje się *A. versicolor* IM 2161, u którego, po dwóch dniach inkubacji, wykazano ponad 98% ubytek 4-*n*-nonylofenolu (wyjściowa zawartość substratu – 100 mg/l) [27]. Porównywalny ubytek tego izomeru występował w hodowlach *Bjerkandera* sp. BOL13 oraz *Trametes versicolor*, ale dopiero po piętnastu dniach hodowli [36]. Niemal całkowitą eliminację 4-*n*-nonylofenolu obserwowano u: *Irpex lacteus* 617/93 i *Phanerochaete magnoliae* CCBAS 134/1 (po 7 dobach inkubacji), grzybów mikroskopowych UHH 1-6-18-4 oraz *Clavariopsis aquatica* (po 32 dniach hodowli), a także *Gliocephalotrichum simplex* (w 48 godzinie hodowli). Wyjściowa ilość toksycznego substratu w podłożach hodowlanych wynosiła odpowiednio: 2, 5, 22 oraz 50 mg/l [9, 26, 33].

Badania z zastosowaniem 4-nonylofenolu, znakowanego izotopem węgla <sup>14</sup>C, strzępkowych posiadają zdolność do całkowitej utylizacji nonylofenoli, z wytworzeniem dwutlenku węgla i wody, jako końcowych produktów rozkładu. Po trzech dniach hodowli grzybów *G. simplex* IM 2358 i *A. versicolor* IM 2161 z 4-*n*-NP [ring-<sup>14</sup>C(U)], odnotowano odpowiednio 29 i 20% wyjściowej ilości węgla <sup>14</sup>C w postaci dwutlenku węgla [27, 33]. Mineralizację ksenoestrogenu wykazano także u bakterii *Sphingomonas* sp. TTNP3. Po 72 godzinach inkubacji ze znakowanym substratem – *p*353NP [ring-<sup>14</sup>C(U)], 28% wyjściowej ilości izotopu <sup>14</sup>C zawarta była w formie dwutlenku węgla [18].

Wybrane drobnoustroje rozkładające nonylofenole

Drobnoustrój	Produkty rozkładu	Piśmiennictwo
<i>Sphingomonas</i> sp. TTNP3	1,4-dihydroksybenzen	[16]
<i>Candida aquatextoris</i>	4-hydroksyacetofenon, kwas 4-hydroksycynamonowy	[41]
<i>Gliocephalotrichum simplex</i>	15 metabolitów, w tym: kwas 3-(4-hydroksyfenylo) propionowy; kwas 4-hydroksybenzoesowy	[33]
<i>Pseudomonas</i> sp. JC1	4-amino-acetofenon	[46]
<i>Aspergillus versicolor</i> IM 2161	8 metabolitów w tym: kwas 4-hydroksybenzoesowy; kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy	[27]
Szczep grzyba mikroskopowego UHH 1-6-18-4	13 metabolitów w tym: kwas 4-hydroksybenzoesowy	[26]

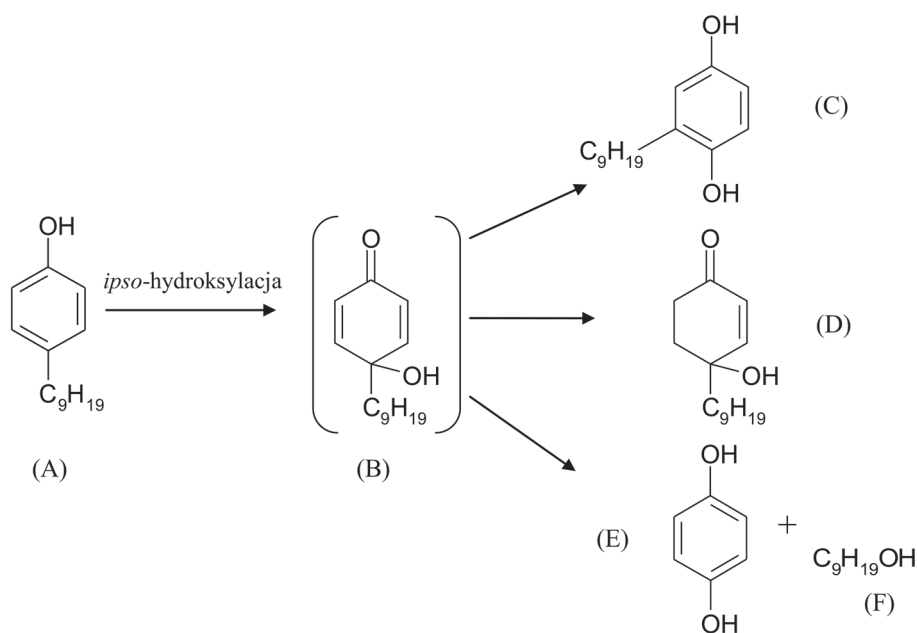
#### 4. Produkty pośrednie rozkładu nonylofenoli

Pomimo stosunkowo dużej liczby doniesień opisujących zdolność drobnoustrojów (o różnej pozycji taksonomicznej) do eliminacji NPs, niewiele jest prac poświęconych identyfikacji intermediatów powstających w trakcie biodegradacji poszczególnych nonylofenoli oraz analizujących mechanizmy odpowiedzialne za przebieg tych procesów.

W tabeli I przedstawiono mikroorganizmy rozkładające NPs oraz produkty pośrednie powstające w trakcie utylizacji substratu. W nielicznych publikacjach przedstawiających szlaki biodegradacji tych ksenobiotyków sugeruje się, iż omawiany proces jest najczęściej inicjowany hydroksylacją pierścienia aromatycznego lub przyłączaniem grupy wodorotlenowej do terminalnego atomu węgla w alifatycznym fragmencie cząsteczki. Kierunek biotransformacji ksenobiotyku zależy od stopnia

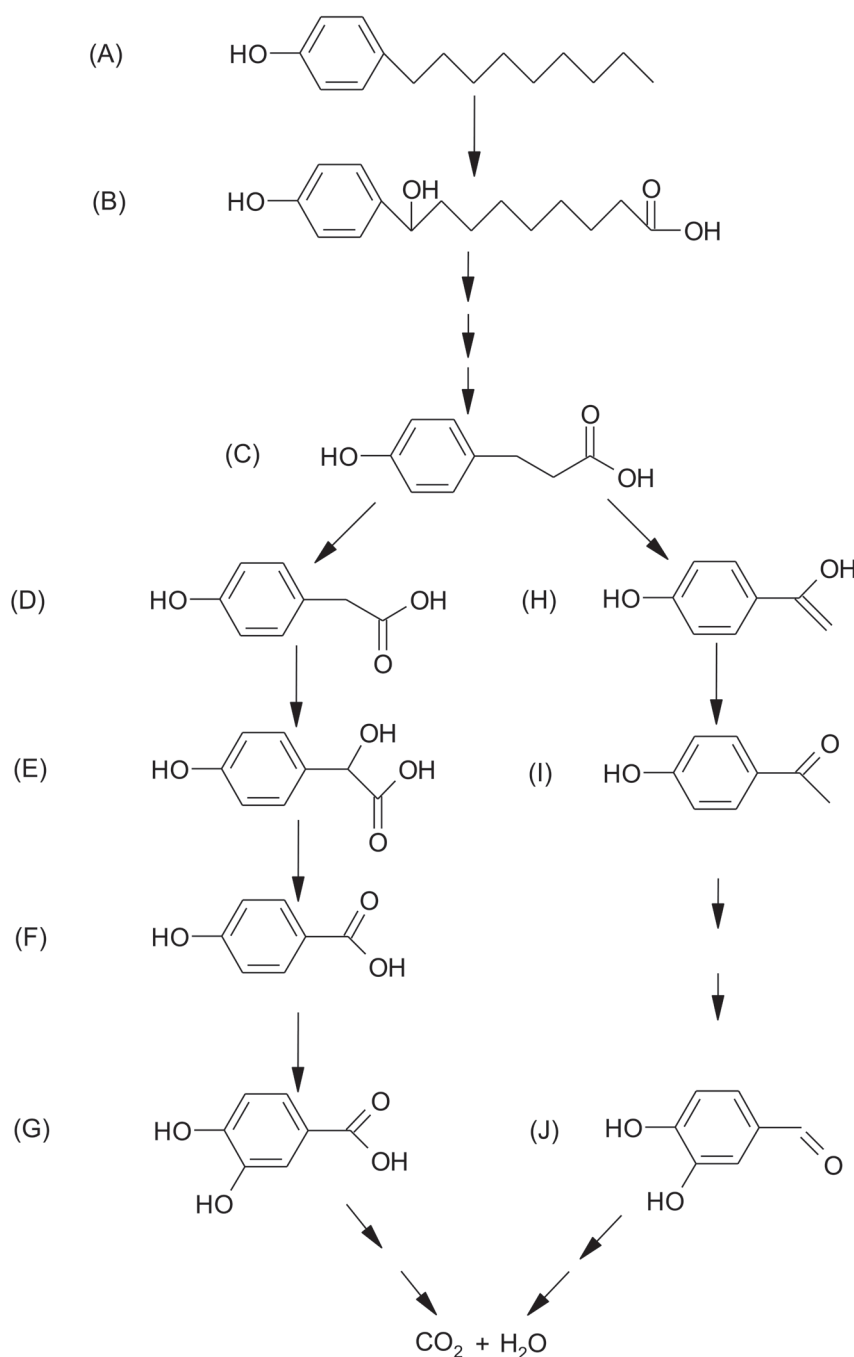
rozgałęzienia przy węglu alfa ( $\alpha$ -C) łańcucha alkilowego substratu [16, 26]. Izomery nonylofenolu posiadające grupę fenyłową przyłączoną do czwartorzędowego lub trzeciorzędowego  $\alpha$ -C podlegają zazwyczaj reakcjom *ipso*-hydroksylacji z wytworzeniem hydrochinonów, których dalsze przekształcenie odbywa się na drodze migracji łańcucha alifatycznego do sąsiedniego atomu węgla w pierścieniu bądź jego odłączenia i w konsekwencji uformowania dziewięciowęglowego alkoholu. 4-*n*-nonylofenol zawierający w strukturze cząsteczki liniową formę łańcucha alkilowego ulega przeważnie biodegradacji poprzez kaskadę następujących po sobie reakcji, na które składają się: hydroksylacja terminalnego atomu węgla części alifatycznej, utlenienie do hydroksykwasu i odłączenie krańcowych fragmentów węglowych w szlaku  $\beta$ -oksydacji [17, 23, 26, 41].

W pracach nad degradacją 4-nonylofenolu przez *S. xenophaga* Bayram sugeruje się, iż stopień rozga-



Rys. 3. Degradacja 4-nonylofenolu przez bakterie *Sphingomonas xenophaga* Bayram [23, 24]  
 (A) – 4-nonylofenol; (B) – 4-hydroksy-4-nonylo-cykloheksa-2,5-dienon; (C) – 2-nonylo-1,4-benzenediol;  
 (D) – 4-hydroksy-4-nonylo-cykloheksa-2-enon; (E) – 1,4-dihydroksybenzen; (F) – nonanol





Rys. 4. Rozkład 4-*n*-nonylofenolu przez *Glioccephalotrichum simplex* IM 2358 (szlak metaboliczny uproszczony) [33]

(A) – 4-*n*-nonylofenol; (B) – kwas 9-hydroksy-9-(4-hydroksyfenilo) nonanowy; (C) – kwas 3-(4-hydroksyfenilo) propionowy; (D) – kwas 2-(4-hydroksyfenilo) octowy; (E) – kwas 2-hydroksy-2-(4hydroksyfenilo) octowy; (F) – kwas 4-hydroksybenzoesowy; (G) – kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy; (H) – 4-(1-hydroksywinilo) fenol; (I) – 1-(4-hydroksyfenilo) etanon; (J) – 3,4-dihydroksybenzaldehyd.

łączenia łańcucha alifatycznego przy  $\alpha$ -C nie zawsze decyduje o kierunku biotransformacji związku [23, 24]. Wykazano bowiem, że rozkład różnych izomerów, w tym także 4-*n*-NP, inicjowany jest u tych bakterii przez reakcje *ipso*-hydroksylacji (Rys. 3). Odmienny mechanizm rozkładu ksenoestrogenu został wykazany w prowadzonych przez nas badaniach z użyciem nielignolitycznego grzyba *G. simplex* IM 2358. Zidentyfikowanie kilkunastu produktów degradacji 4-*n*-nonylofenolu zawierającego w strukturze cząsteczki liniową formę

łańcucha alkilowego, pozwala wnosić, iż rozkład tego ksenoestrogenu odbywa się nie na drodze  $\beta$ -oksydacji lecz poprzez odłączanie jednowęglowych członów od fragmentu alifatycznego (Rys. 4) [33]. Zastosowanie substratu znakowanego radioaktywnie węglem  $^{14}\text{C}$  pozwoliło także wykazać zdolność tego grzyba do rozszczepienia układu pierścieniowego i w konsekwencji całkowitej mineralizacji ksenoestrogenu.

Badania nad charakterystyką kompleksów enzymatycznych uczestniczących w reakcjach mikrobiologicznej

biotransformacji 4-nonylofenolu wskazują, iż jednym z kluczowych elementów odgrywających rolę w metabolizowaniu tego związku przez bakterie i grzyby mikroskopowe może być cytochrom P450 [17, 45]. Pomimo niewielu bezpośrednich dowodów potwierdzających udział tego kompleksu w rozkładzie alkilofenolu, liczne analizy wykazują aktywność hemoproteidu w mikrobiologicznej degradacji ksenobiotyków o zbliżonych właściwościach do 4-nonylofenolu [4, 29, 34]. Wykazano także, iż monooksygenazy cytochromu P450 katalizują reakcje konwersji opisywanego ksenoestrogenu m.in. u szczurów i ryb [38, 47]. W prowadzonych przez nas badaniach udowodniono, że dodatek do hodowli szczepu *A. versicolor* IM 2161 inhibitorów cytochromu P450 metyraponu i 1-aminobenzotriazolu, znacznie ograniczał eliminację 4-*n*-nonylofenolu przez ten grzyb mikroskopowy odpowiednio o 2,3 i 1,7 raza w stosunku do hodowli kontrolnych, nie zawierających inhibitorów [27].

Doniesienia literaturowe wskazują ponadto, iż u niektórych grzybów mikroskopowych, a zwłaszcza grzybów „białej zgnilizny”, istotną rolę w rozkładzie NPs mogą odgrywać enzymy ligninolityczne. Dotyczy to przede wszystkim: peroksydazy ligninowej, lakazy oraz peroksydazy manganu-zależnej [8, 26]. Obecność toksycznego substratu indukuje syntezę jednego lub kilku wymienionych enzymów. Wprowadzenie do hodowli *t*NP powoduje u *T. versicolor*, znaczący wzrost aktywności lakazy, a u *Bjerkandera adusta* zarówno lakazy, jak i peroksydazy manganu-zależnej [9].

## 5. Uwagi końcowe

Przedstawione w tym przeglądzie prace wskazują jednoznacznie na przydatność drobnoustrojów, o różnej przynależności systematycznej, do eliminacji NPs ze skażonych środowisk. Wydaje się to szczególnie ważne, ze względu na włączenie NPs (w krajach Unii Europejskiej) do listy niebezpiecznych substancji priorytetowych, które powinny być całkowicie wyeliminowane ze środowiska [48, 49]. Bogatemu zestawowi danych na temat zagrożeń, stopnia skażenia środowiska NPs oraz ich bioakumulacji, nie towarzyszy niestety, równie pogłębiona wiedza na temat przebiegu i mechanizmów rozkładu tych toksycznych związków. Analiza opublikowanych już wyników, dotyczących szlaków rozkładu NPs, pozwala sądzić, iż są one zróżnicowane. Może to w znacznej mierze wynikać z faktu, że w skażonych środowiskach drobnoustroje stykają się z *t*NP, który jest mieszaniną kilkudziesięciu związków, różniących się stopniem rozgałęzienia łańcucha alifatycznego. Wskazuje to na konieczność rozszerzenia badań nad biodegradacją nonylofenoli oraz pełniejszego poznania tych procesów, Uwidacznia to również konieczność poszu-

kiwania konsorcjów, składających się z drobnoustrojów o różnej przynależności systematycznej, zdolnych do równoczesnego i wydajnego rozkładu izomerów wchodzących w skład *t*NP.

Praca finansowana w ramach projektu NCN nr UMO-2011/01/B/NZ9/02898

## Piśmiennictwo

- Ahel M., McEvoy J., Giger W.: Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in fresh-water organisms. *Environ. Pollut.* **79**, 243–248 (1993)
- Benijts T., Lambert W., Leenheer A.P.: Analysis of multiple endocrine disruptors in environmental waters via wide-spectrum solid-phase extraction and dual-polarity ionization LC-ion trap-MS/MS. *Anal. Chem.* **76**, 704–711 (2004)
- Bevan C.L., Porter D.M., Prasad A., Howard M., Henderson L.P.: Environmental estrogens alter early development in *Xenopus laevis*. *Environ. Health Persp.* **111**, 488–496 (2003)
- Bibi Z.: Role of cytochrome P450 in drug interactions. *Nutr. Metab.* **5**, 27–36 (2008)
- Bonefeld-Jørgensen E.C., Long M., Hofmeister M.V., Vinggaard A.M.: Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-*n*-nonylphenol, and 4-*n*-octylphenol *in vitro*: New data and a brief review. *Environ. Health Persp.* **115**, 69–76 (2007)
- Brown R.J., Conradi M., Depledge M.H.: Long-term exposure to 4-nonylphenol affects sexual differentiation and growth of the amphipod *Corophium volutator* (Pallas, 1776). *Sci. Total Environ.* **233**, 77–88 (1999)
- Burke Sullivan J., Krieger G.R.: Clinical environmental health and toxic exposures, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001
- Cabana H., Jiwan J.L.H., Rozenberg R., Elisashvili V., Peninckx M., Agathos S.N., Jones J.P.: Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Corioliopsis polyzona*. *Chemosphere*, **67**, 770–778 (2007)
- Cajthaml T., Křesinová Z., Svobodová K., Möder M.: Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. *Chemosphere*, **75**, 745–750 (2009)
- Campbell C.G., Borglin S.E., Bailey Green F., Grayson A., Wozel E., Stringfellow W.T.: Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic disrupting compounds in water: A review. *Chemosphere*, **65**, 1265–1280 (2006)
- Chang B.V., Chiang B.W., Yuan S.Y.: Biodegradation of nonylphenol in soil. *Chemosphere*, **66**, 1857–1862 (2007)
- Chang B.V., Chiang F., Yuan S.Y.: Anaerobic degradation of nonylphenol in sludge. *Chemosphere*, **59**, 1415–1420 (2005)
- Chen T.C., Yeh Y.L.: Ecological risk, mass loading, and occurrence of nonylphenol (NP), NP mono-, and diethoxylate in Koaping River and its tributaries, Taiwan. *Water Air Soil Pollut.* **208**, 209–220 (2010)
- Correa-Reyes G., Viana M.T., Marquez-Rocha F.J., Licea A.F., Ponce E., Vazquez-Duhalt R.: Nonylphenol algal bioaccumulation and its effect through the trophic chain. *Chemosphere*, **68**, 662–670 (2007)
- Corti A., Frassinetti S., Vallini G., Dantone S., Fichi C., Solaro R.: Biodegradation of nonionic surfactants I. Biotransformation

- of 4-(1-nonyl)phenol by a *Candida maltosa* isolate. *Environ. Pollut.* **90**, 83–87 (1995)
16. Corvini P.F.X., Hollender J., Ji R., Schumacher S., Prell J., Hommes G., Priefer U., Vinken R., Schäffer A.: The degradation of alpha-quaternary nonylphenol isomers by *Sphingomonas* sp. strain TTNP3 involves a type II ipso-substitution mechanism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **70**, 114–122 (2006)
  17. Corvini P.F.X., Schäffer A., Schlosser D.: Microbial degradation of nonylphenol and other alkylphenols – our evolving view. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **72**, 223–243 (2006)
  18. Corvini P.F.X., Vinken R., Hommes G., Schmidt B., Dohmann M.: Degradation of the radioactive and non-labelled branched 4'(3',5'-dimethyl-3'-heptyl)-phenol nonylphenol isomer by *Sphingomonas* TTNP3. *Biodegradation* **15**, 9–18 (2004)
  19. Cravotto G., Di Carlo S., Binello A., Mantegna S., Girlanda M., Lazzari A.: Integrated sonochemical and microbial treatment decontamination of nonylphenol-polluted water. *Water, Air Soil Pollut.* **187**, 353–359 (2008)
  20. Das K.C., Xia K.: Transformation of 4-nonylphenol isomers during biosolids composting. *Chemosphere*, **70**, 761–768 (2008)
  21. Di Gioia D., Salvadori L., Zanaroli G., Coppini E., Fava F., Barberio C.: Characterization of 4-nonylphenol-degrading bacterial consortium obtained from a textile wastewater pre-treatment plant. *Arch. Microbiol.* **190**, 673–683 (2008)
  22. Fujii K., Urano N., Ushio H., Satomi M., Kimura S.: *Sphingomonas cloacae* sp. nov., a nonylphenol-degrading bacterium isolated from wastewater of a sewage-treatment plant in Tokyo. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 603–610 (2001)
  23. Gabriel F.L.P., Routledge E.J., Heidlberger A., Rentsch D., Guenther K., Giger W., Sumpter J.P., Kohler H.-P.E.: Isomer-specific degradation and endocrine disrupting activity of nonylphenols. *Environ. Sci. Technol.* **42**, 6399–6408 (2008)
  24. Gabriel F.L.P., Heidlberger A., Rentsch D., Giger W., Guenther K., Kohler H.-P.E.: A novel metabolic pathway for degradation of 4-nonylphenol environmental contaminants by *Sphingomonas xenophaga* Bayram. *J. Biol. Chem.* **280**, 15526–15533 (2005)
  25. Guenther K., Kleist E., Thiele B.: Estrogen-active nonylphenols from an isomer-specific viewpoint: a systematic numbering system and future trends. *Anal. Bioanal. Chem.* **384**, 542–546 (2005)
  26. Junghanns C., Moeder M., Krauss G., Martin C., Schlosser D.: Degradation of the xenoestrogen nonylphenol by aquatic fungi and their laccases. *Microbiology*, **151**, 45–57 (2005)
  27. Krupiński M.: Mikrobiologiczna degradacja 4-*n*-nonylofenolu. Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź 2011
  28. Lintelmann J., Katayama A., Kurihara N., Shore L., Wenzel A.: Endocrine disruptors in the environment (IUPAC technical report). *Pure Appl. Chem.* **75**, 631–681 (2003)
  29. Lisowska K., Długoński J.: Concurrent corticosteroid and phenanthrene transformation by filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. *J. Steroid Biochem.* **85**, 63–69 (2003)
  30. Lopez-Espinosa M.J., Freire C., Arrebola J.P., Navea N., Taoufik J., Fernandez M.F., Ballesteros O., Prada R., Olea N.: Nonylphenol and octylphenol in adipose tissue of women in Southern Spain. *Chemosphere*, **76**, 847–852 (2009)
  31. Matozzo V., Gagné F., Marin M.G., Ricciardi F., Blaise C.: Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review. *Environ. Int.* **34**, 531–545 (2008)
  32. Naylor C.G.: Environmental fate and safety of nonylphenol ethoxylates. *Text. Chem. Color.* **27**, 29–33 (1995)
  33. Różalska S., Szewczyk R., Długoński J.: Biodegradation of 4-*n*-nonylphenol by the non-ligninolytic filamentous fungus *Glioclathotrichum simplex*: A proposal of a metabolic pathway. *J. Hazard. Mater.* **180**, 323–331 (2010)
  34. Sasaki M., Akahira A., Oshiman K., Tsuchido T., Matsumura Y.: Purification of cytochrome P450 and ferredoxin, involved in bisphenol A degradation, from *Sphingomonas* sp. strain AO1. *Appl. Environ. Microb.* **71**, 8024–8030 (2005)
  35. Soares A., Guieysse B., Jefferson B., Cartmell E., Lester J.N.: Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environ. Int.* **34**, 1033–1049 (2008)
  36. Soares A., Jonasson K., Terrazas E., Guieysse B., Mattiasson B.: The ability of white-rot fungi to degrade the endocrine-disrupting compound nonylphenol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**, 719–725 (2005)
  37. Soares A., Murto M., Guieysse B., Mattiasson B.: Biodegradation of nonylphenol in a continuous bioreactor at low temperatures and effects on the microbial population. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**, 597–606 (2006)
  38. Thibaut A., Debrauwer L., Perdu E., Goksoyr A., Cravedi J.P., Arukwe A.: Regio-specific hydroxylation of nonylphenol and the involvement of CYP2K- and CYP2M-like iso-enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat Toxicol.* **56**, 177–190 (2002)
  39. Topp E., Starratt A.: Rapid mineralization of the endocrine-disrupting chemical 4-nonylphenol in soil. *Environ. Toxicol. Chem.* **19**, 313–318 (2000)
  40. Ushiba Y., Takahara Y., Ohta H.: *Sphingobium amiense* sp. nov., a novel nonylphenol-degrading bacterium isolated from a river sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 2045–2048 (2003)
  41. Vallini G., Frassinetti S., D'Andrea F., Catelani G., Agnolucci M.: Biodegradation of 4-(1-nonyl)phenol by axenic cultures of the yeast *Candida aquaetextoris*: identification of microbial breakdown products and proposal of a possible metabolic pathway. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **47**, 133–140 (2001)
  42. Vazquez-Duhalt R., Marquez-Rocha F., Ponce E., Licea A.F., Viana M.T.: Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. *Appl. Ecol. Environ. Res.* **4**, 1–25 (2006)
  43. Wu F., Qui L.: Kinetic study of the biodegradation of nonylphenol by *Rhodotorula* sp. *Advanced Materials Research*, **233–235**, 575–578 (2011)
  44. Wu F., Qui L., Qui G.: The study of *Rhodotorula* sp. to degrade nonylphenol in soil. International Conference on Electric Technology and Civil Engineering (ICETCE), Lushan (China), 22–24 April 2011, ISBN 978-1-4577-0289-1, pp. 4671–4674
  45. Ye X., Bishop A.M., Needham L.L., Calafat A.M.: Identification of metabolites of 4-nonylphenol isomer 4-(3',6'-dimethyl-3'-heptyl)phenol by rat and human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* **35**, 1269–1274 (2007)
  46. Yuan S.Y., Yu C.H., Chang B.V.: Biodegradation of nonylphenol in river sediment. *Environ. Pollut.* **127**, 425–430 (2004)
  47. Zalko D., Costagliola R., Dorio C., Rathahao E., Cravedi J.P.: *In vivo* metabolic fate of the xeno-estrogen 4-*n*-nonylphenol in Wistar rats. *Drug Metab. Dispos.* **31**, 168–178 (2003)
  48. Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008. *Official Journal of the European Union* L 348/84, 24.12.2008
  49. Dz. U. 2010 nr 138 poz. 934. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 2 lipca 2010 r. w sprawie wykazu substancji priorytetowych w dziedzinie polityki wodnej.



SKUTECZNE I NIESKUTECZNE  
PREPARATY MIKROBIOLOGICZNE STOSOWANE  
W OCHRONIE I UPRAWIE ROŚLIN  
ORAZ RZETELNE I NIERZETELNE METODY ICH OCENY

Stefan Martyniuk

Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa  
– Państwowy Instytut Badawczy, ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy

Wpłynęło w maju 2011 r.

1. Wstęp. 2. Charakterystyka biopreparatów stosowanych w ochronie roślin. 3. Charakterystyka preparatów mikrobiologicznych oddziałujących na plonowanie roślin i właściwości gleb. 4. Podsumowanie

**Effective and ineffective microbial preparations used in plant protection and production and methods of their evaluation**

*Abstract:* Main principles of production and evaluation of microbial bio-preparations (inoculants) used in plant protection to control pathogens and pests (biological control) and in plant production to stimulate growth and yields of crops are discussed in this article. The registration procedure of biological control agents (b.c.a.), which for many producers of b.c.a. is too costly and too restrictive, however this procedure ensures that the commercial use of b.c.a. is safe for the people and for the environment and also that these products are fair with respect to their quality. With respect to microbial preparation and other bio-products used to improve soil properties, particularly those designated for ecological (organic) crop production, the registration procedure is mild. This enables selling microbial bio-preparations whose quality and effectiveness have not been proven. More critical assessment of experimental results of studies on these products would result in spreading of more reliable information on the real quality and usefulness of such bio-preparations.

1. Introduction. 2. Characteristics of bio-preparations used in plant protection. 3. Characteristics of microbial preparations affecting crop yields and soil properties. 4. Summary

**Słowa kluczowe:** biopreparaty, biologiczna ochrona roślin, produkcja roślinna  
**Key words:** bio-preparations, biological plant protection, plant production

## 1. Wstęp

W praktyce rolniczej preparaty mikrobiologiczne stosowane są przede wszystkim w ochronie roślin do ograniczania rozwoju patogenów i szkodników (biologiczna ochrona), zwłaszcza w rolnictwie integrowanym i ekologicznym [1, 3, 8, 10, 11, 14, 21, 25, 29, 45–47, 50]. Dostępne są również preparaty mikrobiologiczne wykorzystywane do stymulowania wzrostu i plonowania niektórych roślin uprawnych, a przykładami takich biopreparatów są szczepionki zawierające bakterie symbiotyczne roślin bobowatych (motylkowatych) oraz szczepionki stosowane w leśnictwie do mikoryzacji sadzonek w szkółkach drzew [2–6, 14, 19, 26, 28, 39, 40–43, 52]. W ostatnim dziesięcioleciu znalazły się w handlu także preparaty pseudo-mikrobiologiczne, które reklamowane są jako środki poprawiające rzekomo nie tylko mikrobiologiczne właściwości gleb, ale także ich właściwości chemiczne i fizyczne, oraz podnoszące w niewiarygodnie dużym stopniu plonowanie roślin [9, 16, 54, 55].

W odniesieniu do tych produktów stwierdzić można wiele nierzetelności, a ich jakość z mikrobiologicznego punktu widzenia pozostawia także wiele do życzenia. Zanim omówione zostaną dokładniej wymienione wyżej grupy biopreparatów, warto przypomnieć jak ważną rolę odgrywają mikroorganizmy w środowisku glebowym. Liczne badania wykazały, że biomasa mikroorganizmów w glebach stanowi około 85% całej biomasy wszystkich organizmów żyjących w tym środowisku i aż 90% ditlenku węgla ( $\text{CO}_2$ ) powstającego w glebach ma pochodzenie drobnoustrojowe [3, 8, 35, 37, 50]. Dane te świadczą o dużej aktywności metabolicznej i ogromnym znaczeniu mikroorganizmów dla większości procesów zachodzących w środowisku glebowym. Do najważniejszych funkcji organizmów glebowych należą:

1. Rozkład i mineralizacja materii organicznej (resztki pozbiorowe, obornik i inne nawozy naturalne, komposty, popłony) [3, 14, 18, 20, 23, 35, 39]. W procesach tych oprócz mikroorganizmów istotną rolę odgrywa także fauna glebowa (dżdżownice, roztocza), która

\* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy; e-mail: [sm@iung.pulawy.pl](mailto:sm@iung.pulawy.pl)

przyczynia się do rozdrabniania i mieszania materii organicznej z glebą, w wyniku czego ułatwiany jest jej rozkład i mineralizacja przez mikroorganizmy, czyli bakterie i grzyby glebowe. Rozkład resztek organicznych jest bardzo ważny nie tylko ze względu na uwalnianie mineralnych form składników odżywczych, które stanowią źródło pokarmu dla roślin uprawnych, ale również dlatego że, w wyniku procesów mikrobiologicznej transformacji materii organicznej powstaje próchnica glebowa, której zawartość w glebie jest jednym z najważniejszych czynników decydujących o zdolności gleby do magazynowania wody i składników pokarmowych, a także o fizycznej strukturze (gruzelkowatość, wymiana gazowa) gleby. Ponadto, różne produkty przemiany materii, np. śluzki bakteryjne czy glomaliny (substancje produkowane przez strzępki grzybów endomikoryzowych) wytwarzane przez drobnoustroje w czasie rozkładu materii organicznej, również przyczyniają się do kształtowania fizycznych właściwości gleb poprzez zlepianie cząstek glebowych w gruzelki, zwiększając w ten sposób odporność gleb na erozję wodno-powietrzną.

2. Rozkład i detoksykacja różnych substancji zanieczyszczających gleby (ksenobiotyków) [7, 12, 27, 35, 37]. Udział w procesach detoksykacji mają przede wszystkim mikroorganizmy glebowe. Ich niezwykle bogactwo, duża aktywność i zdolności przystosowawcze powodują, że nie tylko środki ochrony roślin, powszechnie stosowane w nowoczesnym, intensywnym rolnictwie, ale również inne substancje, np. zanieczyszczenia przemysłowe, ulegają mikrobiologicznemu rozkładowi do związków prostszych, na ogół mniej aktywnych biologicznie.

3. Ograniczanie rozwoju szkodników i patogenów roślin [1, 8, 10, 11, 21, 25, 29, 45–47, 50]. Ta aktywność mikroorganizmów związana jest przede wszystkim z występowaniem w glebie konkurencji, m.in. o pokarm, pomiędzy jej mieszkańcami, a także zjawiskom antagonizmu i nadpasożytnictwa. Na przykład, wiele bakterii glebowych hamuje rozwój grzybów fitopatogenicznych produkując różnego rodzaju substancje antybiotyczne lub enzymy rozkładające strzępki grzybów. Z kolei niektóre grzyby glebowe mają zdolność pasożytowania na nicieniach i owadach.

4. Tworzenie układów symbiotycznych z roślinami [4–6, 26, 31, 32, 40, 48, 52]. Najlepiej znanym przykładem symbiozy mikroorganizmów glebowych z roślinami jest współżycie bakterii brodawkowych (rizobiów) z roślinami motylkowatymi. Wymiana składników odżywczych pomiędzy partnerami tej symbiozy odbywa się w brodawkach korzeniowych, w których bytujące tam rizobia przekazują roślinie motylkowatej azot (który pobrały z atmosfery) w zamian za węglowodany jako źródło energii niezbędnej bakteriom do przeprowadzania procesu redukcji azotu atmosferycznego. Proces ten jest więc bardzo korzystny zarówno z ekologicznego jak i rolniczego punktu widzenia. Uprawa roślin motylko-

watych nie wymaga bowiem na ogół stosowania nawożenia azotowego. Innym rodzajem symbiozy jest mikoryza, czyli symbioza wielu gatunków grzybów glebowych z korzeniami roślin. W tym przypadku grzyb mikoryzowy nie ma zdolności do asymilacji azotu atmosferycznego, a jego współpraca z rośliną polega przede wszystkim na ułatwianiu partnerowi pobierania wody i soli mineralnych, a także na ochronie korzeni przed grzybami chorobotwórczymi. Mikoryza jest szeroko rozpowszechniona w przyrodzie; tworzą ją zarówno drzewa leśne (ekto-mikoryza) jak i rośliny zielne (endo-mikoryza), w tym większość roślin uprawnych.

Wraz z rozwojem badań podstawowych z zakresu mikrobiologii gleby, których efektem było m.in. wyodrębnienie i zidentyfikowanie w XX wieku wielu ważnych grup mikroorganizmów glebowych, a także coraz dokładniejsze poznawanie ich biologii, ekologii, fizjologii i kluczowej roli w przeprowadzaniu wyżej wymienionych procesów, rozwijały się również badania utytarne nad wykorzystywaniem różnych grup pożytecznych drobnoustrojów w praktyce rolniczej. W efekcie tych badań opracowano i wdrożono do produkcji w różnych krajach liczne biopreparaty, wśród których dominują preparaty wykorzystywane w biologicznej ochronie roślin, czyli preparaty zawierające w swoim składzie mikroorganizmy antagonistyczne lub pasożytnicze w stosunku do patogenów i szkodników roślin, oraz mniej liczne szczepionki stymulujące aktywność mikrobiologiczną gleb lub korzystnie oddziałujące na wzrost i plonowanie roślin, np. biopreparaty zawierające mikroorganizmy symbiotyczne (bakterie brodawkowe roślin motylkowatych, grzyby mikoryzowe).

## 2. Charakterystyka biopreparatów stosowanych w biologicznej ochronie roślin

W 2005 roku w krajach członkowskich OECD zarejestrowanych było około 214 biologicznych środków ochrony roślin (biopestycydów) [17]. Jest to dość liczna grupa biopreparatów wskazująca na to, że badania prowadzone w wielu ośrodkach naukowych zakończyły się sukcesem, a więc wdrożeniem do produkcji biopestycydów, zawierających różne grupy mikroorganizmów (wirusy, bakterie i grzyby) oraz mikroskopijne nicienie (Tabela I). Jest to również niewątpliwy sukces producentów tych środków, często niewielkich firm, którzy podjęli trud, także finansowy, związany z rejestracją swoich produktów. Trzeba w tym miejscu zaznaczyć, że rejestracja biologicznych środków ochrony (b.s.o.) roślin odbywa się na podobnych zasadach jak chemicznych środków ochrony [45–47], czyli jest to proces nie tylko rygorystyczny ale także bardzo kosztowny. To m a l a k w swoim opracowaniu [45] podaje przykład szwedzkiej firmy Bioagri, która na zarejestrowanie na terenie UE

Tabela I  
Biologiczne środki ochrony roślin zawierające mikroorganizmy zarejestrowane w krajach OECD [16]

Grupa biopestycydów	Liczba zarejestrowanych preparatów	Najważniejsze organizmy jako aktywne składniki (Liczba preparatów)
Bioherbicydy	1	<i>Alternaria destruens</i>
Biobakteriocydy	5	<i>Agrobacterium</i> (3), <i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i>
Biofungicydy	60	<i>Trichoderma</i> (25), <i>Gliocladium</i> , <i>Pythium</i> , <i>Coniothyrium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptomyces</i>
Bioinsektocydy	83	<i>Bacillus thuringiensis</i> (72), <i>Baeuveria basiana</i> (10)
Bionematocydy	64	<i>Metharhizium</i> (8), <i>Peacilomyces</i> , <i>Verticillium</i> , <i>Bacillus</i> (8), wirusy (14), <i>Heterorhabditis</i> (10), <i>Steinernema</i> (20)

dwóch biopreparatów zawierających bakterię *Pseudomonas chlororaphis* wydała 4,3 miliona Euro. Trudna i kosztowna procedura rejestracyjna b.s.o. roślin powoduje, że część producentów rezygnuje z wytwarzania biopreparatów, co niewątpliwie zmniejsza ich asortyment i ogranicza zakres stosowania biologicznej ochrony w rolnictwie i ogrodnictwie. Z tego m.in. powodu od kilku lat trwają w UE prace zmierzające do zmiany (złagodzenia) zasad rejestracji b.s.o. roślin [25, 46]. Choć proces rejestracyjny tych środków jest dość kłopotliwy dla producentów i niewątpliwie wymaga zmian, to jednak należy podkreślić, że zapewnia on nie tylko bezpieczeństwo ich stosowania (dla ludzi i środowiska), ale także powoduje, że b.s.o. są produktami o dobrej jakości. Przy czym w przypadku tych środków chodzi zwłaszcza o jakość procesu ich wytwarzania i czystości produktu końcowego. Jest to szczególnie ważne w odniesieniu do preparatów mikrobiologicznych, bowiem ich proces produkcyjny obejmuje m.in. kilkietapowe rozmnażanie czystej kultury mikroorganizmu, który jest aktywnym czynnikiem preparatu [26, 33, 40, 41, 48]. Proces ten rozpoczyna się od przygotowania czystej „kultury matecznej”, a w kolejnych etapach dochodzi do dalszego rozmnożenia mikroorganizmów w wyniku ich przenoszenia do urządzeń hodowlanych (fermentorów) zawierających coraz większe objętości sterylnych pożywek, najczęściej płynnych. Liczba tych etapów uzależniona jest oczywiście od skali produkcji. W przypadku niektórych biopreparatów, np. zawierających *Bacillus thuringiensis*, skala produkcji jest bardzo duża i prowadzona jest ona z wykorzystaniem fermentorów o objętości nawet 100 000 litrów [41, 47]. Fermentory są urządzeniami, w którym rozmnażanie mikroorganizmów odbywa się w sposób kontrolowany,

jałowy i optymalny. Częścią centralną fermentora jest zbiornik, najczęściej wykonany ze stali nierdzewnej, który wyposażony jest w agregaty umożliwiające wyjaławianie wprowadzanej do niego pożywki płynnej oraz jej napowietrzanie i utrzymywanie w stałej (optymalnej) temperaturze w czasie całego procesu hodowlanego. Rozmnażanie mikroorganizmów w fermentorach trwa zwykle kilka dni i kończy się gdy gęstość hodowli osiąga wymagany poziom. Bardzo ważną czynnością, od której zależy finalna jakość wytwarzanego biopreparatu, jest kontrolowanie czystości hodowli mikroorganizmu na każdym z ww. etapów przenoszenia i powiększania objętości hodowli. Zakażenie hodowli, np. kultury matecznej, rozmnażanego drobnoustroju innymi mikroorganizmami może bowiem doprowadzić do zdominowania, a nawet całkowitego wyeliminowania z hodowli właściwego drobnoustroju w dalszych etapach tego procesu. Jest to szczególnie ważne w przypadku bakterii, które charakteryzują się znacznie wolniejszym tempem namnażania (podziału komórek), jak np. rizobia, niż inne bakterie, np. z rodzaju *Pseudomonas* lub *Bacillus* [33, 48]. W zależności od przyjętej technologii produkcji biopreparatu, uzyskana w fermentorze biomasa mikroorganizmów jest odseparowywana od płynu pochodzącego lub, jak to ma miejsce w przypadku szczepionek rizobiowych, cała hodowla wykorzystywana jest w dalszym etapie produkcji, w którym następuje dokładne wymieszanie zawiesiny bakterii z nośnikiem. Większość biopreparatów mikrobiologicznych produkowana jest w postaci preparatów stałych, suchych (liofilizowanych) lub wilgotnych. Tylko nieliczne mają postać płynną. W obydwu przypadkach mikroorganizmy wymieszane są z jałowym nośnikiem (talk, pył torfu lub węgla brunatnego, minerały ilaste), którego rolą jest zapewnienie możliwie jak najlepszych warunków do przeżywania mikroorganizmów w preparacie handlowym oraz jak najefektywniejszego sposobu jego aplikacji [32, 40, 47].

Ponadto, procedura rejestracyjna wymaga od producentów podania wielu innych ważnych informacji [10, 45–47], m.in. takich jak:

- dokładna nazwa i charakterystyka mikroorganizmu (makroorganizmu),
- dane dotyczące kolekcji, w której czysta kultura mikroorganizmu została zdeponowana,
- ilościowy skład preparatu (aktywna forma mikroorganizmu i jego zawartość, a także innych składników, np. nośnika),
- metoda oznaczania (identyfikacji) składu produktu,
- warunki przechowywania i okres przydatności,
- zakres (cel) i zasady stosowania,
- wynik badań potwierdzających skuteczność biopreparatu.

Wszystko to powoduje, że b.s.o. roślin są bez wątpienia produktami bezpiecznymi i solidnymi pod względem

jakości, znany jest bowiem ich dokładny skład, konkretny cel i zakres ich stosowania, oraz – co jest bardzo ważne – znana jest metoda badania i identyfikacji, a więc także kontrolowania, ich składu i zawartości czynnika aktywnego.

Dokładniejsze omawianie skuteczności biologicznych środków ochrony roślin w praktyce rolniczej nie jest celem tego artykułu. Trzeba jednak stwierdzić, że skuteczność ta jest w przypadku wielu b.s.o. niewątpliwie mniejsza niż środków chemicznych. Dotyczy to zwłaszcza biopreparatów opartych na mikroorganizmach (bakteriach i grzybach), które aplikowane są do gleby, czyli do środowiska charakteryzującego się bardzo dużą złożonością różnego rodzaju oddziaływań, w tym antagonistycznych, oraz ogromną konkurencyjnością o energię i składniki odżywcze pomiędzy drobnoustrojami glebowymi i innymi mieszkańcami gleby. Gleba jest także środowiskiem o dużej zmienności czynników abiotycznych (wilgotność, temperatura, odczyn (pH), zabiegi agrotechniczne), które bardzo istotnie wpływają na przeżywalność i skuteczność organizmów wprowadzanych do gleby [1, 5, 8, 9, 14, 28, 35, 37, 50]. Być może jest to jeden z ważniejszych czynników powodujących, że w ostatnim dziesięcioleciu sprzedaż preparatów zawierających makroorganizmy (pasożytnicze i drapieżne owady, drapieżne roztocza), czyli środków stosowanych w bardziej kontrolowanych i mniej złożonych warunkach (szklarnie, części nadziemne roślin) jest znacznie większa niż biopreparatów opartych na mikroorganizmach – odpowiednio 55–60% i 26% ogólnej sprzedaży b.s.o. roślin [45, 46]. Warto też dodać, że choć zakres praktycznego wykorzystywania biopreparatów w ochronie roślin jest ciągle mały, ma on jednak tendencje wzrostowe. Na przykład, Tomalak [45] podaje, że w 2004 roku wartość rynku preparatów biologicznych (opartych na makroorganizmach i mikroorganizmach) stosowanych w ochronie roślin wyniosła około 2,5% ogólnej wartości rynku środków ochrony roślin, a obecnie udział ten prognozowany jest na 4,2–4,5%. Wzrastające zapotrzebowanie na biopreparaty związane jest prawdopodobnie głównie z rozwojem proekologicznych metod uprawy roślin, w tym rolnictwa ekologicznego [5, 8, 24, 29, 47].

### 3. Charakterystyka preparatów mikrobiologicznych oddziaływujących na plonowanie roślin i właściwości gleb

W tej grupie biopreparatów najbardziej znane na świecie i najszerzej stosowane w praktyce rolniczej, także w naszym kraju, są wspomniane już wcześniej szczepionki zawierające bakterie (rizobia), które wiążą azot atmosferyczny w symbiozie z korzeniami roślin (bobowatych) motylkowatych. Podobnie jak w przy-

padku b.s.o. technologia wytwarzania tych szczepionek obejmuje następujące etapy:

- zgromadzenie kolekcji różnych szczepów drobnoustrojów,
- kontrolowanie czystości i jakości (efektywności symbiotycznej) tych szczepów,
- wieloetapowe rozmnażanie mikroorganizmów i kontrolowanie czystości uzyskiwanej biomasy,
- przygotowywanie jałowego nośnika (drobno zmieszany torf lub węgiel brunatny),
- mieszanie biomasy bakterii z nośnikiem i konfekcjonowanie szczepionki [26, 33, 40, 48].

W naszym kraju szczepionki rizobiowe, a także inne preparaty mikrobiologiczne, dopuszczane są do obrotu przez MRiRW po spełnieniu wymogów stosownej procedury rejestracyjnej. Procedura ta, choć znacznie łagodniejsza niż w przypadku rejestracji b.s.o. roślin, jest wystarczająco szczegółowa, ponieważ, oprócz danych na temat składu, opisu procesu produkcyjnego i sposobu stosowania produktu, wymaga także przedstawienia wyników doświadczeń potwierdzających skuteczność rejestrowanego biopreparatu w praktyce. Z tego powodu szczepionki zawierające bakterie symbiotyczne roślin motylkowatych są biopreparatami o sprawdzonej efektywności i dobrej jakości po względem mikrobiologicznym [33, 41].

W odniesieniu do preparatów mikrobiologicznych, a także innych produktów określanych jako środki poprawiające właściwości gleby, rejestrowanych na potrzeby rolnictwa ekologicznego, procedura rejestracyjna jest jeszcze bardziej łagodna, ponieważ nie stawia ona wymogu prowadzenia badań potwierdzających skuteczność rolniczą tych produktów. Wykorzystują to niektórzy producenci lub dystrybutorzy różnych biopreparatów wprowadzając na rynek w naszym kraju produkty, których efektywność i jakość z mikrobiologicznego punktu widzenia są bardzo wątpliwe. Najbardziej znanym produktem w tej grupie jest preparat pochodzenia japońskiego – tzw. Efektywne Mikroorganizmy (EM) i różne jego modyfikacje (EM1, EM5, Ema) [16, 53, 54]. Pod względem mikrobiologicznym biopreparaty te nie spełniają większości z wymienionych w tym artykule wymogów stawianych rzetelnym produktem wykorzystywanym w ochronie i uprawie roślin. Na przykład, nieznaną jest skład gatunkowy drobnoustrojów wchodzących w skład EM-ów. Najczęściej podaje się tylko, że składają się one z 80 gatunków mikroorganizmów beztlenowych i tlenowych reprezentowanych przez bakterie fermentacji mlekowej, bakterie fototroficzne, promieniowce, drożdże i inne grzyby, ale brak jest jakiegokolwiek informacji na temat liczebności wymienionych grup drobnoustrojów [16, 53]. Ponadto nieznaną są żadne oryginalne prace naukowe, w których opisano pochodzenie mikroorganizmów wchodzących w skład tych szczepionek, metody ich identyfikacji i namnażania



oraz wyniki badań wykazujących przydatność i skuteczność omawianych biopreparatów w praktyce. Preparaty EM produkowane są głównie w formie płynnych zawiesin, o kwaśnym odczynie ( $\text{pH} < 4,0$ ) i rozpraważane w szczelnie zamkniętych pojemnikach plastikowych o różnej objętości. Nie ulega wątpliwości, że są to warunki niesprzyjające dłuższemu przeżywaniu mikroorganizmów, zwłaszcza tlenowych. Potwierdzają to wyniki badań autorów holenderskich, którzy stosując analizy DNA metodą PCR-DGGE stwierdzili niskie liczebności bakterii w handlowym preparacie EM1, ale po aktywacji tego preparatu liczebność bakterii wzrosła [51]. Autorzy ci stwierdzili ponadto, że różne serie zarówno nieaktywowanych jak i aktywowanych produktów EM charakteryzowały się dużą zmiennością pod względem zawartości w nich bakteryjnego DNA, co świadczy o bardzo małej powtarzalności (stabilności) tych preparatów. A oto w jaki sposób producenci i dystrybutorzy preparatu EM1 zalecają rolnikom uaktywnienie tego środka: do plastikowego pojemnika należy wlać 1 część (np. 1 litr) EM1, 1 część melasy trzcinowej jako pożywki, oraz 23 części niechlorowanej wody, wymieszać, szczelnie zamknąć pojemnik i inkubować przez około 7 dni. Jest rzeczą oczywistą, że w tych warunkach powtarzalność uzyskiwanych hodowli musi być niska, a ponadto rolnicy używając niejałowej wody i melasy oraz niejałowego pojemnika rozmnażają nie tylko nieznanne mikroorganizmy znajdujące się w EM-ach, ale także te które zawarte były w niejałowej wodzie, w pojemniku, czy w powietrzu – a przecież mogą to być nawet drobnoustroje szkodliwe.

Jeszcze więcej nierzetelności można stwierdzić odnośnie skuteczności EM-ów w praktyce rolniczej. Twórcy i dystrybutorzy tych produktów prezentują je jako środki o wręcz cudownych właściwościach (np. zawarte w nich mikroorganizmy przeżywają w temp. ponad  $700^{\circ}\text{C}$ ) i skutecznych nie tylko w stymulowaniu wielu procesów mikrobiologicznych w glebach, ale także korzystnie oddziałujących na wzrost i zdrowotność roślin oraz poprawiających chemiczne i fizyczne właściwości gleb [16, 53, 54]. A ponadto EM-y redukują emisję amoniaku i innych odorów z obór i chlewni, przyspieszają proces kompostowania nawozów naturalnych i resztek roślinnych oraz korzystnie wpływają na jakość uzyskiwanych z tych materiałów kompostów. Niestety nie przedstawiają na to żadnych naukowo udokumentowanych, rzetelnych i wiarygodnych wyników badań. Brak takich publikacji doskonale ilustruje i potwierdza praca przeglądowa C o n d o r i wsp. [9]. Autorzy ci dokonując przeglądu literatury światowej dotyczącej oddziaływania EM-ów na plonowanie różnych roślin i właściwości gleb, stwierdzili, że większość doświadczeń z pozytywnymi wynikami badań przeprowadzono w krajach orientalnych (Pakistan, Indonezja, Thailandia), a wyniki tych badań publikowano najczęściej w nierecenzowanych

materiałach z konferencji sponsorowanych przed producentów i dystrybutorów, a tylko nieliczne w czasopiśmie o niskim IF (Impact Factor). Natomiast żadne z renomowanych czasopism naukowych o tematyce gleboznawczej, takich jak: *European Journal of Soil Biology*, *Geoderma*, *Soil Biology and Biochemistry*, *Soil Sc. Soc. Am. Journal*, czy *Agriculture Ecosystems & Environment*, nie zamieściło na swoich łamach jakiegokolwiek pracy na temat EM-ów. Bardzo ważna, krytyczna praca badaczy holenderskich opublikowana w dobrym czasopiśmie [51] wykazała nieskuteczność użytych w tych badaniach preparatów EM.

Warto też dodać, że większość analizowanych przez C o n d o r i wsp. [9] badań charakteryzowała się błędami metodycznymi (m.in. niewłaściwy obiekt kontrolny), przyczynkowością i brakiem analiz statystycznych. Prawidłowe obiekty kontrolne zastosowano w badaniach polowych przeprowadzonych w Szwajcarii [34]. Wspomniano już wcześniej, że EM-y produkowane są z wykorzystaniem melasy trzcinowej (jako pożywki dla drobnoustrojów), która jest bogata w liczne składniki, m.in. mikroelementy, mogące korzystnie oddziaływać na wzrost roślin. Ponadto, preparat EM-ów to bardzo kwaśna zawiesina. Dlatego w badaniach nad tym biopreparatem stosować należy dwa obiekty kontrolne; jeden „zerowy” – bez EM-ów, a w drugim do opryskiwania gleby lub roślin należy używać takiego samego płynu (rozcieńczona zawiesina EM-ów) jak we właściwym obiekcie badawczym, ale po zabiciu w nim mikroorganizmów lub po usunięciu mikroorganizmów w inny sposób, np. przez filtrowanie. W 4-letnim doświadczeniu polowym przeprowadzonym w warunkach szwajcarskich zastosowano takie właśnie dwa obiekty kontrolne. We wnioskach końcowych autorzy tego doświadczenia jednoznacznie stwierdzają, że preparaty EM-ów nie miały istotnego wpływu ani na plony badanych roślin ani na właściwości mikrobiologiczne gleby [34]. Podobne, negatywne wyniki można znaleźć w większości (bardzo licznych) publikacji polskich autorów, pomimo że w badaniach tych stosowano na ogół tylko jeden obiekt kontrolny (bez EM-ów lub oprysk wodą). Na przykład, D a c h i wsp. [13] nie stwierdzili żadnego wpływu dodatku preparatu EM na proces kompostowania osadu ściekowego, jakość uzyskanego kompostu obornikowego czy na emisję gazów ( $\text{CO}_2$ , amoniak). Także na podstawie wyników innych badań krajowych, zarówno laboratoryjnych jak i polowych, można stwierdzić, że EM-y oraz takie preparaty jak użyźniacz glebowy, Bactofil A czy Phylozonit, stosowane doglebowo lub jako opryski na liście, nie powodują istotnych przyrostów plonów badanych roślin uprawnych (kukurydza, pszenica, sałata) oraz nie mają wpływu na właściwości mikrobiologiczno-biochemiczne gleby [22, 38, 44, 49, 53]. Na koniec warto podkreślić, że autorzy ww. publikacji zagranicznych krytycznie analizują wyniki uzyskane przez innych badaczy

[9], a badania własne podsumowują jednoznacznymi wnioskami, w tym przypadku wyraźnie podkreślają w nich nieskuteczność preparatów EM [34, 51]. Czytając publikacje krajowe dotyczące EM-ów i innych biopreparatów mikrobiologicznych ma się natomiast wrażenie, że autorzy tych badań z góry zakładają pozytywne oddziaływanie testowanych produktów i „na siłę” doszukują się tych pozytywów. Na przykład, jeden z autorów napisał w streszczeniu (brak wniosków) swoich badań, że EM-y (oraz inny preparat) spowodowały wzrost różnych cech o taki a taki procent i dopiero w ostatnim zdaniu dodał, że różnice te nie były istotnie statystycznie [38]. W podsumowaniu innych badań, przeprowadzonych bez powtórzeń i bez analiz statystycznych, można przeczytać, że „Preparat mikrobiologiczny EM wykazywał nieznaczny wpływ na różnorodność mikoflory nasion grochu” [36], lub „Zastosowany oprysk biopreparatem EM początkowo powodował spadek liczebności większości badanych grup fizjologicznych drobnoustrojów oraz obniżenie aktywności badanych enzymów w glebie a następnie obserwowano tendencje wzrostowe” [53]. I jeszcze jeden wniosek z kolejnych badań – „Zaprawianie ziarna pszenicy jarej preparatem EM<sup>R</sup> nie wpłynęło na wyższą procentową zawartość suchej masy w korzeniach” [15]. Wyniki badań przeprowadzonych przez autorów cytowanych publikacji świadczą, że ww. preparaty mikrobiologiczne nie wykazują istotnego wpływu ani na plonowanie roślin ani na właściwości gleby. Badania nad wykorzystaniem różnych grup mikroorganizmów glebowych w praktyce rolniczej do podnoszenia żyzności gleb i plonowania roślin prowadzono już od zarania rozwoju mikrobiologii glebowej. Na przykład, szczepionki zawierające bakterie symbiotyczne roślin motylkowatych (bobowatych) stosowano już po koniec XIX wieku [3, 5, 52]. Szczepionki te produkowane i stosowane są w wielu krajach także obecnie i jest to właściwie jedyny przykład tak szerokiego wykorzystywania preparatów mikrobiologicznych w praktyce rolniczej. Sukces ten związany jest m.in. z tym, że szczepionki z bakteriami symbiotycznymi (rizobiami) stosowane są najczęściej do otoczkowania nimi nasion roślin bobowatych. Taki sposób aplikacji ułatwia wprowadzenie dużej liczebności bakterii ( $10^3$ – $10^6$  komórek na każde nasionko) bezpośrednio do strefy korzeniowej siewek roślin, zwiększając w efekcie szanse (konkurencyjność) bakterii szczepionkowych na zawiązanie efektywnej symbiozy (brodawek) z korzeniami roślin. Wprowadzanie biopreparatów mikrobiologicznych do całej masy gleby na polu nie daje najczęściej żadnych efektów. Próby takie prowadzono z wieloma grupami drobnoustrojów glebowych, m.in. z bakteriami fosforolitycznymi, wolno żyjącymi w glebie asymilatorami N<sub>2</sub> (*Azotobacter* spp.) i innymi [3, 5, 28, 39, 52]. Niska skuteczność szczepionek doglebowych związana jest, jak już wspomniano w rozdziale 2, ze skomplikowanymi interakcjami pomiędzy organizmami glebowymi, oraz

z oddziaływaniem bardzo zmiennych warunków pogodowych i abiotycznych właściwości gleb. Na przykład, bakterie należące do rodzaju *Azotobacter* charakteryzują się dużą wrażliwością na kwaśny odczyn gleby. Bakterie te nie występują zwykle, lub ich liczebności są bardzo niskie w glebach o pH poniżej 6,0 [28, 31]. Szczepienie gleb kwaśnych nawet dużą masą preparatów zawierających omawiane bakterie nie może dać jakichkolwiek efektów, ponieważ nie zasiedlą one tych gleb, a staną się jedynie pożywieniem dla innych organizmów glebowych. Także szczepienie azotobakterem gleb o odczynie sprzyjającym rozwojowi tych bakterii nie daje w warunkach produkcyjnych istotnych efektów pozytywnych, np. w postaci przyrostu w glebach zawartości azotu czy plonów roślin, m.in. dlatego, że proces wiązania N<sub>2</sub> wymaga dużych ilości energii, której w glebie na ogół brakuje, a jeśli jest to toczy się o nią intensywna konkurencja [3, 20, 28, 31, 35]. Ponadto, należy pamiętać, że każda gleba w warunkach naturalnych zasiedlona jest przez mikroorganizmy, które w toku wielowiekowego procesu glebotwórczego najlepiej przystosowały się do życia w danej glebie i skolonizowały w niej wszystkie dostępne i umożliwiające egzystencję „nisze” ekologiczne [9, 35, 51]. Drobnoustroje wprowadzane do gleby w postaci szczepionek są zwykle eliminowane lub ich liczebność zredukowana jest do poziomu naturalnego. Trudności w uzyskaniu istotnych efektów ze stosowania biopreparatów doglebowych wynikają także z prostych proporcji ilościowych. Na przykład, w jednym gramie gleby można znaleźć od kilkudziesięciu milionów do miliarda komórek bakteryjnych, a w nawozach naturalnych (gnojowica, obornik) ich liczebność przekracza nawet 10<sup>11</sup> komórek w 1 gramie [30, 37, 51]. W przeliczeniu na hektar biomasa mikroorganizmów waha się od kilku do kilkunastu ton. Aby mikroorganizmy wprowadzane do gleby w biopreparacie mogły rozwijać się i konkurować z tak ogromną biomasa drobnoustrojów glebowych, należałoby stosować bardzo duże, nieopłacalne w praktyce, ilości biopreparatów oraz zmienić środowisko glebowe tak, aby faworyzowało ono rozwój wprowadzanego organizmu. Oznaczając liczebność mikroorganizmów w jednym z ww. biopreparatów stwierdziliśmy (dane nieopublikowane), że w zalecanej dawce (1 l) na hektar zawiera on mniej bakterii niż można znaleźć w 100 gramach gleby. Odpowiedź na pytanie, czy tak niewielka zawartość drobnoustrojów w tym preparacie, w dodatku nieprzystosowanych do życia w środowisku glebowym, może w jakikolwiek sposób wpłynąć na właściwości gleby i plonowanie roślin – wydaje się oczywista.

#### 4. Podsumowanie

W pracy omówiono ogólne zasady produkcji i oceny preparatów (szczepionek) mikrobiologicznych stosowanych w ochronie roślin do ograniczania roz-

woju patogenów i szkodników (biologiczna ochrona), zwłaszcza w rolnictwie integrowanym i ekologicznym, oraz do stymulowania wzrostu i plonowania roślin. Proces rejestracyjny biologicznych środków ochrony, który jest dla wielu producentów tych środków zbyt kosztowny i restrykcyjny, to jednak należy pamiętać, że zapewnia on nie tylko bezpieczeństwo ich stosowania (dla ludzi i środowiska), ale także powoduje, że b.s.o. są produktami rzetelnymi pod względem ich jakości i zastosowania. W odniesieniu do preparatów mikrobiologicznych, a także innych produktów określanych jako środki poprawiające właściwości gleby, przeznaczonych do stosowania w ekologicznej produkcji roślinnej, procedura rejestracyjna jest bardzo łagodna. Wykorzystują to niektórzy producenci i dystrybutorzy różnych biopreparatów wprowadzając na rynek w naszym kraju produkty, których skuteczność i jakość z mikrobiologicznego punktu widzenia są bardzo wątpliwe. Bardziej krytyczna ocena wyników badań nad tymi preparatami przyczyniłaby się do upowszechniania wśród ich potencjalnych użytkowników rzeczywistej wartości tego rodzaju produktów.

## Piśmiennictwo

- Alabouvette C.: Biological control of plant disease. (w) Biological Resource Management, red. E. Balazs, E. Galante, J.M. Lynch, J.S. Schepers, D. Werner, J-P. Toutant, P.A. Werry, Springer, Germany, 2000, s. 257–264
- Al-Taweil H.I., Bin Osman M., Hamid A.A., Yusoff W.M.: Development of microbial inoculants and the impact of soil application on rice seedlings growth. *Am. J. Agric. Biol. Sc.* **4**, 79–82 (2009)
- Banerjee M.R., Yesmin L., Vessey J.K.: Plant growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers and pesticides (w) Handbook of Microbial Biofertilizers red. M.K. Rai, The Haworth Press Inc., New York, 2006, s. 137–182
- Barea J.M.: Rhizosphere and mycorrhiza of field crops. (w) Biological Resource Management, red. E. Balazs, E. Galante, J.M. Lynch, J.S. Schepers, D. Werner, J-P. Toutant, P.A. Werry, Springer, Germany, 2000, s. 81–92
- Bashan Y.: Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.* **16**, 729–770 (1998)
- Bethlenfalvay G.J.: Mycorrhizae in the agricultural plant-soil system. *Symbiosis*, **14**, 413–425 (1993)
- Burd G.I., Dixon D.G., Glick B.R.: A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3663–3668 (1998)
- Compant S., Duffy B., Nowak J., Clement Ch., Barka A.: Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 4951–4959 (2005)
- Condor A.F., Perez P.G., Lokare Ch.: Effective Microorganisms: Myth or reality *Rev. Peru. Biol.*, 315–320 (2006) <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVrevistas/biologia/14n2/pdf>
- Cook R.J.: Assuring the safe use of microbial biocontrol agents: a need for policy based on real rather than perceived risk. *Can. J. Pl. Pathol.* **18**, 439–445 (1996)
- Czaban J., Księżniak A., Paszkowski W.: An attempt to protect winter wheat against *Fusarium culmorum* by the use of rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus mycoides*. *Pol. J. Microbiol.* **53**, 175–182 (2004)
- Czaban J., Wróblewska B.: Microbial transformation of cadmium in two soils differing in organic matter content and texture. *Pol. J. Environ. Stud.* **14**, 727–737 (2005)
- Dach J., Wolna-Murawka A., Zbytek Z.: Wpływ dodatku efektywnych mikroorganizmów (EM) na przebieg procesu kompostowania i wielkość emisji gazowych. *J. Res. Appl. Agrict. Eng.* **54**, 49–54 (2009)
- Dahm H., Wróblewska B., Pauter A.: Microbial biofertilizers. (w) Physical, chemical and biological processes in soils, red. L.W. Szajdak, A.K. Karabanow, Prodruck, Poznań, 2010, s. 537–547
- Fałtyń U., Miszkiewicz T.: Wpływ efektywnych mikroorganizmów (EM<sup>®</sup>) na zdolność kiełkowania ziarna pszenicy jarej. *Zesz. Nauk. Univ. Przyrod. Wrocław, Rolnictwo*, **568**, 31–35 (2008)
- Higa T.: Rewolucja w ochronie naszej planety. Fundacja – Rozwój SGGW, Warszawa, 2003, s. 1–152
- Kabaluk T., Gazdik K.: Directory of Microbial Pesticides for Agricultural Crops in OECD Countries. Agriculture and Agri-Food, Canada 2005, s. 242. [http://dsp-psd.pwgsc.gc.ca/collection\\_2009/agr/A42-107-2007E.pdf](http://dsp-psd.pwgsc.gc.ca/collection_2009/agr/A42-107-2007E.pdf)
- Kandele E., Murer E.: Aggregate stability and soil microbial processes in a soil with different cultivation. *Geoderma*, **56**, 503–513 (1993)
- Kloepper J.W., Schroth M.N., Miller T.P.: Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology*, **70**, 1078–1082 (1980)
- Kobus J., Czaban J., Gajda A., Masiak D., Księżniak A.: Wheat rhizosphere microflora and its effect on plant nutrition and some pathogenic fungi. Part I. Changes of rhizobacterial populations with development of winter wheat. *Rocz. Glebozn.* **44**, 45–53 (1993)
- Kohl J., Fokkema N.: Strategies for biological control of necrotrophic fungal foliar pathogens. (w) Plant-microbe interactions and biological control, red. G.J. Boland, L.D. Kuykendall, Marcel Dekker, Inc. New York, 1998, s. 49–88
- Kucharski J., Jastrzębska E.: Rola efektywnych mikroorganizmów w kształtowaniu właściwości mikrobiologicznych gleby. *Inżynieria Ekologiczna*, **12**, 295–296 (2005)
- Kurek E., Kobus J.: Korzystne i szkodliwe oddziaływanie mikroflory ryzosferowej na wzrost roślin. *Post. Mikrobiol.* **29**, 103–123 (1990)
- Kuś J., Jończyk K.: Rozwój rolnictwa ekologicznego w Polsce. *J. Res. Applic. Agricul. Eng.* **54**, 178–182 (2009)
- Lipa J., Pruszyński S.: Stan wykorzystania metod biologicznych w ochronie roślin w Polsce i na świecie. *Prog. Pl. Prot./Post. Ochr. Roślin*, **50**, 1033–1043 (2010)
- Lupwayi N.Z., Olsen P.E., Sande E.S., Keyser H.H., Collins M.M., Singleton P.W., Rice W.A.: Inoculant quality and its evaluation. *Field Crops Res.* **65**, 259–270 (2000)
- Lynch J.M.: Resilience of the rhizosphere to anthropogenic disturbance. *Biodegradation*, **13**, 21–27 (2002)
- Maliszewska W.: Szczepienie roślin azotobakterem. *Rocz. Nauk Roln.* **68**, 3–51 (1953)
- Mańka M.: Stan i perspektywy biologicznej ochrony drzew przed chorobami w leśnictwie. *Prog. Pl. Prot./Post. Ochr. Roślin*, **50**, 1089–1094 (2010)
- Martyniuk S., Myśków W.: Development of some groups of microorganisms in liquid cattle manure and farmyard manure during their fermentation. *Acta Microbiol. Polon.* **26**, 213–220 (1977)

31. Martyniuk S.: Systemy biologicznego wiązania azotu. *Nawozy i Nawożenie/Fertilizers and Fertilization*, **1**, 264–277 (2002)
32. Martyniuk S., Oroń J., Martyniuk M.: Diversity and numbers of root-nodule bacteria (rhizobia) in Polish soils. *Acta. Soc. Bot. Polon.* **74**, 83–86 (2005)
33. Martyniuk S.: Wytwarzanie preparatów mikrobiologicznych na przykładzie bakterii symbiotycznych roślin motylkowatych. *J. Res. Appl. Agrict. Eng.* **55**, 20–23 (2009)
34. Mayer J., Scheid S., Oberholzer H.-R.: How effective are “Effective microorganisms”? Results from an organic farming field experiment. (w) 16<sup>th</sup> JFOAM Organic World Congress, Modena, Italy, 2008, s. 40–43. <http://orgprints.org/14838>
35. Nannipieri P., Falchini L., Landi L., Pietramellara G.: Management of soil microbiota (w) Biological Resource Management, red. E. Balazs, E. Galante, J.M. Lynch, J.S. Schepers, D. Werner, J-P. Toutant, P.A. Werry, Springer, Germany, 2000, s. 237–255
36. Okorski A., Majchrzak B.: Grzyby zasiedlające nasiona grochu siewnego po zastosowaniu preparatu mikrobiologicznego EM 1. *Prog. Pl. Prot./Post. Ochr. Roślin*, **48**, 1315–1318 (2008)
37. Panhurst C.E., Rogers S.L., Gupta V.S.R.: Microbial parameters for monitoring soil pollution. (w) Environmental Biomonitoring, red. J.M. Lynch, A. Wiseman, Cambridge Univ. Press, UK, 1998, s. 46–69
38. Piskier T.: Reakcja pszenicy jarej na stosowanie biostymulatorów i absorbentów glebowych. *J. Res. Appl. Agrict. Eng.* **51**, 136–138 (2006)
39. Rodriguez H., Fraga R.: Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotech. Adv.* **17**, 319–339 (1999)
40. Smith R.S.: Legume inoculant formulation and application. *Can. J. Microbiol.* **38**, 485–492 (1992)
41. Sobiczewski P.: Bakterie wykorzystywane w produkcji roślinnej. (w) Biotechnologia roślin, red. S. Malepszy, PWN Warszawa, 2009, s. 172–213
42. Strzelec A.: Symbiotyczne wiązanie azotu. Cz. I. Znaczenie bakterii symbiotycznych, ich występowanie w glebach i szczepionki *Rhizobium* dla roślin motylkowatych. *Post. Nauk Roln.* **4**, 17–30 (1988)
43. Stephens J.H.G., Rask H.M.: Inoculant production and formulation. *Field Crop Res.* **65**, 249–258 (2000)
44. Sulewska H., Ptasińska G.: Reakcja kukurydzy uprawianej na ziarno na stosowanie preparatów mikrobiologicznych. *Pam. Puł.* **140**, 271–285 (2005)
45. Tomalak M.: Rejestracja biologicznych środków ochrony roślin w Europie – nowe perspektywy. *Prog. Pl. Prot./Post. Ochr. Roślin*, **47**, 233–240 (2007)
46. Tomalak M.: Rynek biologicznych środków ochrony roślin i przepisy legislacyjne. *Prog. Pl. Prot./Post. Ochr. Roślin*, **50**, 1053–1063 (2010)
47. Tomalak M., Sosnowska D., Lipa J.J.: Tendencje rozwoju metod biologicznych w ochronie roślin. *Prog. Pl. Prot./Post. Ochr. Roślin*, **50**, 1650–1660 (2010)
48. Tompson J.A.: Legume inoculant production and control. (w) Report on expert consultation on legume inoculants production and control, FAO, Rome, Italy, 1991 s. 15–32
49. Tyburski J., Łachacz A.: Efektywność środków ulepszających gleby ciężkie w gospodarstwach ekologicznych. Sprawozdanie z badań podstawowych na rzecz rolnictwa ekologicznego w zakresie upraw polowych metodami ekologicznymi, 2009. <http://www.uwm.edu.pl/wksir/systemy/raporty>
50. Van Elsas J.D., Garbeva P., Salles J.: Effects of agronomical measures on the microbial diversity of soils as related to the suppression of soil-borne plant pathogens. *Biodegradation*, **13**, 29–40 (2002)
51. Van Vliet P.C.J., Bloem J., de Goede R.G.M.: Microbial diversity, nitrogen loss and grass production after addition of Effective Microorganisms (EM) to slurry manure. *Appl. Soil Ecol.* **32**, 188–198 (2006)
52. Vessey J.K.: Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, **255**, 571–586 (2003)
53. Wielgosz E., Dziamba Sz., Dziamba J.: Effect of application of EM spraying on the populations and activity of soil microorganisms occurring in the root zone of spring barley. *Pol. J. Soil Sci.* **43**, 65–72 (2010)
54. <http://www.emy.com.pl/mikroorganizmy>
55. <http://www.emgreen.pl>

## SPIS TREŚCI

Prof. dr hab. Zdzisław Ilczuk (1929–2011) .....	263
R. K. Górecki, J. K. Bardowski – Molekularne mechanizmy oporności bakterii kwasu mlekowego na bakteriofagi .....	265
E. Furmańczyk, M. Włodarczyk – Struktura genomu <i>Borrelia burgdorferi</i> ; informacja genetyczna zawarta w poszczególnych replikonach składowych .....	275
P. Celejewski-Marciniak, S. Tyski – Pałeczki z rodzaju <i>Serratia</i> : charakterystyka gatunków, chorobotwórczość oraz oporność na antybiotyki <i>Serratia marcescens</i> .....	291
E. Konecka, A. Kaznowski, J. Baranek – Wykorzystanie bakterii <i>Bacillus thuringiensis</i> do produkcji bioinsektycydów .....	303
M. Krupiński, J. Długosiński – Biodegradacja nonylofenoli przez wybrane drobnoustroje .....	313
S. Martyniuk – Skuteczne i nieskuteczne preparaty mikrobiologiczne stosowane w ochronie i uprawie roślin oraz rzetelne i nierzetelne metody ich oceny .....	321

## CONTENTS

Prof. dr hab. Zdzisław Ilczuk (1929–2011) .....	263
R. K. Górecki, J. K. Bardowski – Molecular mechanisms of bacteriophage resistance of lactic acid bacteria .....	265
E. Furmańczyk, M. Włodarczyk – Genome structure of <i>Borrelia burgdorferi</i> ; genetic information in individual replicons .....	275
P. Celejewski-Marciniak, S. Tyski – Bacilli of the genus <i>Serratia</i> : species characteristics, pathogenicity and antibiotic resistance of <i>Serratia marcescens</i> .....	291
E. Konecka, A. Kaznowski, J. Baranek – The usage of <i>Bacillus thuringiensis</i> for bioinsecticide production .....	303
M. Krupiński, J. Długosiński – Biodegradation of nonylphenols by some microorganisms .....	313
S. Martyniuk – Effective and ineffective microbial preparations used in plant protection and production and methods of their evaluation .....	321

### **Od Redakcji**

Uprzejmie prosimy, aby PT Czytelnicy, którzy otrzymali niekompletny zeszyt 2 PM, tom 50 (brak stron 119–129) powiadomili o tym fakcie Redakcję. Błąd powstał na etapie ostatecznego składania zeszytu, za co przepraszamy.