

Kwartalnik

Tom 52

Zeszyt 4•2013

PAŹDZIERNIK – GRUDZIEŃ

CODEN:

PMKMAV 52 (4)

2013

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Postępy Mikrobiologii

Advances in Microbiology

Index Copernicus ICV = 9,52 (2012)

Impact Factor ISI = 0,151 (2012)

Punktacja MNiSW = 15,00 (2012)

<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

JACEK BIELECKI (redaktor naczelny), JERZY HREBENDA (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 04, fax (22) 554 14 04
e-mail: jbielecki@biol.uw.edu.pl; j.hrebenda@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:

Fonsecaea monophora – szczegóły morfologii (widoczny konidiofor i układ konidiów). SEM, pow. 4 000 x.
Autor zdjęcia: dr n. med. Tomasz Jagielski; Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii
Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
ul. I. Miecznikowa 1; 02-096 Warszawa; e-mail: t.jagielski@biol.uw.edu.pl.

Szanowni Państwo! Autorzy i Czytelnicy *Postępów Mikrobiologii*: Informujemy Państwa, że uległ zmianie
numer konta bankowego Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów.

Aktualny numer konta: BGŻ SA 57 2030 0045 1110 0000 0261 2550

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 15 arkuszy wyd., Papier offset 80 g

Skład i druk: Zakład Wydawniczy Letter Quality, tel. 22 115 38 10, 607 217 879
e-mail: roma.walendzewicz@gmail.com; projekt okładki: Jerzy Grzegorkiewicz

Dorota Lesiak¹, Agnieszka Brzozowska¹,
Krystyna Bienkowska-Szewczyk¹, Andrea D. Lipińska^{1*}

Zakład Biologii Molekularnej Wirusów, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk

Wpłynęło w maju 2013 r.

1. Wstęp. 2. US3 a uwalnianie kapsydów z jądra komórkowego. 3. Wpływ US3 na ekspresję genów. 4. Wpływ kinazy US3 na cytoszkielet komórki. 5. Rola kinazy US3 w blokowaniu apoptozy. 6. Właściwości immunomodulacyjne białka US3. 6.1. Oddziaływanie z systemami interferonów. 6.2. Wpływ na prezentację antygenów w kontekście cząsteczek MHC klasy I i inaktywacja limfocytów T cytotoksycznych. 6.3. Redukcja ekspresji antygenów wirusowych na powierzchni komórki. 6.4. Wpływ na aktywację limfocytów NKT. 7. Inne funkcje kinazy US3. 8. Podsumowanie

US3 – a multifunctional serine-threonine kinase of alphaherpesviruses

Abstract: Phosphorylation by protein kinases modulates the function of target proteins by interfering with their enzymatic activity, cellular location and/or association with other proteins. Viruses have evolved complex interactions with their hosts and often mimic cellular proteins in order to usurp the cellular machinery for their own benefit, so it is not surprising that vast number of viruses encode protein kinases. Alphaherpesvirus kinase US3 is a conserved multifunctional protein, regulating the egress of viral particles, but also responsible for alterations in cell morphology resulting from the breakdown of actin stress fibers and formation of cell projections. US3 homologs control the trafficking of viral and cellular proteins and inhibit apoptosis. The current review provides an overview of the properties and functions of alphaherpesvirus US3 protein kinase orthologues.

1. Introduction. 2. US3 and the virus egress from the cell nucleus. 3. Effect of US3 on gene expression. 4. Effect of US3 on cytoskeleton. 5. Role of US3 in the blocking of apoptosis. 6. Immunomodulatory properties of US3. 6.1. Interactions with the interferon systems. 6.2. Effect on the MHC class I-restricted antigen presentation and inactivation of cytotoxic T lymphocytes. 6.3. Reduction in the cell surface expression of viral antigens. 6.4. Effect on the activation of NKT lymphocytes. 7. Other functions of US3 kinase. 8. Summary

Słowa kluczowe: US3, herpeswirus, kinaza serynowo-treoninowa

Key words: US3, herpesvirus, serine-threonine kinase

1. Wstęp

Rodzina *Herpesviridae* obejmuje ponad dwieście gatunków wirusów o bardzo szerokim spektrum gospodarzy, głównie kręgowców. Według najnowszej systematyki herpeswirusów rodzina *Herpesviridae* współtworzy rząd *Herpesvirales* wraz z dwiema innymi rodzinami: *Alloherpesviridae*, która skupia wirusy zakażające ryby i płazy, oraz *Malacoherpesviridae*, skupiającą wirusy infekujące mięczaki [17]. Osiem spośród zidentyfikowanych dotychczas gatunków herpeswirusów stanowią wirusy patogenne dla ludzi. Herpeswirusy mają wiele cech wspólnych. Są to duże wirusy posiadające osłonkę, tegument i ikozaedralny kapsyd, a ich materiał genetyczny występuje w formie dwuniciowego DNA o wielkości 125–290 tysięcy par zasad [79]. Na podstawie istniejących różnic w tropizmie, składzie i organizacji genomu rodzina *Herpesviridae* została podzielona na trzy podrodziny: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* i *Gammaherpesvirinae* [17].

Największą podrodziną herpeswirusów są alfa herpeswirusy. Tak jak inne wirusy z tej rodziny, są one zdolne do przechodzenia w stan latencji, czyli infekcji utajonej w organizmie swojego naturalnego gospodarza. Reaktywacja ze stanu latencji pod wpływem specyficznego czynnika, często związanego ze stresem oraz/lub osłabieniem systemu odpornościowego, może doprowadzić do nawrotu objawów chorobowych [3]. Zidentyfikowano trzy alfa herpeswirusy ludzkie: ludzki herpeswirus 1 (HHV-1; nazwa zwyczajowa: wirus opryszczki typu 1, herpes simplex virus type 1, HSV-1), ludzki herpeswirus 2 (HHV-2; nazwa zwyczajowa: wirus opryszczki typu 2, herpes simplex virus type 2, HSV-2) oraz ludzki herpeswirus 3 (HHV-3; nazwa zwyczajowa: wirus ospy wietrznej i półpaśca, varicella zoster virus, VZV) [17]. Wirusy HSV-1 i HSV-2 są kojarzone głównie z opryszczką wargową i narządów płciowych, ale czasem mogą również prowadzić do powikłań, w tym zapalenia mózgu, zapalenia rogówki i ślepoty. Wirus VZV jest czynnikiem wywołującym ospę wietrzną,

* Autor korespondencyjny: Zakład Biologii Molekularnej Wirusów, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk; tel. (58) 5236382; e-mail: andrea@biotech.ug.gda.pl

Tabela I

Ogólne cechy budowy ortologów kinazy US3 alfa herpeswirusów
[na podstawie sekwencji białek z bazy NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>].

Cecha Wirus	Numer referencyjny NCBI	Liczba reszt aminokwasowych	Pozycja domeny katalitycznej w sekwencji aa	Liczba izoform, w których występuje białko
HSV-1	NP_044665.1	481	200–374	2
HSV-2	NP_044533.1	481	200–398	1
PRV	YP_068384.2	390	59–233	2
VZV	NP_040188.1	393	102–275	1
BHV-1	NP_045368.1	468	165–463	1
BHV-5	YP_003662531.1	444	153–325	1
MDV	YP_001034009.1	402	108–318	1

a podczas reaktywacji ze stanu latencji może powodować półpaśca. Do podrodziny alfa herpeswirusów należy również kilka patogenów o znaczeniu weterynaryjnym, bardzo ważnych z ekonomicznego punktu widzenia. Wirus pseudowścieklizny (pseudorabies virus, PRV) jest czynnikiem zakaźnym wywołującym u świń chorobę Aujeszkego. Bydłęcy herpeswirus typu 1 (bovine herpesvirus type 1, BHV-1) powoduje zakaźne zapalenie nosa i tchawicy lub narządów płciowych u bydła, a także może być przyczyną poronień. Koński herpeswirus typu 1 (equine herpesvirus type 1, EHV-1) może powodować u zakażonych zwierząt choroby układu oddechowego, paraliż i poronienia. Wirus choroby Mareka (Marek's disease virus, MDV) powoduje śmiertelne infekcje u drobiu i, co jest dość nietypowe dla alfa herpeswirusów, należy do wirusów onkogennych [65].

Białka herpeswirusów mogą ulegać różnorodnym modyfikacjom ko- i posttranslacyjnym, takim jak glikozylacja, acylacja, sumoilacja, jednak najczęstszą spotykaną modyfikacją jest fosforylacja. Procesy fosforylacji-defosforylacji kontrolują prawie wszystkie aspekty funkcjonowania komórki: odgrywają kluczową rolę w kaskadach przekazywania sygnału oraz regulują wiele procesów komórkowych, m.in. wzrost, proliferację, różnicowanie, ekspresję genów, zmiany morfologii, czy apoptozę. Na poziomie molekularnym fosforylacja może zmieniać aktywność enzymatyczną modyfikowanego białka oraz jego strukturę przestrzenną, może również wpływać na transport białka do konkretnego kompartmentu komórkowego lub regulować oddziaływanie z partnerami białkowymi i niebiałkowymi [14]. Proces fosforylacji katalizowany jest przez enzymy zwane kinazami. Nieprawidłowe funkcjonowanie kinaz może prowadzić do powstawania chorób immunologicznych, nowotworów, zaburzeń metabolicznych i innych schorzeń.

Genomy herpeswirusów kodują jedną kinazę białkową konserwowaną w obrębie całej rodziny, jej ortologi noszą nazwy: UL13 u alfa herpeswirusów, UL97 u beta herpeswirusa – ludzkiego cytomegalowirusa (human

cytomegalovirus, HCMV), BGLF4 u należącego do gamma herpeswirusów wirusa Epsteina-Barr (EBV). Oprócz tej kinazy w poszczególnych podrodzinach *Herpesviridae* występują inne enzymy wirusowe o aktywności kinazowej. W latach osiemdziesiątych XX wieku w genomach różnych alfa herpeswirusów zidentyfikowano gen kodujący białko o sekwencji homologicznej do kinaz białkowych organizmów eukariotycznych i retrowirusów [59]. Homologi te w istocie okazały się posiadać aktywność kinazy serynowo-treoninowej, silnie konserwowaną w obrębie podrodziny *Alphaherpesvirinae* [31]. U większości alfa herpeswirusów ortologi tego białka noszą nazwę US3, która odnosi się do pozycji kodującego go genu w rejonie unikalnym krótkim (unique short, Us) genomu wirusa HSV-1. Wyjątek stanowi wirus VZV, u którego białko to określa się jako ORF66. Co ciekawe, nie zaobserwowano istnienia homologów kinazy US3 w genomach podrodzin *Beta-* i *Gammaherpesvirinae*. W genomie betaherpeswirusów występuje białko o nazwie US3, jednak jest to białko błonowe, nie wykazujące homologii do kinazy alfa herpeswirusów i posiadające inne właściwości [41].

Geny kodujące białko US3 u wirusów HSV-1 i PRV posiadają dwa miejsca startu transkrypcji, co za tym idzie, białko US3 występuje u nich w postaci dwóch izoform, określanymi jako US3/US3.5 u HSV-1 i US3a/US3b u PRV (Tabela I) [11, 71]. Obie postaci białka US3 posiadają aktywność kinazową, ale wydają się różnić swoim udziałem w niektórych procesach komórkowych i cyklu życiowym wirusów [69]. U HSV-1 dominuje dłuższa forma kinazy, natomiast u wirusa PRV US3a stanowi jedynie 5% białka, a obie izoformy różnią się lokalizacją wewnątrzkomórkową [11].

Ortologi kinazy US3 posiadają domenę kinazową o długości 280–300 reszt aminokwasowych (Tabela I), o architekturze charakterystycznej dla eukariotycznych kinaz białkowych. Domena ta, w której występują charakterystyczne, silnie konserwowane reszty aminokwasowe, zbudowana jest z dwunastu mniejszych subdomen zawierających miejsce wiązania ATP oraz miejsce

aktywne katalitycznie. W wiązaniu ATP kluczową rolę pełni konserwowana reszta lizyny w subdomenie II, natomiast konserwowana reszta kwasu asparaginowego znajdująca się w subdomenie VIB jest krytyczna dla aktywności katalitycznej [34]. Podobieństwo sekwencji aminokwasowej domen kinazowych wśród ortologów US3 jest znacznie wyższe niż w przypadku pełnej sekwencji białka US3 [19].

Mutacje wyżej wspomnianych konserwowanych reszt aminokwasowych powodują zniesienie aktywności kinazowej białka. Dla aktywności kinazy US3 BHV-1 kluczowe są dwie reszty lizyny, K282 w miejscu aktywności katalitycznej [10, 52] oraz K195 w obrębie pętli wiążącej ATP [52]. Dla BHV-5 istotna jest reszta lizyny 261 [53], dla HSV-1 reszta lizyny K220 [46, 80], a dla HSV-2 również reszta lizyny K220 [60] oraz reszta kwasu asparaginowego D305 [30]. U MDV, podobnie jak u wirusów HSV-1 i HSV-2, ważna katalitycznie jest reszta lizyny K220 [82], a dla PRV lizyna K136 i reszta kwasu asparaginowego D223 [95]. Poznanie tych reszt pozwoliło na skonstruowanie mutantów kinazowo-nieczynnych (*kinase-dead*), u których poprzez wprowadzenie mutacji punktowych w miejscach kodujących wymienione reszty aminokwasowe białko traci swoje właściwości kinazowe.

Opisano minimalną sekwencję konsensusową, która powinna znajdować się w obrębie substratu kinazy US3 i przedstawia się ją jako: $(R)_n-X-(S/T)-Z-Z$, gdzie $n \geq 2$, „S/T” oznacza fosforylowaną resztę seryny lub treoniny, X może być resztą dowolnego aminokwasu, choć preferencyjnie to reszta argininy, alaniny, waliny, proliny lub seryny (aminokwas ten może być w ogóle nieobecny), a Z może być resztą dowolnego aminokwasu oprócz proliny i reszty aminokwasów kwaśnych. W sekwencji optymalnej aminokwas X musi być obecny, a liczba $n \geq 3$. Rozpoznawana sekwencja docelowa jest bardzo podobna dla wirusów PRV, HSV-1, HSV-2 i VZV, a także komórkowej kinazy białkowej A (PKA) [19].

Białko US3, choć nie jest niezbędne do replikacji wirusa w hodowlach komórkowych *in vitro* [72, 88], pełni bardzo istotne funkcje w wirusowym cyklu życiowym, między innymi właśnie poprzez fosforylację specyficznych substratów wirusowych i komórkowych. Wykazano istnienie wielu możliwych substratów fosforylacji przez US3, jednak tylko dla kilku z nich pokazano istotne znaczenie biologiczne tej modyfikacji. Białko US3 wirusa HSV-1 zdolne jest do bezpośredniej fosforylacji komórkowego białka Bad [12, 46], laminy A/C i emeryny [61, 62], a także wirusowych białek ICP22 [46, 73] i gB [37, 94]. Wirusowe białka UL31 i UL34 są fosforylowane przez kinazę US3 HSV-1 i PRV [46, 49, 63, 74], a białko UL47 jest fosforylowane przez US3 HSV-1 [44] oraz BHV-1 [51]. Ponadto dla US3 wirusa PRV pokazano, że kinaza ta fosforyluje grupę A kinaz aktywowanych przez białko p21 (*group A p21-activated*

kinases, PAKs) [96]. Potwierdzonym substratem US3 wirusa VZV jest białko wirusowe IE62, będące głównym białkiem regulującym transkrypcję i głównym składnikiem tegumentu VZV [22].

Aktywność katalityczna US3 jest regulowana na drodze fosforylacji przez inne kinazy lub przez autofosforylację. Miejscem autofosforylacji US3 wirusa HSV-1 jest reszta seryny w pozycji 147. Pokazano, że mutacja S147A (substytucja reszty seryny w pozycji 147 peptydu US3 HSV-1 przez resztę alaniny) wpływa na lokalizację US3 w zainfekowanej komórce oraz na jego funkcjonalność [45]. W sekwencji US3 wirusa HSV-2 reszcie seryny 147 odpowiada reszta kwasu asparaginowego, która również ma istotne znaczenie dla aktywności kinazowej białka [60]. Autofosforylację zaobserwowano jeszcze dla US3 wirusa BHV-1, jednak miejsce autofosforylacji nie zostało zdefiniowane [52, 88]. US3 HSV-1 jest substratem dla innej kinazy wirusowej – UL13 [47].

Kinaza US3 fosforyluje wiele białek, zarówno komórkowych jak i wirusowych, o różnej lokalizacji w komórce, co sugeruje, że wewnątrzkomórkowa lokalizacja kinazy musi determinować jej właściwości. Udało się pokazać, że podczas infekcji HSV-1 białko US3 krąży między jądrem a cytoplazmą [62, 78, 96]. Również US3 HSV-2 może docierać do swych substratów znajdujących się zarówno w jądrze, jak i w cytoplazmie, dzięki swoistemu transportowi jądrowo-cytoplazmatycznemu (*nuclear shuttling*). Obecny model tego transportu zakłada, że import US3 wirusa HSV-2 do jądra zachodzi przez wewnętrzne niekanoniczne sygnały lokalizacji jądrowej (*nuclear localization signal, NLS*) lub przez interakcję z białkiem komórkowym niosącym NLS. Natomiast w eksporcie US3 z jądra pośredniczą bogate w reszty leucyny sygnały NES (*nuclear export signal*), które mogą znajdować się w sekwencji aminokwasowej w obrębie reszt 242–259 [30]. W sekwencjach innych ortologów US3 zlokalizowano obecność potencjalnych regionów NES i choć ich sekwencja aminokwasowa jest zmienna, hydrofobowe reszty aminokwasowe znajdujące się na początku pierwszego potencjalnego sygnału i na końcu drugiego potencjalnego NES są wysoce konserwowane [30, 53].

W przypadku US3 HSV-2 pokazano, że zatrzymanie białka w jądrze ogranicza proces tworzenia wypustek komórkowych [29, 30]. Świadczy to o tym, jak ważna dla pełnionych przez US3 funkcji jest jego lokalizacja i możliwość poruszania się pomiędzy jądrem a cytoplazmą komórki.

Jak wcześniej wspomniano, gen US3 wirusa PRV koduje dwa białka: formę długą US3a oraz formę krótką US3b. Zasadniczą różnicą między tymi formami białka jest obecność fragmentu o długości 54 reszt aminokwasowych na N-końcu US3a. Choć obie formy US3 PRV posiadają zarówno sygnał lokalizacji jądrowej (NLS), jak i błonowej, to w komórkach transfekowanych forma

długa lokalizuje się głównie w błonie komórkowej/pęcherzykach wewnątrzkomórkowych a forma krótka w jądrze. Wykazano, że ów fragment dodatkowych 54 reszt aminokwasowych US3a zawiera dodatkowy sygnał lokalizacji mitochondrialnej (*mitochondria targeting sequence*, MTS). Obecność MTS wpływa na lokalizację długiej formy białka, natomiast w jego nieobecności znaczenie dominujące wydaje się mieć NLS, dlatego US3b znajduje się przede wszystkim w jądrze komórkowym [11]. Lokalizacja obu form US3 ma znaczenie dla takich ich funkcji, jak blokowanie apoptozy czy formowanie wypustek komórkowych [11, 27].

US3 jest białkiem wielofunkcyjnym, wymaganym na wielu etapach infekcji wirusowej, m.in. w czasie wyjścia kapsydów z jądra komórkowego. Ponadto US3 jest zdolne do blokowania apoptozy, modulacji odpowiedzi immunologicznej gospodarza, a także indukowania zmian w cytoskieletu komórki. Niektóre funkcje są konserwowane w obrębie podrodziny *Alphaherpesvirinae*, podczas gdy inne zdają się być unikalne dla poszczególnych ortologów. Aktywność kinazowa US3 wydaje się być kluczowa dla większości funkcji tego białka.

2. US3 a uwalnianie kapsydów z jądra komórkowego i morfogeneza wirionów

Kinaza US3 pełni ważne funkcje na różnych etapach ścieżki uwalniania wirionów potomnych z jądra komórkowego do cytoplazmy. Zaobserwowano, że procesy te zachodzą w nieobecności US3 z obniżoną wydajnością. Podejrzewa się, że kinazy komórkowe rekompensują nieobecność US3 w stopniu wystarczającym do zajścia wymienionych procesów. Sam proces wyjścia wirionów alfa herpeswirusów z jądra jest kilkietapowy. Nukleokapsydy nabywają osłonkę pierwotną podczas tzw. wpączkowania do wewnętrznej błony jądrowej. Następnie zachodzi fuzja osłonki pierwotnej z zewnętrzną błoną jądrową, co prowadzi do uwolnienia wirionów potomnych do cytoplazmy. Aby tak się stało, kapsydy wirusowe muszą najpierw pokonać barierę, jaką stanowi jądrowa sieć lamin A/C i B ze związaną z nimi emeryną. Sieć ta jest zbyt gęsta, aby wiriony mogły swobodnie przez nią przenikać. Te kluczowe elementy jądrowej sieci lamin mogą być fosforylowane przez kinazę US3 wirusa HSV-1. Prowadzi to do zmiany ich lokalizacji i rozluźnienia tworzonej przez nie sieci, co pozwala nukleokapsydom dotrzeć do wewnętrznej błony jądrowej [54, 61, 62].

Podczas procesu wyjścia wirionów z jądra komórkowego ważną rolę odgrywają wirusowe białka UL31 i UL34. Białka te tworzą kompleks zaangażowany w kontakt wirionu z błoną jądrową poprzez jego wiązanie się z laminami A/C oraz B. Fosforylacja obu tych białek przez kinazę US3 HSV-1 i PRV jest niezbędna do właściwego rozmieszczenia kompleksu UL31/UL34

w błonie jądrowej [47, 49, 76]. Jądrowa lokalizacja kompleksu wydaje się być regulowana głównie przez fosforylację N-końca białka UL31 [63]. Pokazano, że ważną rolę w oddziaływaniu US3 na UL31/UL34 pełni fosforylacja US3 przez wirusową kinazę UL13. W przypadku wirusa PRV kinaza US3 nie fosforyluje UL34, a w przypadku VZV nie udowodniono żadnej roli ORF66 w wyjściu wirionów z jądra [81].

Białka UL31, UL34 i US3 są charakterystycznymi składnikami tzw. wirionów pierwotnych. US3 wirusów HSV-1, PRV i MDV, ale nie VZV, jest potrzebne również do utraty osłonki pierwotnej przez wiriony podczas ich fuzji z zewnętrzną błoną jądrową (tzw. zjawiska de-envelopment) – tu również bardzo ważna jest aktywność kinazowa US3. Pokazano, że skutkiem delekcji genu US3 tych wirusów są nieprawidłowości w postaci akumulacji niedojrzałych wirionów wirusowych w przestrzeni okołojądrowej [76, 80, 82, 83, 90], co sugeruje konserwowaną rolę US3 podczas wyjścia wirionów z jądra. Jednak ilość zewnątrzkomórkowych wirionów jest tylko częściowo zredukowana w nieobecności US3, więc ten defekt w eksporcie jądrowym nie jest całkowity.

Innymi białkami wirusowymi, ważnymi na etapach wyjścia wirusa z jądra komórki, są glikoproteiny gB i gH. U HSV-1 białka te prawdopodobnie są zaangażowane w fuzję pierwotnej osłonki wirusa znajdującego się w przestrzeni okołojądrowej z zewnętrzną błoną jądrową [25, 94]. W przypadku HSV-1 kinaza US3 fosforyluje domenę cytoplazmatyczną gB w miejscu Thr 887, co najpewniej inicjuje proces fuzji [25, 37, 94]. Ta funkcja US3 może nie być konserwowana wśród alfa herpeswirusów, ponieważ u wirusa PRV zarówno białko gB, jak i gH, nie są wykrywane w błonach jądrowych i raczej nie odgrywają one roli w czasie wyjścia wirionów z jądra [33, 48].

3. Wpływ US3 na ekspresję genów

Deacetylazy histonowe 1 i 2 (HDAC1 i HDAC2) odpowiadają za procesy deacetylacji reszt lizyny w ogonach histonów rdzeniowych, co skutkuje zablokowaniem rearanżacji struktur chromatynowych i zahamowaniem ekspresji genów. Inhibicja aktywności enzymatycznej deacetylaz skutkuje hiperacetylacją histonów i zmianą konformacji nukleosomu, co umożliwia wiązanie się transkrypcyjnych białek regulatorowych do matrycy DNA i wydajną transkrypcję [87]. Herpeswirusy posiadają zdolność modyfikowania tej drogi regulacji ekspresji genów. Dla ortologów białka US3 wirusów HSV-1, HSV-2, PRV oraz VZV odnotowano zdolność do hiperfosforylacji deacetylaz HDAC1 i HDAC2 [45, 60, 70, 92]. Ta właściwość kinazy US3 pozwala na zahamowanie deacetylacji histonów i wzmożoną ekspresję genów wirusowych. Jednak pomimo tej funkcjonalnej zgodności zaob-

serwowano również różnice pomiędzy ortologami US3. Badania *in vitro* pokazały, że US3 wirusa VZV fosforyluje HDAC1 i HDAC2 pośrednio. Prawdopodobnie to kinaza wirusowa aktywuje przez fosforylację kinazy komórkowe, które fosforylują deacetylazy [91]. W przypadku wirusa PRV hiperfosforylację HDAC2 obserwowano również podczas zakażenia komórek wirusem pozbawionym genu US3, odmiennie od obserwacji dla wirusów HSV-1 i VZV, gdzie białko US3 jest konieczne do zajęcia hiperfosforylacji deacetylaz histonowych. Wyniki te sugerują istnienie specyficznego dla PRV, US3-niezależnego mechanizmu hiperfosforylacji HDAC. Ponadto w przypadku mutantów PRV i VZV nieposiadających białka US3 zahamowanie aktywności białek HDAC skutkuje powstawaniem większej liczby łysinek wirusowych. Przeciwny efekt obserwujemy w przypadku zakażenia mutantem HSV-1 Δ US3. To podkreśla istnienie znaczących funkcjonalnych różnic w modyfikacji HDAC przez kinazę US3 różnych wirusów [91, 92].

Zbadano również wpływ US3 VZV na wirusowe białko IE62 – główne białko tegumentu i czynnik regulujący transkrypcję. Kinaza US3 bezpośrednio fosforyluje białko IE62, regulując wewnątrzkomórkową lokalizację tego białka. Fosforylowane IE62 akumuluje się w cytoplazmie, gdzie zostaje włączone do nowopowstałych wirionów. W ten sposób US3 zahamowuje import IE62 do jądra, wpływając na regulację kaskady ekspresji genów wirusowych [22, 24].

Wykazano, że kinaza US3 wirusa PRV wpływa na poziom ekspresji przynajmniej trzech genów kodujących białka wirusowe. W komórkach infekowanych „dzikim” typem wirusa PRV obecność US3 wpływa na zwiększenie poziomu głównego białka wiążącego DNA – UL29 oraz dużej podjednostki reduktazy rybonukleotydowej UL39, ale zmniejsza poziom UL42 – białka pomocniczego polimerazy DNA. Efektu tego nie obserwuje się w komórkach zakażonych mutantem pozbawionym genu US3. Dane te mogą wskazywać na rolę US3 w metabolizmie DNA wirusowego [85].

4. Wpływ kinazy US3 na cytoszkielet komórki

Jedną z najciekawszych właściwości kinazy US3 jest jej wpływ na cytoszkielet i morfologię komórki. Kinaza US3 wirusów BHV-1, BHV-5, HSV-2, MDV i PRV indukuje drastyczne zmiany w cytoszkiecie komórkowym, mające związek ze zwiększonym rozprzestrzenianiem się wirusa pomiędzy komórkami [10, 27, 30, 53, 82, 83, 98]. Podczas infekcji następuje rozpad aktynowych włókien naprężeniowych, komórka przyjmuje zaokrąglony kształt i formowane są wypustki zbudowane z aktyny i mikrotubul. W przypadku infekcji wirusem PRV pokazano, że obecność białka US3 jest kluczowa dla powstawania tych połączeń. Co więcej,

wirus wykorzystuje wytworzone połączenia do zakażenia sąsiednich komórek [27]. Obserwowane modyfikacje cytoszkieletu są konsekwencją oddziaływań US3 z białkami z rodziny GTPaz Rho, regulujących stopień polimeryzacji i depolimeryzacji aktyny oraz poziom fosforylacji miozyny. W pierwszym doniesieniu postawiono hipotezę, że US3 może wpływać na cytoszkielet aktynowy oddziałując na szlaki sygnałowe zależne od białka p21 (Cdc42/Rac1) [64]. W późniejszym czasie zidentyfikowano kinazy PAK1 i PAK2 (z grupy A kinaz aktywowanych przez białko p21, *group A p21-activated kinases*, PAKs), jako krytyczne efekторы szlaku sygnałowego Cdc42/Rac1 modyfikowane przez US3 [96]. Aktywacja kinaz PAK indukuje podobne rearanżacje aktyny, jakie obserwuje się przy ekspresji genu białka US3. US3 PRV fosforyluje i tym samym aktywuje zarówno PAK1, jak i PAK2. Fosforylacja PAK2 wpływa na zanik włókien naprężeniowych i zaokrąglanie komórek, podczas gdy bezpośrednia fosforylacja kinazy PAK1 przez US3 jest związana z tworzeniem wypustek komórkowych [96]. Efekt reorganizacji cytoszkieletu i tworzenia się wypustek komórkowych pod wpływem US3 jest analogiczny do uzyskiwanego w wyniku inhibicji kaskady sygnałowej GTPazy Rho przez specyficzne syntetyczne inhibitory, takie jak Y27632, w nieinfekowanych komórkach [38]. Z drugiej strony, stabilizacja F-aktyny przez jasplakinolid zapobiega tworzeniu się wypustek komórkowych w trakcie zakażenia PRV i hamuje rozprzestrzenianie się wirusa [27]. Ostatnie doniesienie dotyczące wpływu US3 wirusa PRV na cytoszkielet pokazuje, że białko to przyczynia się do defosforylacji, i tym samym aktywacji, kofiliny – niskocząsteczkowego białka będącego niezwykle ważnym regulatorem stabilności filamentów aktynowych. Obecność fosforylowanej kofiliny wiąże się z zahamowaniem zdolności US3 do pośredniczenia w formowaniu się wypustek i zaokrąglaniu komórki [39].

Aktywność kinazowa różnych ortologów US3 jest czynnikiem warunkującym zajście wyżej opisanych zmian w komórce. Wyjątek stanowi białko US3 wirusa MDV, którego zmutowana forma pozbawiona aktywności kinazowej nadal jest zdolna do indukowania zmian w cytoszkiecie komórki [82]. Natomiast w przypadku BHV-5 aktywność kinazowa jest potrzebna do zaindukowania tworzenia wypustek, ale nie jest konieczna, aby nastąpiła depolimeryzacja aktynowych włókien naprężeniowych [53].

5. Rola US3 w blokowaniu apoptozy

Apoptoza, czyli programowana śmierć komórkowa typu I, jest jednym z podstawowych procesów odpowiedzialnych za ograniczenie rozprzestrzeniania zakażeń wirusowych w organizmie. W odróżnieniu od innych procesów niszczenia komórek, apoptoza podlega ściślejszemu

kontroli i nie wywołuje odczynu zapalnego [100]. Podczas infekcji wirusowej może dojść do apoptotycznej śmierci komórek na drodze bezpośredniej odpowiedzi na infekcję bądź też po rozpoznaniu zakażonych komórek przez limfocyty T cytotoksyczne lub komórki NK. Nie dziwi zatem fakt, że w celu obrony przed odpowiedzią antywirusową komórki, wirusy wykształciły mechanizmy blokowania procesu apoptozy.

Właściwości antyapoptotyczne zostały potwierdzone dla ortologów kinazy US3 wirusów HSV-1, HSV-2, PRV i MDV [2, 32, 35, 40, 56, 66, 82]. Kinaza US3 wpływa na proces apoptozy na wielu etapach. Najczęściej US3 fosforyluje białka proapoptotyczne obecne w komórce gospodarza, blokując ich aktywność i tym samym zapobiegając śmierci komórki. US3 HSV-1 fosforyluje prokaspazę 3, która jest głównym egzekutorem apoptozy, co skutkuje zablokowaniem jej cięcia proteolitycznego do formy aktywnej [6, 66]. Wykazano również, że US3 fosforyluje białka proapoptotyczne należące do rodziny Bcl-2: Bad i Bid [6, 13].

Kinaza US3 HSV-1 wpływa również na drogę apoptozy związaną z granzymem B. Granzym B jest proteazą serynową syntetyzowaną głównie przez limfocyty cytotoksyczne i komórki NK. Proteaza ta może indukować śmierć komórki zainfekowanej wirusem poprzez aktywację kaspazy 3 lub angażowanie białek proapoptotycznych z rodziny Bcl-2: Bid i Bax [89]. Na skutek cięcia proteolitycznego białka Bid przez granzym B powstaje skrócona forma tego białka, tzw. fragment tBid (*truncated Bid*, 14 kDa). tBid wnika do mitochondriów i rekrutuje białko Bax, co prowadzi do zmian konformacyjnych w białku Bax, wskutek których dochodzi do depolaryzacji błony mitochondrialnej i uwolnienie cytochromu c. Prowadzi to do dalszej aktywacji kaspaz i śmierci komórki [36]. US3 wirusa HSV-1 fosforyluje białko Bid, chroniąc je przed proteolityczną aktywacją przez granzym B. Zapobiega to lizie zakażonych komórek przez limfocyty cytotoksyczne [13]. Ponadto pokazano, że US3 HSV-1 chroni zakażone komórki przed apoptozą indukowaną UV oraz częściowo przed apoptozą indukowaną przez ligand Fas [40].

Jak wcześniej wspomniano, sekwencja aminokwasowa kinazy US3 jest wysoce podobna do sekwencji cAMP-zależnej komórkowej kinazy białkowej A (PKA) [55], enzymu bardzo istotnego dla regulowania metabolizmu komórki. Benetti i Roizman pokazali, że w komórkach zakażonych wirusem HSV-1 kinaza US3 może fosforylować nie tylko cząsteczki będące wspólnymi substratami PKA i US3, ale także reszty aminokwasowe obecne w podjednostce regulatorowej typu II (RII) PKA, co skutkuje zablokowaniem apoptozy komórek [4].

Stosunkowo niedawno wykazano, że białko US3 HSV-1 oddziałuje z komórkowym białkiem PDCD4 (*programmed cell death protein 4*). W komórkach infekowanych wirusem HSV-1 białko PDCD4 jest potran-

slacyjnie modyfikowane zarówno w sposób zależny, jak i niezależny od kinazy US3. Ponadto na skutek zakażenia następuje akumulacja PDCD4 w jądrze komórki, podczas gdy w normalnych warunkach białko to krąży między jądrem a cytoplazmą [93].

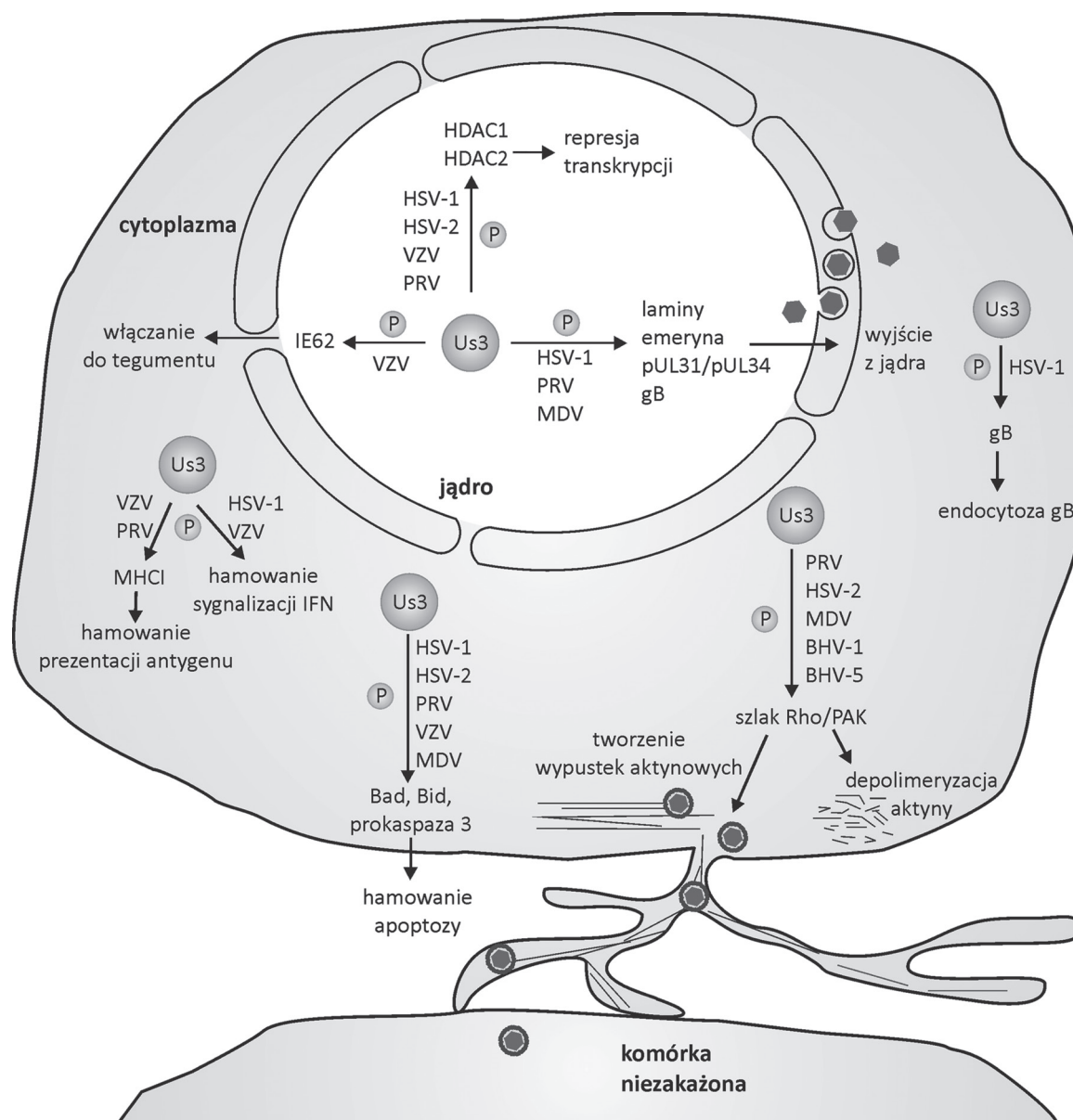
W przypadku US3 BHV-1 przez długi czas uważano, że w odróżnieniu od swych ortologów, białko to nie jest zdolne do blokowania apoptozy [88]. Chcąc sprawdzić, czy rzeczywiście kinaza BHV-1 nie posiada tej ważnej funkcji, Brzozowska i wsp. zbadali, czy w komórkach zainfekowanych dzikim wirusem BHV-1 i wirusem z delecją genu US3 występuje aktywna kaspaza 3 [9]. Obecność US3 hamowała aktywację kaspazy 3 i indukcję apoptozy wywołanej infekcją wirusową oraz czynnikami egzogennymi, takimi jak staurosporyna czy sorbitol. Doświadczenia te pokazały, że białko US3 BHV-1 również posiada właściwości chroniące komórki przed śmiercią apoptotyczną. Właściwości antyapoptotyczne posiada również białko US3 blisko spokrewnionego wirusa BHV-5. Doświadczenia z wykorzystaniem mutantu K261D US3 BHV-5 pokazały, że funkcja ta zależna jest od aktywności kinazowej białka [53].

Zbadano również, czy opisywane wcześniej komórkowe kinazy PAK1 i PAK2, oprócz roli w rearanżacji cytoszkieletu, w czasie infekcji wirusowej mają związek z właściwościami antyapoptotycznymi US3. Obie kinazy PAK biorą udział w regulacji apoptozy. Aktywna kinaza PAK1 może fosforylować proapoptotyczne białko Bad, zarówno *in vivo* jak i *in vitro*, co prowadzi do inaktywacji Bad [84]. Natomiast PAK2, w zależności od mechanizmu aktywacji, może mieć właściwości anty-, jak i proapoptotyczne. Chociaż związek PAK1/2 i US3 wydaje się być oczywisty, ponieważ wszystkie trzy kinazy fosforylują Bad w zainfekowanych komórkach, a US3 modyfikuje dodatkowo kinazy PAK, doświadczenia z inhibitorem kinaz PAK i liniami komórek z wyciszoną ekspresją genów PAK wskazują jedynie na umiarkowane znaczenie tych kinaz dla pełnionych przez US3 funkcji związanych z blokowaniem śmierci komórki. Jedynie obecność PAK1 sprzyja właściwościom antyapoptotycznym US3, co tłumaczy się raczej synergistycznym, ale niezależnym działaniem obu kinaz na białko Bad [97].

Podsumowując, US3 poprzez swoją aktywność kinazową blokuje apoptozę wywołaną różnymi czynnikami, w tym samą infekcją herpeswirusową, działaniem cytotoksycznych limfocytów T, granzymem B, oraz czynnikami zewnętrznymi, takimi jak staurosporyna czy sorbitol.

6. Właściwości immunomodulacyjne białka US3

Przebieg infekcji wirusowej, w tym herpeswirusami, zależy od równowagi pomiędzy stanem immunokompetencji zakażonego organizmu oraz zdolności hamowania



Rys.1. Schemat podsumowujący różne funkcje kinazy US3 alfaherpeswirusów

przebiegu odpowiedzi immunologicznej przez patogen. Herpeswirusy są uważane za mistrzów „ucieczki” immunologicznej; kodują wiele białek immunomodulacyjnych, które potrafią hamować zarówno odpowiedź wrodzoną, jak i nabytą, praktycznie na wszystkich etapach.

6.1. Oddziaływanie z systemami interferonów

Produkcja interferonów typu I (IFN- α , IFN- β i IFN- ω), II (IFN- γ) i III (IFN- λ) stanowi jeden z głównych mechanizmów wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Są to białka sekrecyjne, które wiążąc się ze swoistymi receptorami na powierzchni komórek wpływają na uruchomienie spokrewnionych ze sobą kinazowych szlaków sygnałowych, określanych jako JAK/STAT (*Janus activated kinase/signal transducer and activator*

of transcription), indukujących mechanizmy obrony przeciwwirusowej. Aktywność interferonów zależy od tzw. interferonowych czynników regulacyjnych IRF (*interferon regulatory factors*), działających poprzez modulację ekspresji określonych genów. Efekt antywirusowy wywołany działaniem IFN może być bezpośredni – przez indukcję stanu przeciwwirusowego w sąsiednich komórkach lub pośredni – przez aktywację komórek układu odpornościowego.

Delecja genu US3 wirusa HSV-1 ma związek ze wzrostem wrażliwości wirusa na działanie IFN-. Pokazano, że produkcja cząstek wirusowych w komórkach zakażonych mutantem HSV-1 z delecją genu US3 ulega dramatycznej redukcji na skutek traktowania komórek IFN- α [68]. Wyniki te wskazują na udział kinazy US3 w omijaniu drogi odpowiedzi antywirusowej z udziałem IFN- α (Rys. 1). Ponadto US3 HSV-1 fosforyluje

podjednostkę α receptora interferonu- γ , przez co może blokować ekspresję genów zależną od tej cytokiny [58]. Prawdopodobnie kinaza US3 moduluje również mechanizmy przeciwwirusowe z udziałem IFN- β , ponieważ zakażenie HSV-1ΔUS3 indukuje ekspresję IRF-3 i interferonu β . Białko US3 HSV-1 hamuje ekspresję receptora toll-podobnego 3 (TLR3) oraz białka MxA o właściwościach antywirusowych (*myxovirus resistance protein 1*, białko o aktywności GTPazy warunkujące odporność na zakażenie myksowirusami i wieloma innymi wirusami o genomach w postaci RNA) [67].

6.2. Wpływ na prezentowanie antygenów z udziałem cząsteczek MHC klasy I i aktywność cytotoksycznych limfocytów T

Jednym z najbardziej efektywnych komponentów odpowiedzi antywirusowej są cytotoksyczne limfocyty T. Wykrywają one infekcję wirusową poprzez rozpoznawanie białek wirusowych prezentowanych w kompleksach z białkami głównego układu zgodności tkankowej klasy I (*major histocompatibility complex class I*, MHC I) na powierzchni zainfekowanej komórki. Niektóre herpeswirusy potrafią modulować odpowiedź antywirusową na tym poziomie zmniejszając ilość MHC klasy I na powierzchni komórek.

Do tej pory właściwości immunomodulacyjne polegające na hamowaniu poziomu MHC klasy I wykazano przede wszystkim dla ORF66 wirusa VZV. Białko ORF66 VZV jest zdolne do hamowania MHC I na powierzchni zainfekowanych komórek oraz komórek transfekowanych plazmidami kodującymi ORF66. Aktywność kinazowa ORF66 jest konieczna dla hamowania MHC klasy I. Wykazano, że ORF66 wpływa na opóźnienie transportu kompleksu MHC I-peptyd z retikulum endoplazmatycznego do części *trans* aparatu Golgiego lub też na retencję cząsteczek MHC klasy I w samym aparacie Golgiego [1, 23]. Ponadto ORF66 może wpływać na procesy mające miejsce w ER, takie jak asocjacja łańcucha ciężkiego MHC klasy I z β 2-mikroglobuliną [23]. Przypuszczalnie wirus VZV koduje jeszcze inne białko/białka wpływające na obniżenie poziomu MHC klasy I niezależnie od US3 [23].

W przypadku kinazy US3 wirusa PRV pokazano, że białko to również może wpływać na poziom MHC I, jednak wydaje się, że jedynie w sposób pośredni i w określonym typie komórek. Obecność kinazy US3 PRV jest potrzebna, ale niewystarczająca, aby obniżyć poziom MHC klasy I na powierzchni komórek ST (*swine testicle*), natomiast zupełnie nie jest do tego potrzebna w komórkach PK-15 (*pig kidney*) czy komórkach PAM (*porcine alveolar macrophages*). W przeciwieństwie do US3 VZV, w komórkach transfekowanych plazmidem kodującym US3 PRV (a więc w nieobecności innych

białek wirusowych) nie następuje zahamowanie MHC, co może sugerować różny mechanizm działania tych ortologów. Doświadczenia pokazują, że US3 PRV jest zdolne do modulowania poziomu MHC klasy I jedynie w obecności innych białek wirusowych. Prawdopodobnie kinaza US3 PRV fosforyluje inne wirusowe białko/a oddziałujące z komórkowymi białkami związanymi z prezentacją antygenów przez MHC I lub fosforyluje białko/a komórkowe związane z działaniem MHC I, które w ufosforylowanej postaci może być blokowane przez inne białko wirusowe [20].

Wyniki doświadczeń przeprowadzonych na komórkach transdukowanych wektorem bakulowirusowym niosącym gen białka wirusa US3 BHV-1 oraz na komórkach infekowanych wirusem BHV-1 pokazują, że białko US3 BHV-1 także wpływa na poziom cząstek MHC klasy I na powierzchni komórek [57].

Podczas bezpośredniej transmisji cząstek wirusowych między komórkami na zasadzie tzw. *cell-to-cell spread* (bez uwalniania wirusa do środowiska zewnątrzkomórkowego) mogą być wysyłane sygnały, które będą wpływać na komórki takie jak NK (*natural killer cells*), LAK (*lymphokine-activated killer cells*) czy limfocyty T cytotoksyczne i hamować ich zdolność do zabijania zakażonych komórek [86, 99]. W komórkach zakażonych wirusem HSV-1 i HSV-2 zaobserwowano taką właśnie inaktywację komórek CTL, a ekspresja genu białka US3 jest niezbędna do transmisji sygnału inaktywującego [86].

6.3. Redukcja ekspresji antygenów wirusowych na powierzchni komórek

Endocytoza immunogennych białek, w tym glikoprotein wirusowych, z powierzchni zainfekowanej komórki jest kolejnym sposobem unikania odpowiedzi immunologicznej wykorzystywanym przez herpeswirusy. Endocytozie ulega kilka białek alfa herpeswirusów, w tym glikoproteiny gB, gD, gE/gI, gM, [8, 26]. Glikoproteina gB znajdująca się na powierzchni komórki stanowi potencjalny sygnał indukujący odpowiedź immunologiczną, np. komórek NK [7]. Jak wcześniej wspomniano, kinaza US3 HSV-1 fosforyluje domenę cytoplazmatyczną gB w miejscu Thr 887 [37, 94]. Fosforylacja ta wpływa nie tylko na lokalizację glikoproteiny B wewnątrz komórki oraz patogenezę HSV-1, ale także wpływa na obniżenie poziomu gB na powierzchni zainfekowanych komórek [43]. Podczas infekcji BHV-1 również obserwuje się zależny od obecności kinazy US3, obniżony poziom glikoproteiny gB, a także gD, na powierzchni komórek [57]. Endocytozę gB oraz gD zaobserwowano także w przypadku infekcji PRV, gdzie zjawiska te sprzyjają usuwaniu kompleksów antygen-przeciwciała z powierzchni zainfekowanych mono-

cytów. Jednak rola US3 w tym procesie nie jest jasna, ponieważ endocytoza glikoprotein gB i gD zachodzi również w nieobecności US3 [28].

6.4. Wpływ na aktywację limfocytów NKT

Komórki NKT (*natural killer T cells*) posiadają na swej powierzchni zarówno receptory limfocytów T, jak i receptory typowe dla komórek NK. Stanowią one jedną z głównych składowych wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Aktywowane podczas infekcji komórki NKT wydzielają duże ilości cytokin aktywujących limfocyty CD4+ typu Th1 i Th2. Komórkom NKT przypisuje się działanie przeciwnowotworowe, przeciwwirusowe, antybakteryjne oraz przeciw pasożytnicze [50]. Komórki NKT rozpoznają antygeny glikolipidowe związane z białkiem powierzchniowym CD1d, które pod względem budowy przypomina białko głównego kompleksu zgodności tkankowej klasy I, ale nie wykazuje polimorfizmu.

Podczas zakażenia wirusem HSV-1 komórek prezentujących antygen APC następuje gwałtowne i wydajne obniżenie poziomu CD1d, w rezultacie czego komórki te są gorzej rozpoznawane przez limfocyty NKT [75]. Zmniejszeniu ulega poziom białka CD1d powracającego po endocytozie na powierzchnię komórki. Pokazano, że wirusowa glikoproteina gB HSV-1 oddziałuje z CD1d w retikulum endoplazmatycznym i pozostaje z nim stabilnie związana. Jednak do wydajnego obniżenia poziomu CD1d potrzebne jest także białko US3. Ekspresja US3 prowadzi do zwiększenia poziomu gB w części *trans* aparatu Golgiego (TGN) oraz wzmacnia relokalizację zarówno gB, jak i CD1d, do tego właśnie kompartmentu komórki. Zarówno US3, jak i gB, są białkami niezbędnymi do wydajnego obniżenia prezentacji antygenów przez CD1d i zahamowania aktywacji komórek NKT [75].

7. Inne funkcje kinazy US3

Prócz wyżej omówionych funkcji białka US3 należy również wspomnieć jego wpływ na energetykę komórki. Otóż w efekcie infekcji wirusem HSV-1 obserwuje się nieprawidłowe funkcjonowanie mitochondrialnego łańcucha oddechowego [18]. Zahamowanie całkowitego oddychania komórkowego jest efektem zablokowania mitochondrialnego łańcucha transportującego elektrony. Łańcuch ten złożony jest z kilku „ogniw”, którymi są kompleksy lipoproteinowe oznaczone numerami I, II, III i IV. Zbadano, iż zablokowanie tego łańcucha na skutek infekcji HSV-1 następuje między kompleksem II, czyli oksydoreduktazą bursztynian-CoQ, a kompleksem III, czyli oksydoreduktazą CoQH₂-cytochrom c. Dzieje się to w czasie tzw. fazy beta ekspresji genów

wirusowych, kiedy to zachodzi transkrypcja genów wczesnych białek wirusowych. Do tych białek należy kinaza US3. Dalsze doświadczenia pokazały, że mutant nieposiadający US3 nie był w stanie blokować mitochondrialnego transportu elektronów. Stąd wniosek, że białko US3 HSV-1 odpowiada za hamowanie oddychania mitochondrialnego w czasie infekcji [18].

Jak wspomniano wcześniej (rozdz. 5.) kinaza US3 HSV-1 jest zdolna do aktywowania komórkowej kinazy białkowej A (PKA). Późniejsze badania wskazują, że kinaza US3 wpływa także na kinazę fosfatydoinozytolu (PI3K) oraz komórkową kinazę białkową B/Akt, będące składnikami antyapoptotycznego szlaku transdukcji sygnału [5]. W zdrowych, niezakażonych komórkach, aktywacja PKB/Akt stanowi główny element drogi blokowania apoptozy. W swoich badaniach Bennett i Roman wykazali, że wcześniej w infekcji HSV-1 indukowana jest fosforylacja reszty aminokwasowej seryny 473 PKB/Akt, na drodze mechanizmu zależnego od PI3K. Zablockowanie PI3K indukowało apoptozę w niezakażonych komórkach lub zakażonych mutantem wirusowym HSV-1ΔUS3, ale nie w komórkach zakażonych dzikim wirusem. Następowala również redukcja gromadzenia się specyficznych białek wirusowych, w tym kinazy US3, ale zjawiska te nie miały istotnego wpływu na namnażanie się wirusa. W późniejszym czasie po infekcji całkowita ilość PKB/Akt spadała, a jej ufosforylowana forma zanikała w sposób zależny od obecności US3 i niezależny od białkowej fosfatazy 2A. Aktywacja PKA przy użyciu forskoliny, substancji pochodzenia roślinnego zwiększającej stężenie cyklicznego AMP w komórkach, nie powodowała znaczącej defosforylacji PKB/Akt. Przedstawione w tych badaniach wyniki są zgodne z modelem zakładającym, że PKB/Akt jest aktywowana wcześniej w infekcji i blokuje apoptozę w zainfekowanych komórkach zanim nastąpi akumulacja US3 oraz że PKB/Akt pozostaje w komórce i funkcjonuje jako białko antyapoptotyczne pod nieobecność US3, ale staje się zbędna lub nawet szkodliwa kiedy kinaza US3 zostaje zakumulowana w efektywnej ilości.

8. Podsumowanie

Obecność kinazy serynowo-treoninowej US3 jest cechą unikalną dla alfa herpeswirusów. Chociaż białko US3 należy do najlepiej poznanych kinaz białkowych herpeswirusów a jego właściwości są obiektem licznych badań, wiele mechanizmów działania US3 wciąż pozostaje niewyjaśnionych. Wielofunkcyjność kinazy US3 przejawia się w jej udziale w cyklu replikacyjnym wirusa, m.in. morfogenezie wirionów i ich uwalnianiu z komórki, czemu towarzyszy zaangażowanie w wiele procesów wpływających na samą zainfekowaną

komórkę i jej otoczenie, takich jak regulacja ekspresji genów, hamowanie apoptozy, rearanżacje cytoszkieletu, czy też modulacja powstawania odpowiedzi immunologicznej, zarówno wrodzonej, jak i nabytej. Aktywność kinazowa US3 jest niezbędna do pełnienia większości funkcji tego białka. Dzięki tym „dodatkowym” właściwościom, związanych z kontrolą procesów komórkowych, szczególnie takich jak rozprzestrzenianie się wirusa pomiędzy komórkami oraz przebieg odpowiedzi immunologicznej, można zaliczyć kinazę US3 do czynników wirulencji alfa herpeswirusów, obok białek takich jak ICP47 i ICP34.5.

Jedną z istotniejszych funkcji białka US3 może okazać się ta, jaką pełni ono w walce herpeswirusów z układem immunologicznym gospodarza, bowiem aktywność białek immunomodulacyjnych obniża skuteczność komercyjnych i testowanych szczepionek przeciw herpeswirusowych oraz herpeswirusów testowanych w terapii genowej i onkolitycznej [16]. Delecja genu US3 powinna poprawiać właściwości immunogenne szczepionek oraz redukować rozprzestrzenianie się wirusów szczepionkowych, a w przypadku wektorów onkolitycznych indukować apoptozę w komórkach nowotworowych i zwiększać neurowirulencję wektorów przeznaczonych do terapii nowotworów centralnego układu nerwowego. Już dziś testuje się wektory oparte na wirusie opryszczki HSV-2 pozbawione genu US3 jako potencjalne szczepionki [21]. Wektory onkolityczne mogą z kolei stanowić korzystne uzupełnienie radio- i chemioterapii. Jednym z przykładów zastosowania mutantu wirusowego HSV-1 pozbawionego genu białka US3 w wirotterapii onkolitycznej mogą być badania przeprowadzone na komórkach ludzkiego glejaka, w których testowano wektor z delecją genu US3 towarzyszącą mutacji w genie reduktazy rybonukleotydowej UL39 [42]. Biorąc pod uwagę fakt, iż kandydatami do stosowania w terapii onkolitycznej są również alfa herpeswirusy BHV-1 i EHV-1 [15, 77], poznanie właściwości ortologów kinazy US3 tych wirusów może przyczynić się do konstrukcji bardziej efektywnych wektorów.

Piśmiennictwo

- Abendroth A., Lin I., Slobedman B., Ploegh H., Arvin A.M.: Varicella-zoster virus retains major histocompatibility complex class I proteins in the Golgi compartment of infected cells. *J. Virol.* **75**, 4878–4888 (2001)
- Asano S., Honda T., Goshima F., Watanabe D., Miyake Y., Sugiura Y., Nishiyama Y.: US3 protein kinase of herpes simplex virus type 2 plays a role in protecting corneal epithelial cells from apoptosis in infected mice. *J. Gen. Virol.* **80**, 51–56 (1999)
- Banks T.A., Rouse B.T.: Herpesviruses – immune escape artists? *Clin. Infect. Dis.* **14**, 933–41 (1992)
- Benetti L., Roizman B.: Herpes simplex virus protein kinase US3 activates and functionally overlaps protein kinase A to block apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 9411–9416 (2004)
- Benetti L., Roizman B.: Protein Kinase B/Akt Is Present in Activated Form throughout the Entire Replicative Cycle of Δ US3 Mutant Virus but Only at Early Times after Infection with Wild-Type Herpes Simplex Virus 1. *J. Virol.* **80**, 3341–3348 (2006)
- Benetti L., Roizman B.: In transduced cells, the US3 protein kinase of herpes simplex virus 1 precludes activation and induction of apoptosis by transfected procaspase 3. *J. Virol.* **81**, 10242–10248 (2007)
- Bishop G.A., Glorioso J.C., Schwartz S.A.: Relationship between expression of herpes simplex virus glycoproteins and susceptibility of target cells to human natural killer activity. *J. Exp. Med.* **157**, 1544–1561 (1983)
- Brideau A.D., Enquist L.W., Tirabassi R.S.: The role of virion membrane protein endocytosis in the herpesvirus life cycle. *J. Clin. Virol.* **17**, 69–82 (2000)
- Brzowska A., Rychłowski M., Biekowska-Szewczyk K.: Glycoprotein gE and Us3 Kinase: Two Players in Cell-To-Cell Spread of Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1). 36th International Herpesvirus Workshop Poster 33 (2011)
- Brzowska A., Rychłowski M., Lipińska A.D., Biekowska-Szewczyk K.: Point mutations in BHV-1 US3 gene abolish its ability to induce cytoskeletal changes in various cell types. *Vet. Microbiol.* **143**, 8–13 (2010)
- Calton C.M., Randall J.A., Adkins M.W., Banfield B.W.: The Pseudorabies Virus Serine/Threonine Kinase Us3 Contains Mitochondrial, Nuclear and Membrane Localization Signals. *Virus Genes*, **29**, 131–145 (2004)
- Cartier A., Broberg E., Komai T., Henriksson M., Masucci M.G.: The herpes simplex virus-1 Us3 protein kinase blocks CD8T cell lysis by preventing the cleavage of Bid by granzyme B. *Cell Death Differ.* **10**, 1320–1328 (2003)
- Cartier A., Komai T., Masucci M.G.: The Us3 protein kinase of herpes simplex virus 1 blocks apoptosis and induces phosphorylation of the Bcl-2 family member Bad. *Exp. Cell Res.* **291**, 242–250 (2003a)
- Cohen P.: The regulation of protein function by multisite phosphorylation: a 25 year update. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 596–601 (2000)
- Courchesne M.J., White M.C., Stanfield B.A., Frampton A.R.Jr.: Equine herpesvirus type 1-mediated oncolysis of human glioblastoma multiforme cells. *J. Virol.* **86**, 2882–2886 (2012)
- Dasgupta G., Chentoufi A.A., Nesburn A.B., Wechsler S.L., BenMohamed L.: New concepts in herpes simplex virus vaccine development: notes from the battlefield. *Expert Rev. Vaccines*, **8**, 1023–1035 (2009)
- Davison A.J.: Herpesvirus systematic. *Vet. Microbiol.* **143**, 52–69 (2010)
- Derakhshan M., Willcocks M.M., Salako M.A., Kass G.E., Carter M.J.: Human herpesvirus 1 protein US3 induces an inhibition of mitochondrial electron transport. *J. Gen. Virol.* **87**, 2155–2159 (2006)
- Deruelle M.J., Favoreel H.W.: Keep it in the subfamily: the conserved alphaherpesvirus US3 protein kinase. *J. Gen. Virol.* **92**, 18–30 (2011)
- Deruelle M.J., Van den Broeke C., Nauwynck H.J., Mettenleiter T.C., Favoreel H.W.: Pseudorabies virus US3- and UL49.5-dependent and -independent downregulation of MHC I cell surface expression in different cell types. *Virology*, **395**, 172–181 (2009)
- Diaz F., Knipe D.: US3 deletion and intramuscular inoculation increases dl5-29 vaccine efficacy. 37th International Herpesvirus Workshop Poster 6.28 (2012)
- Eisfeld A.J., Turse S.E., Jackson S.A., Lerner E.C., Kinchington P.R.: Phosphorylation of the varicella-zoster virus (VZV)

- major transcriptional regulatory protein IE62 by the VZV open reading frame 66 protein kinase. *J. Virol.* **80**, 1710–1723 (2006)
23. Einfeld A.J., Yee M.B., Erazo A., Abendroth A., Kinchington P.R.: Downregulation of class I major histocompatibility complex surface expression by varicella-zoster virus involves open reading frame 66 protein kinase-dependent and -independent mechanisms. *J. Virol.* **81**, 9034–9049 (2007)
 24. Erazo A., Kinchington P.R.: Varicella-zoster virus open reading frame 66 protein kinase and its relationship to alphaherpesvirus US3 kinases. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **342**, 79–98 (2010)
 25. Farnsworth A., Wisner T.W., Webb M., Roller R., Cohen G., Eisenberg R., Johnson D.C.: Herpes simplex virus glycoproteins gB and gH function in fusion between the virion envelope and the outer nuclear membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 10187–10192 (2007)
 26. Favoreel H.W., Nauwynck H.J., Halewyck H.M., Van Oostveldt P., Mettenleiter T.C., Pensart M.B.: Antibody-induced endocytosis of viral glycoproteins and major histocompatibility complex class I on pseudorabies virus-infected monocytes. *J. Gen. Virol.* **80**, 1283–1291 (1999)
 27. Favoreel H.W., Van Minnebruggen G., Adriaensen D., Nauwynck H.J. Cytoskeletal rearrangements and cell extensions induced by the US3 kinase of an alphaherpesvirus are associated with enhanced spread. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 8990–8995 (2005)
 28. Ficiska J., Van Minnebruggen G., Nauwynck H.J., Biekowska-Szewczyk K., Favoreel H.W.: Pseudorabies virus glycoprotein gD contains a functional endocytosis motif that acts in concert with an endocytosis motif in gB to drive internalization of antibody-antigen complexes from the surface of infected monocytes. *J. Virol.* **79**, 7248–7254 (2005)
 29. Finnen R.L., Banfield B.W.: Subcellular localization of the alphaherpesvirus serine/threonine kinase Us3 as a determinant of Us3 function. *Virulence*, **1**, 291–294 (2010)
 30. Finnen R.L., Roy B.B., Zhang H., and Banfield B.W.: Analysis of filamentous process induction and nuclear localization properties of the HSV-2 serine/threonine kinase Us3. *Virology*, **397**, 23–33 (2010)
 31. Frame M.C., Purves F.C., McGeoch D.J., Marsden H.S., Leader D.P.: Identification of the herpes simplex virus protein kinase as the product of viral gene US3. *J. Gen. Virol.* **68**, 2699–2704 (1987)
 32. Geenen K., Favoreel H.W., Olsen L., Enquist L.W., Nauwynck H.J.: The pseudorabies virus US3 protein kinase possesses anti-apoptotic activity that protects cells from apoptosis during infection and after treatment with sorbitol or staurosporine. *Virol.* **331**, 144–150 (2005)
 33. Granzow H., Klupp B.G., Fuchs W., Veits J., Osterrieder N., Mettenleiter T.C.: Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J. Virol.* **75**, 3675–3684 (2001)
 34. Hanks S.K., Hunter T.: Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**, 576–596 (1995)
 35. Hata S., Koyama A.H., Shiota H., Adachi A., Goshima F., Nishiyama Y.: Antiapoptotic activity of herpes simplex virus type 2: the role of US3 protein kinase gene. *Microbes Infect.* **1**, 601–607 (1999)
 36. Heibin J.A., Goping I.S., Barry M., Pinkoski M.J., Shore G.C., Green D.R., Bleackley R.C.: Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax. *J. Exp. Med.* **192**, 1391–1402 (2000)
 37. Imai T., Sagou K., Ariei J., Kawaguchi Y.: Effects of phosphorylation of herpes simplex virus 1 envelope glycoprotein B by Us3 kinase in vivo and in vitro. *J. Virol.* **84**, 153–162 (2010)
 38. Ishizaki T., Uehata M., Tamechika I., Keel J., Nonomura K., Maekawa M., Narumiya S.: Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol. Pharmacol.* **57**, 976–983 (2000)
 39. Jacob T., Van den Broeke C., van Troys M., Waterschoot D., Ampe C., Favoreel H.W.: Alphaherpesviral US3 kinase induces cofilin dephosphorylation to reorganize the actin cytoskeleton. *J. Virol.* **87**, 4121–4126 (2013)
 40. Jerome K.R., Fox R., Chen Z., Sears A.E., Lee H., Corey L.: Herpes simplex virus inhibits apoptosis through the action of two genes, Us5 and Us3. *J. Virol.* **73**, 8950–8957 (1999)
 41. Jones T.R., Wiertz E.J., Sun L., Fish K.N., Nelson J.A., Ploegh H.L.: Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11327–11333 (1996)
 42. Kanai R., Wakimoto H., Martuza R.L., Rabkin S.D.: A novel oncolytic herpes simplex virus that synergizes with phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway inhibitors to target glioblastoma stem cells. *Clin. Cancer Res.* **17**, 3686–3696 (2011)
 43. Kato A., Ariei J., Shiratori I., Akashi H., Arase H., Kawaguchi Y.: Herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 phosphorylates viral envelope glycoprotein B and regulates its expression on the cell surface. *J. Virol.* **83**, 250–261 (2009)
 44. Kato A., Liu Z., Minowa A., Imai T., Tanaka M., Sugimoto K., Nishiyama Y., Ariei J., Kawaguchi Y.: Herpes simplex virus 1 protein kinase Us3 and major tegument protein UL47 reciprocally regulate their subcellular localization in infected cells. *J. Virol.* **85**, 9599–9613 (2011)
 45. Kato A., Tanaka M., Yamamoto M., Asai R., Sata T., Nishiyama Y., Kawaguchi Y.: Identification of a physiological phosphorylation site of the herpes simplex virus 1-encoded protein kinase Us3 which regulates its optimal catalytic activity in vitro and influences its function in infected cells. *J. Virol.* **82**, 6172–6189 (2008)
 46. Kato A., Yamamoto M., Ohno T., Kodaira H., Nishiyama Y., Kawaguchi Y.: Identification of proteins phosphorylated directly by the Us3 protein kinase encoded by herpes simplex virus 1. *J. Virol.* **79**, 9325–9331 (2005)
 47. Kato A., Yamamoto M., Ohno T., Tanaka M., Sata T., Nishiyama Y., Kawaguchi Y.: Herpes simplex virus 1-encoded protein kinase UL13 phosphorylates viral Us3 protein kinase and regulates nuclear localization of viral envelopment factors UL34 and UL31. *J. Virol.* **80**, 1476–1486 (2006)
 48. Klupp B., Altmenschmidt J., Granzow H., Fuchs W., Mettenleiter T.C.: Glycoproteins required for entry are not necessary for egress of pseudorabies virus. *J. Virol.* **82**, 6299–6309 (2008)
 49. Klupp B.G., Granzow H., Mettenleiter T.C.: Effect of the pseudorabies virus US3 protein on nuclear membrane localization of the UL34 protein and virus egress from the nucleus. *J. Gen. Virol.* **82**, 2363–2371 (2001)
 50. Kope-Szłęzak J.: Subpopulacje limfocytów T. *Onkol. Pol.* **8**, 17–20 (2005)
 51. Labiuk S.L., Babiuk L.A., van Drunen Littel-van den Hurk S.: Major tegument protein VP8 of bovine herpesvirus 1 is phosphorylated by viral US3 and cellular CK2 protein kinases. *J. Gen. Virol.* **90**, 2829–2839 (2009)
 52. Labiuk S.L., Lobanov V., Lawman Z., Snider M., Babiuk L.A., van Drunen Littel-van den Hurk S.: Bovine herpesvirus-1 US3 protein kinase: critical residues and involvement in the phosphorylation of VP22. *J. Gen. Virol.* **91**, 1117–1126 (2010)
 53. Ladelfa M.F., Kotsias F., Zajac M.P., Van den Broeke C., Favoreel H., Romera S.A., Calamante G.: Effect of the US3 protein of bovine herpesvirus 5 on the actin cytoskeleton and apoptosis. *Vet. Microbiol.* **153**, 361–366 (2011)

54. Leach N., Bjerke S.L., Christensen D.K., Bouchard J.M., Mou F., Park R., Baines J., Haraguchi T., Roller R.J.: Emerin is hyperphosphorylated and redistributed in herpes simplex virus type 1-infected cells in a manner dependent on both UL34 and US3. *J. Virol.* **81**, 10792–10803 (2007)
55. Leader D.P., Deana A.D., Marchiori F., Purves F.C., Pinna L.A.: Further definition of the substrate specificity of the alpha-herpesvirus protein kinase and comparison with protein kinases A and C. *Biochim. Biophys. Acta*, **1091**, 426–431 (1991)
56. Leopardi R., Van Sant C., Roizman B.: The herpes simplex virus 1 protein kinase US3 is required for protection from apoptosis induced by the virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 7891–7896 (1997)
57. Lesiak D., Brzozowska A., Rychłowski M., Bieńkowska-Szewczyk K., Lipiska A.D.: Evasion of antiviral host responses by a multifunctional serine/threonine kinase of Alphaherpesviruses. 37th International Herpesvirus Workshop Poster 9.48 (2012)
58. Liang L., Roizman B.: Expression of gamma interferon-dependent genes is blocked independently by virion host shutoff RNase and by US3 protein kinase. *J. Virol.* **82**, 4688–4696 (2008)
59. McGeoch D.J., Davison A.J.: Alphaherpesviruses possess a gene homologous to the protein kinase gene family of eukaryotes and retroviruses. *Nucleic Acids Res.* **14**, 1765–1777 (1986)
60. Morimoto T., Arai J., Tanaka M., Sata T., Akashi H., Yamada M., Nishiyama Y., Uema M., Kawaguchi Y.: Differences in the regulatory and functional effects of the US3 protein kinase activities of herpes simplex virus 1 and 2. *J. Virol.* **83**, 11624–11634 (2009)
61. Morris J.B., Hofemeister H., O'Hare P.: Herpes Simplex virus infection induces phosphorylation and delocalization of emerin, a key inner nuclear membrane protein. *J. Virol.* **81**, 4429–4437 (2007)
62. Mou F., Forest T., Baines J.D.: US3 of herpes simplex virus type 1 encodes a promiscuous protein kinase that phosphorylates and alters localization of lamin A/C in infected cells. *J. Virol.* **81**, 6459–6470 (2007)
63. Mou F., Wills E., Baines J.D.: Phosphorylation of the UL31 protein of herpes simplex virus 1 by the US3 encoded kinase regulates localization of the nuclear envelopment complex and egress of nucleocapsids. *J. Virol.* **83**, 5181–5191 (2009)
64. Murata T., Goshima F., Daikoku T., Takakuwa H., Nishiyama Y.: Expression of herpes simplex virus type 2 US3 affects the Cdc42/Rac pathway and attenuates c-Jun N-terminal kinase activation. *Genes Cells*, **5**, 1017–1027 (2000)
65. Murphy F.A., Gibbs E.P.J., Horzinek M.C., Studdert M.J., Herpesviridae (w) Veterinary Virology, wyd. 3, Academic Press, San Diego, 1999, s. 302, 309–322
66. Ogg P.D., McDonnell P.J., Ryckman B.J., Knudson C.M., Roller R.J.: The HSV-1 Us3 protein kinase is sufficient to block apoptosis induced by overexpression of a variety of Bcl-2 family members. *Virology*, **319**, 212–224 (2004)
67. Peri P., Mattila R.K., Kantola H., Broberg E., Karttunen H.S., Waris M., Vuorinen T., Hukkanen V.: Herpes simplex virus type 1 Us3 gene deletion influences toll-like receptor responses in cultured monocytic cells. *Virology*, **5**, 140 (2008)
68. Piroozmand A., Koyama A.H., Shimada Y., Fujita M., Arakawa T., Adachi A.: Role of Us3 gene of herpes simplex virus type 1 for resistance to interferon. *Int. J. Mol. Med.* **14**, 641–645 (2004)
69. Poon A.P., Benetti L., Roizman B.: U(S)3 and U(S)3.5 protein kinases of herpes simplex virus 1 differ with respect to their functions in blocking apoptosis and in virion maturation and egress. *J. Virol.* **80**, 3752–3764 (2006)
70. Poon A.P., Gu H., Roizman B.: ICP0 and the US3 protein kinase of herpes simplex virus 1 independently block histone deacetylation to enable gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 9993–9998 (2006)
71. Poon A.P., Roizman B.: Herpes simplex virus 1 ICP22 regulates the accumulation of a shorter mRNA and of a truncated US3 protein kinase that exhibits altered functions. *J. Virol.* **79**, 8470–8479 (2005)
72. Purves F.C., Longnecker R.M., Leader D.P., Roizman B.: Herpes simplex virus 1 protein kinase is encoded by open reading frame US3 which is not essential for virus growth in cell culture. *J. Virol.* **61**, 2896–2901 (1987)
73. Purves F.C., Ogle W.O., Roizman B.: Processing of the herpes simplex virus regulatory protein alpha 22 mediated by the UL13 protein kinase determines the accumulation of a subset of alpha and gamma mRNAs and proteins in infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 6701–6705 (1993)
74. Purves F.C., Spector D., Roizman B.: The herpes simplex virus 1 protein kinase encoded by the US3 gene mediates posttranslational modification of the phosphoprotein encoded by the UL34 gene. *J. Virol.* **65**, 5757–5764 (1991)
75. Rao P., Pham H.T., Kulkarni A., Yang Y., Liu X., Knipe D.M., Cresswell P., Yuan W.: Herpes simplex virus 1 glycoprotein B and US3 collaborate to inhibit CD1d antigen presentation and NKT cell function. *J. Virol.* **85**, 8093–8104 (2011)
76. Reynolds A.E., Ryckman B.J., Baines J.D., Zhou Y., Liang L., Roller R.J.: U(L)31 and U(L)34 proteins of herpes simplex virus type 1 form a complex that accumulates at the nuclear rim and is required for envelopment of nucleocapsids. *J. Virol.* **75**, 8803–8817 (2001)
77. Rodrigues R., Cuddington B., Mossman K.: Bovine herpesvirus type 1 as a novel oncolytic virus. *Cancer Gene Ther.* **17**, 344–355 (2010)
78. Roizman B., Knipe D.M., Whitley R., Herpes simplex viruses (w) Fields Virology, wyd. 5, red. Howley P., Philadelphia: Lippincott, 2007, s. 2501–2601
79. Roizman B., Pellet P.E., The family *Herpesviridae*: a brief introduction (w) Fields virology, wyd. 5, red. Howley P., Philadelphia: Lippincott, 2007, s. 2480–2499
80. Ryckman B.J., Roller R.J.: Herpes simplex virus type 1 primary envelopment: UL34 protein modification and the US3-UL34 catalytic relationship. *J. Virol.* **78**, 399–412 (2004)
81. Schaap A., Fortin J.F., Sommer M., Zerboni L., Stamatis S., Ku C.C., Nolan G.P., Arvin A.M.: T-cell tropism and the role of ORF66 protein in pathogenesis of varicella-zoster virus infection. *J. Virol.* **79**, 12921–12933 (2005)
82. Schumacher D., McKinney C., Kauffer B.B., Osterrieder N.: Enzymatically inactive U(S)3 protein kinase of Marek's disease virus (MDV) is capable of depolymerizing F-actin but results in accumulation of virions in perinuclear invaginations and reduced virus growth. *Virology*, **375**, 37–47 (2008)
83. Schumacher D., Tischer B.K., Trapp S., Osterrieder N.: The protein encoded by the US3 orthologue of Marek's disease virus is required for efficient de-envelopment of perinuclear virions and involved in actin stress fiber breakdown. *J. Virol.* **79**, 3987–3997 (2005)
84. Schürmann A., Mooney A.F., Sanders L.C., Sells M.A., Wang H.G., Reed J.C., Bokoch G.M.: p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist bad and protects cells from apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 453–461 (2000)
85. Skiba M., Glowinski F., Koczan D., Mettenleiter T.C., Karger A.: Gene expression profiling of Pseudorabies virus (PrV) infected bovine cells by combination of transcript analysis and quantitative proteomic techniques. *Vet. Microbiol.* **143**, 14–20 (2010)
86. Sloan D.D., Zahariadis G., Posavad C.M., Pate N.T., Kussick S.J., Jerome K.R.: CTL are inactivated by herpes simplex virus-infected cells expressing a viral protein kinase. *J. Immunol.* **171**, 6733–6741 (2003)

87. Struhl K.: Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev.* **12**, 599–606 (1998)
88. Takashima Y., Tamura H., Xuan X., Otsuka H.: Identification of the US3 gene product of BHV-1 as a protein kinase and characterization of BHV-1 mutants of the US3 gene. *Virus Res.* **59**, 23–34 (1999)
89. Trapani J.A.: Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Gen. Biol.* **2**, 3014.1–3014.7 (2001)
90. Wagenaar F., Pol J.M., Peeters B., Gielkens A.L., de Wind N., Kimman T.G.: The US3-encoded protein kinase from pseudorabies virus affects egress of virions from the nucleus. *J. Gen. Virol.* **76**, 1851–1859 (1995)
91. Walters M.S., Erazo A., Kinchington P.R., Silverstein S.: Histone deacetylases 1 and 2 are phosphorylated at novel sites during varicella-zoster virus infection. *J. Virol.* **83**, 11502–11513 (2009)
92. Walters M.S., Kinchington P.R., Banfield B.W., Silverstein S.: Hyperphosphorylation of histone deacetylase 2 by alphaherpesvirus US3 kinases. *J. Virol.* **84**, 9666–9676 (2010)
93. Wang X., Patenode C., Roizman B.: US3 protein kinase of HSV-1 cycles between the cytoplasm and nucleus and interacts with programmed cell death protein 4 (PDCD4) to block apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 14632–14636 (2011)
94. Wisner T.W., Wright C.C., Kato A., Kawaguchi Y., Mou F., Baines J.D., Roller R.J., Johnson D.C.: Herpesvirus gB-induced fusion between the virion envelope and outer nuclear membrane during virus egress is regulated by the viral US3 kinase. *J. Virol.* **83**, 3115–3126 (2009)
95. Van den Broeke C., Deruelle M., Nauwynck H.J., Collier K.E., Smith G.A., Van Doorslaere J., Favoreel H.W.: The kinase activity of pseudorabies virus US3 is required for modulation of the actin cytoskeleton. *Virol.* **385**, 155–160 (2009)
96. Van den Broeke C., Radu M., Deruelle M., Nauwynck H., Hofmann C., Jaffer Z.M., Chernoff J., Favoreel H.W.: Alpha-herpesvirus US3-mediated reorganization of the actin cytoskeleton is mediated by group A p21-activated kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 8707–8712 (2009)
97. Van den Broeke C., Radu M., Nauwynck H.J., Chernoff J., Favoreel H.W.: Role of group A p21-activated kinases in the anti-apoptotic activity of the pseudorabies virus US3 protein kinase. *Virus Res.* **155**, 376–380 (2011)
98. Van Minnebruggen G., Favoreel H.W., Jacobs L., Nauwynck H.J.: Pseudorabies virus US3 protein kinase mediates actin stress fiber breakdown. *J. Virol.* **77**, 9074–9080 (2003)
99. York I.A., Johnson D.C.: Direct contact with herpes simplex virus-infected cells results in inhibition of lymphokine-activated killer cells because of cell-to-cell spread of virus. *J. Infect. Dis.* **168**, 1127–1132 (1993)
100. Young L.S., Dawson C.W., Eliopoulos A.G.: Viruses and apoptosis. *Br. Med. Bull.* **53**, 509–521 (1997)

Praca naukowa finansowana ze środków projektu badawczego POMOST/2010-2/7 Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej, współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego.

Sylwia Rynans^{1*}, Szymon Walter de Walthoffen¹, Tomasz Dzieciatkowski¹,
Grażyna Młynarczyk¹

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

Wpłynęło w lutym 2013 r.

1. Wstęp. 2. Wirusowe zakażenia ostre OUN. 2.1. Wirusowe zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych. 2.2 Wirusowe zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu. 3. Ostre zespoły poekspozycyjne. 4. Przewlekłe zakażenia wirusowe. 5. Podsumowanie

Viral infections of the central nervous system. Part I: DNA viruses

Abstract: Clinical involvement of the central nervous system (CNS) is an unusual manifestation of human viral infection. The spectrum of brain involvement and the outcome of the disease are dependent on the specific pathogen, the immunologic state of the host, and environmental factors. Most human viruses can cause serious neurological disease of the central nervous system, either during primary infection or in the course of virus reactivation from latently infected tissue. DNA viruses cause diseases of the CNS, which can be classified into three groups: acute infections, acute post-exposure syndromes and chronic diseases. This article presents current knowledge about epidemiology and clinical presentation of DNA virus infections in the central nervous system.

1. Introduction. 2. Acute viral infections of the CNS. 2.1 Viral meningitis. 2.2 Viral meningoencephalitis. 3. Acute post-exposure syndromes. 4. Chronic viral infections. 5. Summary

Słowa kluczowe: neuroinfekcje, wirusy DNA, zaburzenia neurologiczne

Key words: DNA viruses, neuroinfection, neurological disorders

1. Wstęp

Wirusy neurotropowe są subkomórkowymi patogenami wykazującymi zdolność zakażenia komórek ośrodkowego układu nerwowego (OUN). W zależności od zakaźności wirusa oraz efektywności odpowiedzi układu immunologicznego gospodarza, zakażenia te mogą przybierać formę ostrą, przewlekłą lub przechodzić w postać latentną. Szczep i nasilenie procesu replikacji wirusa, droga zakażenia, wiek oraz predyspozycje genetyczne osoby zakażonej, a także zakres uszkodzeń są czynnikami warunkującymi neuroinwazyjność, neurotropizm i przebieg procesu wyzdrowienia [4].

Liczba wirusów zakażających OUN oraz różnorodność wywoływanych przez nie chorób jest zaskakująco duża. Dla uproszczenia choroby te można zaklasyfikować do trzech grup (Tab. I). Do pierwszej zalicza się zakażenia ostre, do których należą m.in. wirusowe zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, *poliomyelitis*, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu czy też zapalenie mózgu. Do grupy drugiej zalicza się ostre zespoły poekspozycyjne wśród których wyróżniamy zespół Guillain-Barre'a, zespół Reye'a czy też pozakaźne lub poszczepienne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego. Do grupy trzeciej zaklasyfikowano rzadko występujące, aczkolwiek zazwyczaj śmiertelne, wirusowe zakażenia przewlekłe [7].

Neuroinfekcje mogą wywoływać wirusy zawierające w swym genomie zarówno DNA, jak i RNA. Do wiru-

Tabela I
Zakażenia ośrodkowego układu nerwowego wywoływane przez wirusy DNA

Zakażenia ostre	
Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	HSV-2
Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu	HSV-1, VZV, CMV, HHV-6
Zespoły poekspozycyjne	
Pozakaźne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego	VZV
Zespół Guillain-Barre'a	EBV, CMV, HHV-6
Zespół Reye'a	VZV
Stwardnienie rozsiane	EBV, HHV-6, JCV
Zakażenia przewlekłe	
Postępująca wieloogniskowa leukencefalopatia	JCV

sów DNA, omówionych w tej części pracy, zakażających zarówno pacjentów immunokompetentnych, jak i osoby z niedoborami immunologicznymi, należą herpeswirusy ludzkie (*Human herpesviruses* – HHVs) (Tab. II) oraz poliomawirus JC (JCV) [4].

2. Wirusowe zakażenia ostre OUN

Do zakażeń ostrych wywoływanych przez wirusy DNA zaliczamy m.in. zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych (ZOMR) oraz zapalenie mózgu. Aseptyczne

* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa, tel: 022 628 27 39, e-mail: sylwia.rynans@gmail.com

Tabela II
Zakażenia i choroby ośrodkowego układu nerwowego
wywołane przez herpeswirusy ludzkie

Wirus	Zakażenia / Choroby OUN
HSV-1	Zapalenie mózgu, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie rdzenia
HSV-2	Zapalenie mózgu, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie rdzenia
VZV	Zapalenie mózgu, zespół Reye'a, ostra ataksja, zespół Ramsey'a-Hunta
EBV	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie nerwu wzrokowego, zespół Guillain-Barre'a, porażenie połowicze, zespół Alicji w Krainie Czarów
CMV	Zapalenie mózgu, zespół Guillain-Barre'a, mielopatia, zapalenie siatkówki
HHV-6	Zapalenie mózgu, drgawki gorączkowe, porażenie połowicze, zespół Guillain-Barre'a

zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych jest wynikiem zapalenia i obrzęku opon mózgowo-rdzeniowych otaczających mózg i rdzeń kręgowy, które zazwyczaj ustępują bez następstw. Do charakterystycznych objawów zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych należą: ból głowy, sztywność karku, gorączka, czasem wymioty, a liczba zachorowań szacowana jest na 5–15 na 10 000 osób rocznie [5]. Zapalenie mózgu, zwane także encefalopatią (*encephalitis*) jest ciężkim zaburzeniem neurologicznym przebiegającym z klinicznymi objawami zaburzenia czynności mózgu. Wirusowe zapalenie mózgu jest najczęstszą przyczyną wszystkich zapaleń mózgu, a częstość jego występowania waha się od 3,5 do 7,4 na 100 000 przypadków [11].

2.1. Wirusowe zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych

Spośród wirusów DNA, najczęstszym czynnikiem etiologicznym zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych jest HHV-2, zwany pospolicie wirusem opryszczki pospolitej typu 2 (*Herpes simplex virus type 2*; HSV-2). Wirusowe ZOMR mogą wywoływać także HHV-3 znany jako wirus opsy wietrznej i półpaśca (*Varicella-zoster virus*; VZV), HHV-4 znany jako wirus Epsteina-Barr (*Epstein-Barr virus*; EBV) oraz HHV-5 znany jako wirus cytomegalii (*Cytomegalovirus*; CMV). Zakażenia te są zazwyczaj łagodne i ustępują samoistnie po kilku dniach [10].

Powtarzające się zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych związane z zakażeniem HSV-2 u dorosłych prowadzi do zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych Mollareta [3]. Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych Mollareta występuje częściej u 36% kobiet oraz 11% mężczyzn i charakteryzuje się nawracającymi epizodami zapalenia opon mózgowych, stanów gorączkowych oraz ostrych bólów głowy trwających zwykle od 2 do 5 dni. Około 40% pacjentek, u których dochodzi do rozwoju tego syndromu, przechodziło w przeszłości zakażenie genitalne

HSV-2, powikłane zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych. Do nawrotu zakażenia dochodzi u ok. 20% tych osób. Choroba wymaga leczenia objawowego i ustępuje samoistnie [29].

2.2. Wirusowe zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu

Najważniejszymi wirusami DNA powodującymi zapalenie mózgu są HSV, VZV, CMV oraz HHV-6. Zapalenia te zawsze przebiegają z jednoczesnym zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych [11].

Do rozwoju opryszczkowego zapalenia mózgu (*herpes simplex encephalitis*; HSE) może dojść u pacjentów w każdym wieku i niezależnie od płci, aczkolwiek jedna trzecia wszystkich zakażeń dotyczy osób pomiędzy 6 miesiącem a 2 rokiem życia, natomiast połowa zakażeń dotyka pacjentów powyżej 50 roku życia [31]. Wynika to najprawdopodobniej z rozwoju zakażeń pierwotnych u grupy młodszej wiekowo, a w przypadku pacjentów starszych – z reaktywacji zakażenia latentnego. W Stanach Zjednoczonych HSE występuje z częstością 1 przypadku na 250 000 mieszkańców rocznie. Zapalenie mózgu wywołane przez HSV-1 jest ciężką chorobą charakteryzującą się wysokim stopniem śmiertelności, sięgającym do 70% w przypadkach braku terapii [9, 29]. Objawami wskazującymi na zapalenie mózgu związane z zakażeniem wirusem opryszczki są drgawki, bezdech, paraliż lub śpiączka. Około 90% przypadków opryszczkowego zapalenia mózgu u dzieci i dorosłych wywołanych jest zakażeniem HSV-1 [9], podczas gdy HSV-2 związany jest z HSE u noworodków oraz pacjentów z obniżoną odpornością, głównie zakażonych ludzkim wirusem niedoboru odporności (*Human immunodeficiency virus*; HIV) lub po zabiegach transplantacji. U osób tych może dojść do rozwoju ostrego nekrotyzującego zapalenia mózgu [20]. Czynnikiem etiologicznym zapalenia mózgu u dzieci starszych jest zwykle HSV-1. Zakażenie to rozpoczyna się niespecyficznymi gorączką, bólami głowy, wymiotami, złym samopoczuciem oraz zaburzeniami behawioralnymi. Następnie pojawiają się objawy ogniskowe takie jak afazja, zaburzenia pola widzenia czy też niedowład połowiczny, a u 40% dzieci występują drgawki gorączkowe [3].

Zapalenie mózgu jest rzadką komplikacją zakażenia VZV u osób dorosłych oraz pacjentów z niedoborami immunologicznymi. Zapalenie to może występować w postaci waskulopatii obejmującej duże lub małe naczynia albo zapalenia wyściółki komór. Waskulopatia obejmująca duże naczynia rozwija się głównie u dorosłych pacjentów immunokompetentnych, natomiast do waskulopatii obejmującej małe naczynia oraz zapalenia wyściółki komór dochodzi niemal jedynie u osób z obniżoną odpornością. Do objawów zapalenia mózgu związanego z zakażeniem VZV należą bóle głowy, drgawki,

ogniskowy deficyt neurologiczny oraz zmiany umysłowe [27]. U pacjentów po zapaleniu mózgu będącym powikłaniem zakażenia VZV może dojść do spowolnienia funkcji poznawczych, utraty pamięci czy też zmian emocjonalnych i behawioralnych. Są to typowe objawy rozwoju zaburzeń poznawczych typu podkorowego, które mogą prowadzić do demencji [16]. Do zgonu dochodzi w 5–10% przypadków [11].

Zapalenie mózgu związane z zakażeniem CMV ma zwykle postać rozlaną i występuje u chorych na AIDS z liczbą limfocytów CD4⁺ poniżej 50 komórek/mm³ krwi. W przebiegu zapalenia mózgu dochodzi do zapalenia komórek i mózgu, w których zmiany nekrotyczne zajmują obszary okołokomorowe. Zakażenia cytomegalowirusem rzadko dotyczą dzieci immunokompetentnych, aczkolwiek mogą być u nich powiązane z samooograniczającym się zapaleniem mózgu. Pojawiają się wtedy symptomy takie jak bóle głowy, gorączka, zaburzenia świadomości czy też drgawki [15].

HHV-6 wykazuje wysokie powinowactwo do ośrodkowego układu nerwowego. W tkankach mózgu immunokompetentnych osób dorosłych częstość detekcji wirusa przy użyciu PCR wynosi od 15 do 85%, co świadczy o bezpośrednim zakażeniu oraz latencji wirusa w OUN [32]. W przypadku reaktywacji HHV-6 u pacjentów po transplantacji komórek krwiotwórczych (hematopoietic stem cell transplantation; HSCT) może dojść do zapalenia mózgu, czego konsekwencją może być zaburzenie czynności hipokampa, zaburzenie snu czy też utrata pamięci krótkotrwałej [6]. Bardzo rzadko zdarzają się przypadki jednoczesnego rozwoju zapalenia mózgu oraz zespołu Guillain-Barre'a u osób po HSCT. W Polsce pierwszy taki przypadek opisany w 2009 roku dotyczył pacjentki, która w 145 dniu po transplantacji została hospitalizowana z powodu reaktywacji zakażenia CMV. W przebiegu leczenia u kobiety doszło do rozwoju zapalenia mózgu, powikłanego zespołem Guillain-Barre'a, którego zdiagnozowanym czynnikiem etiologicznym był HHV-6 [28]. Zapalenie mózgu jest sporadycznym, ale potencjalnie śmiertelnym stanem rozwijającym się u biorców narządów unaczynionych zakażonych HHV-6. Do rozwoju zapalenia mózgu dochodzi średnio w 24 dniu po przeszczepieniu, a u pacjentów obserwuje się zakłopotanie, zaburzenia świadomości oraz dezorientację [30]. Chociaż rokowania po zapaleniu mózgu, wywołanym zakażeniem HHV-6, są pomyślne, zdarzają się przypadki śmiertelne oraz incydenty porażenia połowicznego czy też opóźnienia rozwoju umysłowego [32].

3. Ostre zespoły poekspozycyjne

Do zespołów poekspozycyjnych, będących wynikiem ekspozycji człowieka na żywe lub inaktywowane wirusy DNA albo ich antygeny należą zespół Guillain-Barre'a,

zespół Reye'a oraz półpasiec [7]. Istnieją także doniesienia mówiące o powiązaniu niektórych zakażeń wirusami DNA ze stwardnieniem rozsianym [13].

Przewlekła zapalna polineuropatia demielinizacyjna, zwana Zespołem Guillain-Barre'a rozwija się u 0,6–4 na 100 000 osób rocznie [17]. Zakażenie CMV jest czynnikiem powodującym ok. 10–15% przypadków zespołu Guillain-Barre'a, charakteryzującego się szybko rozwijającym się niedowładem kończyn. Podłoże choroby jest prawdopodobnie autoimmunologiczne, z udziałem zarówno komórkowej, jak i humoralnej odpowiedzi immunologicznej [15]. EBV może wywoływać szereg objawów neurologicznych, włączając zespół Guillain-Barre'a, a zaburzenie te występuje u 1–5% osób chorych na mononukleozę zakaźną [3, 14]. Z zespołem Guillain-Barre'a może być również skorelowane zakażenie HHV-6 [32].

Pierwotne zakażenie VZV może być powiązane z zespołem Reye'a, czyli ostrej encefalopatii przebiegającej z objawami niewydolności wątroby. Zespół ten rozwija się u poniżej 0,1% dzieci immunokompetentnych, natomiast znacznie częściej pojawia się u dzieci z zaburzeniami odporności lub chorych na AIDS [3]. W przebiegu zespołu Reye'a może dojść do obrzęku mózgu oraz śmierci około 30% chorych [25].

Do reaktywacji zakażenia VZV dochodzi u 10–20% populacji w następstwie osłabienia wydolności układu immunologicznego. Częstość zachorowań wzrasta u osób starszych, chorych na zespół nabytego niedoboru odporności (Acquired Immunodeficiency Syndrome; AIDS) lub pacjentów z zaburzeniami odporności. W trakcie reaktywacji VZV jest uwalniany wzdłuż nerwu, wywołując charakterystyczne zmiany pęcherzykowe zwane półpaścem. Po fazie objawów prodromalnych rozpoczyna się faza ostra. Zmiany skórne pojawiają się jednostronnie, najczęściej w obrębie jednego dermatomu, i znikają po 7–10 dniach [25]. Reaktywacja VZV u pacjentów immunokompetentnych może być przyczyną zapalenia nerwów lub zapalenia splotu nerwowego. Zapalenie nerwów może prowadzić do zespołu Ramsay'a-Hunta, objawiającego się bólem zlokalizowanym w okolicy unerwianej przez zajęty nerw, który często promieniuje do ucha, pęcherzykową wysypkę w okolicy małżowiny usznej oraz porażeniem nerwu twarzowego [22]. Neuralgia półpaścowa (postherpetic neuralgia; PHN), definiowana jako ból utrzymujący się ponad 30 dni od ostrej fazy zakażenia, jest najczęstszą komplikacją neurologiczną półpaśca u osób powyżej 55 roku życia. Nerwobóle mogą utrzymywać się przez kilka miesięcy, a u 20% chorych nawet ponad rok. PHN jest częstą przyczyną depresji oraz bezsenności [25]. Pomimo licznych badań klinicznych nad czynnikami przeciwwirusowymi, steroidami i środkami uśmierzającymi ból, jak dotąd nie opracowano skutecznego lekarstwa na nerwobóle [22]. Oprócz starszego wieku, czynnikami ryzyka rozwoju

neuralgii są ostry ból w trakcie przebiegu półpaśca, intensywna wysypka oraz ból odczuwalny przed pojawieniem się zmian skórnych [19].

Od wielu lat przeprowadzane są próby powiązania reaktywacji HHV-6 z rozwojem stwardnienia rozsianego. DNA HHV-6 wykryto we krwi 65% pacjentów z nawracającym stwardnieniem rozsianym, a nawrót choroby skorelowany był z nasileniem wirerii, co mogło świadczyć o obecności aktywnego zakażenia wirusem. Badania, które wykazały wysoki poziom DNA w tkankach mózgu chorych na stwardnienie rozsiane, sugerują reaktywację wirusa ze stanu letencji w czasie trwania choroby. Jakkolwiek żadne z przeprowadzonych badań nie dowodzą, że HHV-6 jest bezpośrednim czynnikiem rozwoju stwardnienia rozsianego [12]. Jak dotąd nie wiadomo również, czy EBV jest czynnikiem etiologicznym rozwoju stwardnienia rozsianego czy też obecność przeciwciał swoistych wobec EBV u 99% chorych jest wynikiem jego reaktywacji w trakcie choroby [2]. W prospektywnych badaniach serologicznych przeprowadzonych na grupie 62 439 kobiet, Ascherio i wsp. zaobserwowali znaczny wzrost poziomu EBV-swoistych przeciwciał w surowicy pacjentek na początku choroby [1]. Mimo, iż udokumentowano zdolność EBV do wywoływania objawów neurologicznych we wszystkich częściach układu nerwowego człowieka, żadne badania nie dowiodły obecności DNA EBV świadczącego o replikacji, w mózgu pacjentów chorych na stwardnienie rozsiane [13]. Wysoka zakaźność, zdolność do wywoływania zakażeń persystentnych oraz unikalna zdolność do wiązania komórek glejowych sugerują również, iż JCV może być czynnikiem etiologicznym rozwoju stwardnienia rozsianego [21]. Jakkolwiek do chwili obecnej nie udowodniono bezpośredniego wpływu zakażeń wirusowych na rozwój stwardnienia rozsianego, dlatego też badania w tym kierunku powinny być kontynuowane [13].

4. Przewlekłe zakażenia wirusowe

Jedynym wirusem DNA, wywołującym przewlekłe zakażenia OUN jest poliowirus JC (*Polyomavirus JC*; JCV), który w następstwie zakażeń w wieku dziecięcym przedostaje się do tkanek układu moczowego, gdzie powoduje zakażenie przetrwałe [18].

JCV ulega reaktywacji w wyniku osłabienia układu immunologicznego, głównie na skutek immunosupresji związanej z przeszczepieniem organów lub w przebiegu AIDS, powodując rozwój zespołu klinicznego znanego jako postępująca wieloogniskowa leukoencefalopatia (progressive multifocal leukoencephalopathy; PML) [26]. Około 80% przypadków PML dotyczy pacjentów zakażonych HIV. W badaniu kohortowym EUROSida wykazano, że częstość PML wśród zakażonych HIV spadła z 10 przypadków na 1 000 osób do 1 przypadku

na 1 000 osób, dzięki wprowadzeniu wysoce aktywnej terapii antyretrowirusowej (highly active antiretroviral therapy; HAART) [8]. PML jest zaburzeniem powodującym demielinizację tkanki nerwowej ośrodkowego układu nerwowego oraz pojawieniem się oligodendrocytów o nieprawidłowej budowie, będących głównym miejscem aktywnego zakażenia JCV. PML cechuje się niedowładem połowicznym, demencją, otępieniem, zaburzeniami mowy oraz widzenia [23]. W przebiegu choroby dochodzi do nasilenia objawów, a ciągu 3 do 6 miesięcy może nastąpić zgon pacjenta [18].

5. Podsumowanie

Wiele wirusów wykazuje silny neurotropizm, powodując choroby ośrodkowego układu nerwowego. Pato-mechanizm zakażenia wirusami DNA w większości przypadków jest nieznan. Wirusy te wywołują zakażenia, które można sklasyfikować w trzech grupach. Najczęstszym czynnikiem etiologicznym zakażeń ostrych, takich jak ZOMR i zapalenie mózgu, jest HSV. Grupę drugą stanowią ostre zespoły poekspozycyjne takie jak wywoływany reaktywacją zakażenia VZV półpaśiec czy też zespół Guillain-Barre'a oraz zespół Reye'a, wywoływany przez inne herpeswirusy. Do grupy trzeciej zaliczmy zazwyczaj śmiertelne choroby przewlekłe takie jak postępująca wieloogniskowa encefalopatia. Neuroinfekcje wirusowe powodują często zgon pacjenta, a u znacznej liczby ozdrowieńców obserwuje się trwałe następstwa neurologiczne. Niezmiernie ważna jest szybkie wykrywanie, profilaktyka oraz skuteczna terapia zakażeń ośrodkowego układu nerwowego wywoływanych wirusami DNA, aczkolwiek tematyka ta wykracza poza ramy tego artykułu.

Piśmiennictwo

1. Ascherio A., Munger K.L., Lennette E.T., Spiegelman D., Hernán M.A., Olek M.J., Hankinson S.E., Hunter D.J.: Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis. A prospective study. *JAMA*, **286**, 3083–3088 (2001)
2. Bagert B.A.: Epstein-Barr virus in multiple sclerosis. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **9**, 405–410 (2009)
3. Bale J.F. Jr: Human herpesviruses and neurological disorders of childhood. *Semin. Pediatr. Neurol.* **6**, 278–287 (1999)
4. Chakraborty S., Nazmi A., Dutta K., Basu A.: Neurons under viral attack: victims or warriors? *Neurochem. Int.* **56**, 727–735 (2010)
5. Chadwick D.R.: Viral meningitis. *Br. Med. Bull.* **75–76**, 1–14 (2006)
6. Cheng F.W., Lee V., Leung W.K., Chan P.K., Leung T.F., Shing M.K., Li C.K.: HHV-6 encephalitis in pediatric unrelated umbilical cord transplantation: a role for ganciclovir prophylaxis? *Pediatr. Transplant.* **14**, 483–487 (2010)
7. Collier L., Oxford J.: Human virology: a text for students of medicine, dentistry, and microbiology, 3rd ed. Oxford: Oxford University Press; 2006, s. 223–228

8. d'Arminio Monforte A., Cinque P., Mocroft A., Goebel F.D., Antunes F., Katlama C., Justesen U.S., Vella S., Kirk O., Lundgren J; EuroSIDA Study Group: et al. Changing incidence of central nervous system diseases in the EuroSIDA cohort. *Ann. Neurol.* **55**, 320–328 (2004).
9. Dzieciatkowski T., Przybylski M., Marchel H., Prokopienko M., Kawecki D., Młynarczyk G.: Wykorzystanie techniki real-time PCR w diagnostyce opryszczkowego zapalenia mózgu jako powikłania zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych wywołanego przez *Listeria monocytogenes* – opis przypadku. *Post. Mikrobiol.* **49**, 325–328 (2010)
10. Erasmus M.: Viral infections of the central nervous system. *CME.* **29**, 190–193 (2011)
11. Ferrari S., Toniolo A., Monaco S., Luciani F., Cainelli F., Baj A., Temesgen Z., Vento S.: Viral Encephalitis: Etiology, Clinical Features, Diagnosis and Management. *Open. Infect. Diss. J.* **3**, 1–12 (2009)
12. Fotheringham J., Jacobson S.: Human herpesvirus 6 and multiple sclerosis: potential mechanisms for virus-induced disease. *Herpes*, **12**, 4–9 (2005)
13. Gilden D.H.: Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* **4**, 195–202 (2005)
14. Gilden D.H., Mahalingam R., Cohrs R.J., Tyler K.L.: Herpesvirus infections of the nervous system. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* **3**, 82–94 (2007)
15. Griffiths P.: Cytomegalovirus infection of the central nervous system. *Herpes*, **11**, 95A–104A (2004)
16. Hokkanen L., Launes J., Poutiainen E., Valanne L., Salonen O., Sirén J., Iivanainen M.: Subcortical type cognitive impairment in herpes zoster encephalitis. *J. Neurol.* **244**, 239–245 (1997)
17. Israeli E., Agmon-Levin N., Blank M., Chapman J., Shoenfeld Y.: Guillain-Barré syndrome- a classical autoimmune disease triggered by infection or vaccination. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **42**, 121–130 (2012)
18. Jiang M., Abend J.R., Johnson S.F., Imperiale M.J.: The role of polyomaviruses in human disease. *Virology*, **384**, 266–273 (2009)
19. Johnson R.W., Dworkin R.H.: Treatment of herpes zoster and postherpetic neuralgia. *BMJ*, **326**, 748–750 (2003)
20. Kennedy P.G.E., Chaudhuri A.: Herpes simplex encephalitis. *J. Neurol Neurosurg Psychiatry*, **73**, 237–238 (2002)
21. Khalili K., White M.K.: Human demyelinating disease and the polyomavirus JCV. *Mult. Scler.* **12**, 133–142 (2006)
22. Kleinschmidt-DeMasters B.K., Gilden D.H.: Varicella-Zoster virus infections of the nervous system: clinical and pathologic correlates. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **125**, 770–780 (2001)
23. Kmiecik D., Dębicki S.: Rola wirusa JC w patogenezie chorób nowotworowych i zaburzeń związanych z osłabieniem odporności. *Post. Mikrobiol.* 5–14 (2008)
24. Majewska A., Dzieciatkowski T., Przybylski M., Łuczak M.: Półpasiec – reaktywacja zakażenia ludzkim herpeswirusem typu 3. *Zakażenia*, zesz. **3**, 58–64 (2006)
25. Mizuguchi M., Yamanouchi H., Ichiyama T., Shiomi M.: Acute encephalopathy associated with influenza and other viral infections. *Acta Neurol. Scand.* **115**, 45–56 (2007)
26. Rynans S., Dzieciatkowski T., Młynarczyk G.: Zakażenia ludzkimi poliomawirusami osób poddanych immunosupresji. *Post. Mikrobiol.* **50**, 3, 191–199 (2011)
27. Toledo P.V., Pellegrino L.N., Cunha C.A.: Varicella-zoster virus encephalitis in an AIDS patient. *Bras. J. Infect. Dis.* **8**, 255–258 (2004)
28. Tomaszewska A., Nasilowska-Adamska B., Dzieciatkowski T., Mariańska B.: Simultaneous human herpesvirus 6-associated encephalitis and Guillain-Barré syndrome in a patient after matched unrelated donor haematopoietic stem cell transplantation. *Arch. Med. Sci.* **2**, 288–290 (2009)
29. Tyler K.L.: Herpes simplex virus infections of the central nervous system: encephalitis and meningitis, including Mollaret's. *Herpes*, **11**, 57A–64A (2004)
30. Vinnard C., Barton T., Jerud E., Blumberg E.: A report of human herpesvirus 6-associated encephalitis in a solid organ transplant recipient and a review of previously published cases. *Liver Transplant.* **15**, 1242–1246 (2009)
31. Ward K.N.: The natural history and laboratory diagnosis of human herpesviruses-6 and -7 infections in the immunocompetent. *J. Clin. Virol.* **32**, 183–193 (2005)
32. Yoshikawa T., Asano Y.: Central nervous system complications in human herpesvirus-6 infection. *Brain Dev.* **22**, 307–314 (2000)

Sylwia Rynans^{1*}, Szymon Walter de Walthoffen¹, Tomasz Dzieciatkowski¹,
Grażyna Młynarczyk¹

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

Wpłynęło w lutym 2013 r.

1. Wstęp. 2. Wirusowe zakażenia ostre OUN. 2.1. Wirusowe zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych. 2.2. Wirusowe zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu. 2.3. Wścieklizna. 2.4. Poliomyelitis. 3. Ostre zespoły poekspozycyjne. 4. Przewlekłe zakażenia wirusowe. 5. Podsumowanie

Viral infections of the central nervous system. Part II: RNA viruses

Abstract: The central nervous system (CNS) is a target for acute viral infections, as well as a reservoir of latent and persisting viruses. Virus infections of the central nervous system are an important but likely under-diagnosed cause of neurological disease in many developing countries. Infections of the CNS are commonly due to RNA viruses that have expanded their geographic range, spread from animal reservoirs or acquired new neurovirulence properties. RNA viruses cause diseases of the CNS, which can be classified into three groups: acute infections, acute post-exposure syndromes and chronic diseases. The viral infections manifest themselves with diverse clinical symptoms, which are often common to many other diseases. This article presents current knowledge about epidemiology and clinical presentation of RNA virus infections in the central nervous system.

1. Introduction. 2. Acute viral infections of the CNS. 2.1. Viral meningitis. 2.2. Viral meningoencephalitis. 2.3. Rabies. 2.4. Poliomyelitis. 3. Acute post-exposure syndromes. 4. Chronic viral infections. 5. Summary

Słowa kluczowe: neuroinfekcje, wirusy RNA, zaburzenia neurologiczne

Key words: neuroinfection, neurological disorders, RNA viruses

1. Wstęp

Wirusowe zakażenia ośrodkowego układu nerwowego (OUN) wywołuje szereg wirusów RNA: enterowirusy, flawiwirusy, wirus niedoboru odporności, wirus grypy, świnki, odry, różyczki oraz wirus wścieklizny. Wirusy te, choć zawierają RNA, różnią się organizacją genomów oraz należą do innych rodzin (Tab. I) [9]. Zakażenia wywoływane nimi możemy podzielić na zakażenia ostre, ostre zespoły poekspozycyjne oraz zakażenia przewlekłe (Tab. II) [2].

2. Wirusowe zakażenia ostre OUN

Ostre zakażenia ośrodkowego układu nerwowego (OUN) są następstwem bezpośredniego zakażenia wirusem, który może być izolowany z płynu mózgowo-rdzeniowego lub mózgu. Do zakażeń tych należą m.in. wirusowe zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych (ZOMR) wywoływane przez wirus świnki lub enterowirusy, *poliomyelitis*, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu wywoływane flawiwirusami czy też zapalenie mózgu w przebiegu wścieklizny [2].

Tabela I

Ważniejsze wirusy RNA wywołujące zakażenia OUN

Wirus	Rodzina	Rodzaj	Genom
HIV	<i>Retroviridae</i>	<i>Lentivirus</i>	ss (+) RNA-RT
Wirus wścieklizny	<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Lyssavirus</i>	ss (-) RNA
Wirus polio	<i>Picornaviridae</i>	<i>Enterovirus</i>	ss (+) RNA
Wirus coxsackie			
Enterowirus 71			
Wirus japońskiego zapalenia mózgu	<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	ss (+) RNA
Wirus zapalenia mózgu Murray Valley			
Wirus Zachodniego Nilu			
Wirus zapalenia mózgu St. Louis			
Wirus kleszczowego zapalenia mózgu			

* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa, tel: 022 628 27 39, e-mail: sylwia.rynans@gmail.com

Tabela II

Zakażenia ośrodkowego układu nerwowego wywoływane przez wirusy RNA

Zakażenia ostre	
Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	enterowirusy, wirus świnki
<i>Poliomyelitis</i>	wirus polio
Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu	flawiwirusy
Zapalenie mózgu	wirus wścieklizny
Zespoły poekspozycyjne	
Pozakaźne i poszczepienne zapalenie mózgu i rdzenia kręgowego	wirus odry, różyczki, świnki, grypy
Zespół Guillain-Barre'a	wirus grypy, świnki, różyczki
Zespół Reye'a	wirus grypy
Zakażenia przewlekłe	
Podostre stwardniające zapalenie mózgu	wirus odry
Progresywne różyczkowe zapalenie mózgu	wirus różyczki
Ołpienie związane z neuroinfekcją HIV	HIV

2.1. Wirusowe zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych

Enterowirusy są jednym z głównych czynników etiologicznych aseptycznego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych. Do najczęściej wykrywanych w przebiegu ZOMR enterowirusów zaliczamy echowirusy 4, 6, 9, 11, 13, 30, wirus coxsackie B5 oraz enterowirus 71 [20]. Enterowirusy powodują ok. 75 000 przypadków ZOMR w Stanach Zjednoczonych rocznie i mogą być przyczyną zgonów zarówno dzieci, jak i ludzi dorosłych. Ponieważ wiele przypadków ZOMR przebiega łagodnie i nie wymaga hospitalizacji, częstość zakażeń enterowirusami jest najprawdopodobniej niedoszacowana [1]. Enterowirusy przenoszą się drogą feralno-oralną, a lokalne ogniska zakażenia wybuchają zazwyczaj w szkołach i ośrodkach opieki. Do rozwoju zakażenia dochodzi zwykle późnym latem, a po wynoszącym od 3 do 7 dni okresie inkubacji u chorych można zaobserwować typowe objawy ZOMR [23].

Przed wprowadzeniem szczepionki przeciwko śwince, wirus świnki był najczęstszym czynnikiem etiologicznym wirusowych ZOMR [27]. Objawy zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych w przebiegu świnki są zauważalne zazwyczaj w ciągu 5 dni od zapoczątkowania zapalenia przyusznicy, ale w niektórych przypadkach pojawiają się po 2 tygodniach lub nawet jeszcze przed pojawieniem się symptomów świnki. Wirus przenoszony jest przez bliski kontakt lub drogę kropelkową. Zakażenie objawowe dotyczy ok. 10% przypadków, choć pleocytoza w płynie mózgowo-rdzeniowym (cerebrospinal fluid; CSF) występuje u ok. 50% osób zakażonych wirusem świnki [16]. Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych mija zazwyczaj po 7–10 dniach nie pozostawiając trwałych następstw, aczkolwiek w 1 na 20 000 przypadków może dojść do jednostronnej głuchoty [27].

2.2. Wirusowe zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu

Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych oraz mózgu u człowieka mogą wywoływać flawiwirusy zaliczane do kompleksu antygenowego wirusa japońskiego zapalenia mózgu, do którego należą wirus Zachodniego Nilu (*West Nile virus*; WNV), wirus japońskiego zapalenia mózgu (*Japanese encephalitis virus*; JEV), wirus zapalenia mózgu St. Louis (*St. Louis encephalitis virus*; SLEV), wirus zapalenia mózgu doliny Murray (*Murray Valley encephalitis virus*; MVEV) oraz wirus Kunjin, będący podtypem wirusa Zachodniego Nilu, występującym w Australii; a także wirus kleszczowego zapalenia mózgu (*Tick-borne encephalitis virus*; TBEV) należący do serokompleksu kleszczowego zapalenia mózgu. Zakażenia ośrodkowego układu nerwowego flawiwirusami powodują poważne następstwa, w tym zgon pacjenta [11].

WNV przenoszony jest na ludzi głównie przez komary z rodzaju *Culex* i zaliczany jest do flawiwirusów najszerzej rozpowszechnionych na świecie [25]. Do zakażenia OUN dochodzi u 1 na 150 osób zakażonych tym wirusem. Choroby neuroinwazyjne w przebiegu zakażenia WNF rozwijają się częściej u osób starszych oraz pacjentów z niedoborami immunologicznymi. Rzadko dochodzi do rozwoju zaburzeń neurologicznych u dzieci [4]. U osób młodszych częściej rozwija się aseptyczne ZOMR, natomiast u starszych pacjentów wzrasta ryzyko zapalenia mózgu. Śmiertelność wśród chorych może wynosić od 5 do 10% [1]. U pacjentów nie wykazujących zaburzeń ogniskowych stwierdza się zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, natomiast przy zajęciu miąższu mózgu stwierdza się zapalenie mózgu. Zapalenie mózgu w przebiegu zakażenia WNV objawia się śpiączką, konwulsjami lub też porażeniem wiotkim [4].

JEV przenoszony jest głównie przez komary z rodzaju *Culex* i wywołuje ok. 30 000–50 000 przypadków

zapalenia mózgu rocznie [2]. Do rozwoju chorób neurologicznych dochodzi częściej u dzieci niż u osób dorosłych, a śmiertelności wynosi 20–30% [24]. Przy ostrym zapaleniu mózgu obserwuje się dużą częstotliwość drgawek, a w ciężkich przypadkach chorzy zapadają w śpiączkę [10]. W przebiegu zapalenia mózgu może rozwinąć się zespół zbliżony do choroby Parkinsona, w którym zaobserwować można jednostajny wyraz twarzy, brak mrugania powiekami oraz objaw koła zębatego występujący w parkinsonizmie. U pacjentów nie wykazujących objawów zapalenia mózgu może dojść do rozwoju zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych lub porażenia wiotkiego [11].

TBEV wywołuje kleszczowe zapalenie mózgu (*Tick-borne encephalitis*; TBE) zwane dawniej rosyjskim wiosenno-letnim kleszczowym zapaleniem mózgu. Do zakażenia człowieka dochodzi poprzez ukłucie zakażonego wirusem kleszcza, głównie rodzaju *Ixodes*. Możliwe jest też zakażenia drogą pokarmową poprzez spożycie niepasteryzowanego mleka koziego lub krowiego. Bezobjawowy okres inkubacji wirusa trwa 7–14 dni, aczkolwiek u niektórych pacjentów pierwsze objawy mogą pojawić się już w ciągu 1 do 2 dni od zakażenia. Zaobserwować można wówczas ból w szyi, barkach oraz dolnej części pleców. Wzrasta ciepłota ciała, pojawia się uczucie znużenia, wymioty oraz nasilają się bóle mięśni [12]. Po okresie inkubacji następuje okres bezobjawowy, po którym ma miejsce faza neurologiczna choroby. Przy zapaleniu opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu pojawiają się apatia lub nadmierne pobudzenie ruchowe, zaburzenia świadomości z utratą przytomności lub zamroczeniem; rzadziej afazja lub niedowład połowiczny. Podczas choroby może dojść do uszkodzenia nerwów czaszkowych, zaburzeń ze strony autonomicznego układu nerwowego, a nawet zaburzeń psychicznych [19]. Przy bardzo ciężkich formach TBE obserwuje się zaburzenia neurologiczne takie jak porażenia oraz niedowłady nerwów czaszkowych i obwodowych czy też konwulsje. Powikłaniami neurologicznymi, występującymi u ok. 20–60% ozdrowieńców, mogą być liczne zespoły neurologiczne czy też zaburzenia sfery intelektualnej [11].

2.3. Wścieklizna

Zakażenie wirusem wścieklizny w 80–85% przypadków prowadzi do rozwoju zapalenia mózgu, czyli wścieklizny pobudzeniowej, która jest chorobą śmiertelną. Wirus wścieklizny może zakażać niemal wszystkie ssaki, a do zakażenia człowieka dochodzi w wyniku ukąszenia przez zainfekowane zwierzę lub drogą jatrogenną [2]. Corocznie odnotowuje się przynajmniej 55 000 zachorowań na wściekliznę na świecie, a wiele przypadków pozostaje nierozpoznanych [18].

Okres wylegania choroby wynosi od 5 dni do 6 miesięcy, średnio 20–60 dni [6]. Początek zakażenia charak-

teryzuje trwający od 1 do 10 dni okres prodromalny, w którym pojawiają się niespecyficzne objawy grypopodobne włączając gorączkę, bóle głowy, nudności, złe samopoczucie, wymioty oraz swędzenie w miejscu ukąszenia. Po fazie prodromalnej zaobserwować można ostre objawy neurologiczne. Chorzy wykazują niepokój oraz pobudzenie, a także dyzartrię, dysfagię, diplopię, nadmierne ślinienie się, zawroty głowy, oczopląs oraz halucynacje. W większości przypadków pojawia się wodowstręt oraz zapalenie wielonerwowe. Po ok. 7–10 dniach pacjent zapada w śpiączkę, po czym umiera na skutek niewydolności oddechowej. Rzadko dochodzi do rozwoju przebiegającej nieco łagodniej wścieklizny porażennej, w której dominującym objawem jest paraliż [15].

2.4. Poliomyelitis

Poliomyelitis, czyli wirusowe zapalenie rogów przednich rdzenia kręgowego, zwane dawniej nagminnym porażeniem dziecięcym, prowadzi do porażenia oraz grozi trwałym kalectwem w wielu przypadkach powodując zgon pacjenta [22]. Okres inkubacji wirusa polio waha się od 2 do 35 dni; zwykle wynosi 7–14 dni, a choroba może przebiegać bezobjawowo, w postaci porażennej lub pełnoobjawowo (Rys. 1) [2].

Ok. 95% zakażeń wirusami polio przebiega bezobjawowo. U 4–8% zakażonych po wystąpieniu wirerii mogą wystąpić nieswoiste objawy świadczące o rozwoju zakażenia poronnego. Zaobserwować wówczas można objawy przypominające zakażenie układu pokarmowego lub górnych dróg oddechowych, w tym gorączkę oraz ból gardła. U 1–2% mogą pojawić się objawy oponowe, t.j. ból głowy, gorączka, sztywność karku, świadczące o rozwoju aseptycznego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych o dość łagodnym przebiegu. Do rozwoju choroby pełnoobjawowej, czyli postaci porażennej, dochodzi zaledwie u 0,1–1% osób zakażonych. Pełnoobjawowe zapalenie rogów przednich rdzenia kręgowego może przybrać postać rdzeniową, opuszkową lub opuszkowo-rdzeniową. Postać rdzeniowa charakteryzuje się porażeniami wiotkimi. Przy postaci opuszkowej dochodzi do



Rys. 1. Przebieg zakażenia wirusem polio

zajęcia nerwów czaszkowych, w wyniku czego obserwuje się porażenie mięśni oddechowych skutkujące zaburzeniami oddychania. Postać opuszkowo-rdzeniowa obejmuje zarówno rdzeń kręgowy jak i podstawę mózgu. Śmiertelność przy postaci porażennej sięga 2–5% wśród dzieci oraz 15–30% wśród osób dorosłych [5].

3. Zespoły poekspozycyjne

Po ekspozycji na kontakt z niektórymi wirusami RNA może dojść do rozwoju zespołów, których patogenезa nie jest do końca poznana. Do zespołów takich należą: zespół Guillain-Barre'a, zespół Reye'a oraz pozakaźne lub poszczepienne zapalenie mózgu. Pozakaźne i poszczepienne zapalenie mózgu może być następstwem zakażeń wirusami grypy, świnki, odry czy też różyczki [2].

Zespół Guillain-Barre'a, czyli przewlekła zapalna polineuropatia demielinizacyjna, jest rzadką chorobą demielinizacyjną nerwów obwodowych i czaszkowych, której częstość szacowana jest na 0,6 do 4 przypadków na 100 000 osób rocznie. Typowymi objawami schorzenia są ból, parastezja, osłabienie oraz niedowład kończyn, których największe nasilenie obserwowane jest w 4 tygodniu rozwoju choroby. W ciężkich przypadkach, już po 2 tygodniach można zaobserwować zanik mięśni oraz niewydolność oddechową. W 4–15% przypadków dochodzi do zgonu pacjenta, natomiast ok. 20% ozdrowieńców wykazuje lekki stopień niepełnosprawności [17]. Zespół Guillain-Barre'a może być następstwem zakażenia wirusami różyczki, świnki oraz grypy [7, 16, 29].

Zespół Reye'a to ostra encefalopatia przebiegająca z objawami niewydolności wątroby. W przebiegu tego zespołu dochodzi do hiperamonemii, hipoksji, uszkodzenia mitochondriów oraz obrzęku mózgu, który powoduje nieodwracalne deficyty neurologiczne oraz śmierć ok. 30% chorych [21]. Zespół Reye'a może być następstwem zakażenia wirusem grypy u dzieci leczonych kwasem acetylosalicylowym, dlatego też nie zaleca się podawania aspiryny małym dzieciom [29].

Zapalenie mózgu jest rzadkim, ale niebezpiecznym powikłaniem pogrypowym pojawiającym się u dzieci pomiędzy 1 a 3 rokiem życia. Do jego objawów należą wysoka gorączka sięgająca powyżej 40°C, drgawki, śpiączka, a w niektórych przypadkach zgon w ciągu 2–3 dni. Rozwój śpiączki w przeciągu 24 godzin od wystąpienia gorączki jest charakterystyczny dla 70% chorych na zapalenie mózgu będącego powikłaniem grypy. Wirus grypy typu A odpowiada także za rozwój ok. 18% przypadków ostrego, nekrotyzującego zapalenia mózgu [28]. W przebiegu zapalenia mózgu może dojść do choreoatetozy, zmian osobowości, niedowładu kurczowego oraz trwałego stanu wegetatywnego. Następstwem obrzęku mózgu może być ostre uszkodzenie mózgu oraz śmierć [26].

Komplikacją zakażenia wirusem świnki może być pozakaźne zapalenie mózgu, które rozwija się u ok. 1% osób po przechorowaniu świnki. Choroba trwa do kilku tygodni, a śmiertelność z nią związana wynosi od 1 do 5%. U około 1 na 20 000 pacjentów z zapaleniem mózgu będącego powikłaniem świnki, komplikacją może być głuchota w różnym stopniu nasilenia [16].

Pozakaźne zapalenie mózgu i rdzenia rozwija się u 1 na 10 000 zakażonych wirusem odry pacjentów, a objawy mogą ujawnić się w ciągu 5 do 14 dni po pojawieniu się wysypki. Komplikacja ta wynika najprawdopodobniej z reakcji autoimmunologicznej, a osoby chore wykazują drgawki, ataksję, zaburzenia koordynacji ruchowej oraz słuchu. W wyniku choroby obserwuje się nawet 25% śmiertelność, zaś u ozdowieńców rozwijają się zwykle poważne następstwa neurologiczne. Odrowe zapalenie mózgu (measles inclusion body encephalitis – MIBE) jest bardzo rzadką komplikacją zakażenia wirusem odry i rozwija się głównie u dzieci i dorosłych poddanych immunosupresji. Zaburzenia neurologiczne pojawiają się w ciągu 3 do 6 miesięcy po przechorowaniu odry. MIBE trwa od kilku dni do tygodnia, przejawia się drgawkami i otępieniem, a w niektórych przypadkach może powodować śpiączkę lub zgon pacjenta [32].

Zapalenie mózgu będące powikłaniem zakażenia wirusem różyczki występuje bardzo rzadko, a jego częstość występowania szacuje się na 1:6 000. Początkowe objawy zapalenia mózgu pojawiają się w ciągu 1 do 6 dni od momentu wystąpienia typowej wysypki. Objawy choroby są zwykle niespecyficzne, włączając gorączkę, ogniskowy deficyt neurologiczny, drgawki, ból głowy czy też ataksję. Przebieg choroby może być różny, aczkolwiek w 80% przypadków dochodzi do pełnego wyzdrowienia w czasie od 1 do 3 tygodni [8, 13].

4. Zakażenia przewlekłe

Zakażenia przewlekłe OUN występują bardzo rzadko, aczkolwiek są często śmiertelne. Do zakażeń przewlekłych, będących skutkiem zakażenia wirusami RNA, zaliczamy podostre stwardniające zapalenie mózgu (*subacute sclerosing panencephalitis*; SSPE), progresywne różyczkowe zapalenie mózgu (*progressive rubella panencephalitis*; PRP) oraz zespół otępienia w przebiegu zespołu nabytego niedoboru odporności (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*; AIDS).

Podostre stwardniające zapalenie mózgu jest wolno postępującą chorobą demielinizacyjną OUN, pojawiającą się zazwyczaj w ciągu 6–8 lat po zakażeniu wirusem odry. Częstość SSPE waha się od 1 na 100 000 do 1 na 1 000 000 przypadków, a do śmierci dochodzi w ciągu roku do 3 lat od zachorowania [6]. SSPE objawia się zaburzeniami procesów poznawczych, zaburzeniami osobowości, niedowładami oraz drgawkami. Choroba

Tabela III
Stadia kliniczne podostrego stwardniającego zapalenia mózgu

Stadium choroby	Objawy kliniczne
I	Zmiany osobowości, zmiany behawioralne
II	Intensywne, nawracające napady miokloniczne, drgawki, demencja
III	Objawy pozapiramidowe, zaburzenia umysłowe
IV	Śpiączka, przejście w stan wegetacji, mutyzm akinetyczny

ta rozwija się częściej u mężczyzn i obejmuje kilka stadiów, począwszy od zmian zachowania, przez zaburzenia umysłowe po śpiączkę lub mutyzm kinetyczny (Tab. III). Dokładna patogenezę choroby nie została jak dotąd poznana [14]. Choroba ta może rozwinąć się u dzieci matek zakażonych wirusem odry w trakcie ciąży, a okres inkubacji jest w tych przypadkach zdecydowanie krótszy [3].

Progresywne różyczkowe zapalenie mózgu jest wolno postępującą, śmiertelną chorobą OUN, która może pojawić się zarówno u dzieci z zespołem różyczki wrodzonej jak i po przebyciu różyczki zakaźnej. Zaburzenia neurologiczne takie jak demencja czy też zaburzenia chodu pojawiają się w drugiej dekadzie życia i w przeciągu 2 do 5 lat prowadzą do śmierci w wyniku udaru mózgu [31].

Otępienie związane z zakażeniem OUN ludzkim wirusem niedoboru odporności (*Human Immunodeficiency Virus*; HIV) jest schorzeniem bez zmian ogniskowych, będącym wynikiem rozlanego uszkodzenia mózgu. Zespół otępienia w przebiegu AIDS (*AIDS-dementia complex*; ADC) zdiagnozować można jako nabyte upośledzenie minimum dwóch funkcji poznawczych połączonych z zaburzeniami funkcji motorycznych lub motywacyjnych czy też kontroli emocjonalnej. Dane epidemiologiczne potwierdzają, że ryzyko rozwoju HAD zwiększa się wraz z wiekiem osób zakażonych. Wskaźnik relatywnego ryzyka rozwoju HAD wzrasta o 1,60 na dekadę życia od momentu zapoczątkowania AIDS. Występowanie u pacjentów starszych chorób współistniejących, głównie zaburzeń neurodegeneracyjnych, zmniejsza możliwość identyfikacji HAD [30].

5. Podsumowanie

Wirusy RNA powodują szereg zakażeń ośrodkowego układu nerwowego, które można podzielić na trzy grupy. Wśród zakażeń ostrych wyróżniamy zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu zapalenie mózgu oraz *polyimelitis*. Zakażenia te wywoływane są przez szereg wirusów należących do różnych rodzin, aczkolwiek najczęstszymi czynnikami etiologicznymi zakażeń ostrych

są entero- oraz flawiwirusy. W wyniku kontaktu z niektórymi wirusami RNA może dojść do rozwoju zespołów poeksozyzyjnych takich jak zespół Guillain-Barre'a, zespół Reye'a czy też pozakaźnych lub poszczepiennych zapaleń mózgu. Zespoły te są zwykle następstwami zakażeń wirusami RNA wywołującymi grypę oraz choroby wieku dziecięcego, takie jak świnka, różyczka czy też odra. Trzecią, najrzadziej występującą grupą zakażeń są zakażenia przewlekłe takie jak podostre stwardniające zapalenie mózgu, progresywne różyczkowe zapalenie mózgu oraz zespół otępienia w przebiegu AIDS. Wiele tych zakażeń może mieć ciężki przebieg, a nawet powodować nawet zgon pacjenta. Wobec tego niezmiernie ważna jest szybka diagnostyka, profilaktyka oraz prawidłowa terapia zakażeń ośrodkowego układu nerwowego wywołanych wirusami RNA, aczkolwiek jest to temat bardzo szeroki, wykraczający poza ramy tego artykułu.

Piśmiennictwo

1. Chadwick D.R.: Viral meningitis. *Br. Med. Bull.* **75–76**, 1–14 (2006)
2. Collier L., Oxford J.: Human virology: a text for students of medicine, dentistry, and microbiology, 3rd ed. Oxford: Oxford University Press; 2006, s. 223–228
3. Dasopoulou M., Covanis A.: Subacute sclerosing panencephalitis after intrauterine infection. *Acta Paediatr.* **53**, 1251–1253 (2004)
4. Davis L.E., DeBiasi R., Goade D.E., Haaland K.Y., Harrington J.A., Harnar J.B., Pergam S.A., King M.K., DeMasters B.K., Tyler K.L.: West Nile virus neuroinvasive disease. *Ann. Neurol.* **60**, 286–300 (2006)
5. De Jesus N.H.: Epidemics to eradication: the modern history of poliomyelitis. *Virol. J.* **4**, 70 (2007)
6. Ferrari S., Toniolo A., Monaco S., Luciani F., Cainelli F., Baj A., Temesgen Z., Vento S.: Viral Encephalitis: Etiology, Clinical Features, Diagnosis and Management. *Open. Infect. Dis. J.* **3**, 1–12 (2009)
7. Feuer R., Ruller C.M., An N., Tabor-Godwin J.M., Rhoades R.E., Maciejewski S., Pagarigan R.R., Cornell C.T., Crocker S.J., Kiosses W.B., Pham-Mitchell N., Campbell I.L., Whitton J.L.: Viral persistence and chronic immunopathology in the adult central nervous system following Coxsackievirus infection during the neonatal period. *J. Virol.* **83**, 9356–9369 (2009)
8. Figueiredo C.A., Oliveira M.I., Afonso A.M., Curti S.P., Durigon E.L.: Rubella encephalitis in a young adult male: isolation and genotype analysis. *Infection*, **39**, 73–75 (2011)
9. Garg R.K.: Subacute sclerosing panencephalitis. *J. Neurol.* **255**, 1861–1871 (2008)
10. Ghosh D., Basu A.: Japanese encephalitis – a pathological and clinical perspective. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3**, e437 (2009)
11. Gould E.A., Solomon T.: Pathogenic flaviviruses. *Lancet*, **371**, 500–509 (2008)
12. Gritsun T.S., Lashkevich V.A., Gould E.A.: Tick-borne encephalitis. *Antiviral. Res.* **57**, 129–146 (2003)
13. Guler E., Davutoglu M., Guler S., Citirik D., Karabiber H.: Encephalitis in a Child during Atypical Course of Rubella. *Infection*, **37**, 65–66 (2009)
14. Gutierrez J., Issacson R.S., Koppel B.S.: Subacute sclerosing panencephalitis: an update. *Dev. Med. Child. Neurol.* **52**, 901–907 (2010)

15. Hankins D.G., Rosekrans J.A.: Overview, prevention, and treatment of rabies. *Mayo. Clin. Proc.* **79**, 671–676 (2004)
16. Hviid A., Rubin S., Mühlemann K.: Mumps, *Lancet*, **371**, 932–944 (2008)
17. Israeli E., Agmon-Levin N., Blank M., Chapman J., Shoenfeld Y.: Guillain-Barré syndrome: a classical autoimmune disease triggered by infection or vaccination. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **42**, 121–130 (2012)
18. Jackson A.C.: Why does the prognosis remain so poor in human rabies? *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* **8**, 623–625 (2010)
19. Kondrusik M., Hermanowska-Szpakowicz H.: Kleszczowe zapalenie mózgu – aspekty patogenetyczne, kliniczne oraz powikłania. *Neurologia i Neurochirurgia Polska*, **38**, 67–70 (2004)
20. Kumar A., Shukla D., Kumar R., Idris M.Z., Jauhari P., Srivastava S., Dhole T.N.: Molecular identification of enteroviruses associated with aseptic meningitis in children from India, *Arch. Virol.* **58**, 211–215 (2013)
21. Mizuguchi M., Yamanouchi H., Ichiyama T., Shiomi M.: Acute encephalopathy associated with influenza and other viral infections. *Acta Neurol. Scand.* **115**, 45–56 (2007)
22. Mueller S., Wimmer E., Cello J.: Poliovirus and poliomyelitis: a tale of guts, brains, and an accidental event. *Virus Res.* **111**, 175–193 (2005)
23. Patriquin G., Hatchette J., Forward K.: Clinical presentation of patients with aseptic meningitis, factors influencing treatment and hospitalization, and consequences of enterovirus cerebrospinal fluid polymerase chain reaction testing. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **23**, 1–5 (2012)
24. Solomon T., Mallewa M.: Dengue and other emerging flaviviruses. *J. Infect.* **42**, 104–115 (2001)
25. Solomon T.: Exotic and emerging viral encephalitis. *Curr. Opin. Neurol.* **16**, 411–418 (2003)
26. Studahl M.: Influenza virus and CNS manifestations. *J. Clin. Virol.* **28**, 225–232 (2003)
27. Studahl M., Lindquist L., Eriksson B.M., Günther G., Bengner M., Franzen-Röhl E., Fohlman J., Bergström T., Aurelius E.: Acute viral infections of the central nervous system in immunocompetent adults: diagnosis and management. *Drugs*, **73**, 131–58 (2013)
28. Sugaya N.: Influenza-associated encephalopathy in Japan. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* **13**, 79–84, (2002)
29. Toovey S.: Influenza-associated central nervous system dysfunction: a literature review. *Travel. Med. Infect. Dis.* **6**, 114–124 (2008)
30. Valcour V., Paul R.: HIV infection and dementia in older adults. *Clin. Infect. Dis.* **42**, 1449–454 (2006)
31. Wolinsky J.S., Dau P.C., Buimovici-Klein E., Mednick J., Berg B.O., Lang P.B., Cooper L.Z.: Progressive rubella panencephalitis: immunovirological studies and results of isoprinosine therapy. *Clin. Exp. Immunol.* **35**, 397–404 (1979)
32. Young V.A., Rall G.F.: Making it to the synapse: Measles virus spread in and among neurons. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **330**, 3–30 (2009)

UDZIAŁ LUDZKIEGO CYTOMEGALOWIRUSA W MECHANIZMACH KARCYNogenezy GLEJAKA WIELOPOSTACIOWEGO

Michał Wiciński^{1*}, Paulina Sopońska¹, Bartosz Brzozczyk¹, Bartosz Malinowski¹,
Agnieszka Michalska², Elżbieta Grześk¹, Katarzyna Szadujkis-Szadurska¹,
Tomasz Kornatowski¹, Anna Czeczuk³, Grześk Grzegorz¹

¹ Katedra i Zakład Farmakologii i Terapii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

² Katedra Anatomii i Fizjologii. Akademia Wychowania Fizycznego im. Józefa Piłsudskiego w Warszawie,
Wydział Wychowania Fizycznego i Sportu w Białej Podlaskiej

³ Katedra Wychowania Fizycznego, Zakład Edukacji Zdrowotnej, Akademia Wychowania Fizycznego im. Józefa Piłsudskiego
w Warszawie. Wydział Wychowania Fizycznego i Sportu w Białej Podlaskiej

Wpłynęło w sierpniu 2012r.

1. Wprowadzenie. 2. Budowa HCMV. 3. Charakterystyka glejaka wielopostaciowego. 4. HCMV w etiopatogenezie glejaka wielopostaciowego. 4.1. Inicjacja nowotworzenia. 4.2. Inwazyjność. 4.3. Angiogeneza. 4.4. Immunomodulacja. 4.5. Nowe koncepcje. 5. Podsumowanie

The role of human cytomegalovirus in the mechanisms of glioblastoma multiforme carcinogenesis

Abstract: Human cytomegalovirus (HCMV), a common bethaherpesvirus, usually causes asymptomatic recurrent infections in non-immunocompetent patients. Glioblastoma multiforme is the most common primary brain tumor, which etiopathology is unknown. Numerous studies implicate the role of HCMV in the oncogenesis of glioma by modulating signaling pathways. HCMV can modify the transcription of oncogenes such as Rb, p53 and STAT3; stimulate the mobility of glioma cells; induce angiogenesis and evade host immune response. This review aims to highlight the role of HCMV in the modulation of critical signaling pathway in glioblastoma growth.

1. Introduction. 2. HCMV structure. 3. Characteristics of glioblastoma multiforme. 4. Role of HCMV in etiopathogenesis of glioblastoma multiforme. 4.1. Initiation. 4.2. Invasion. 4.3. Angiogenesis. 4.4. Immunomodulation. 4.5. New concepts. 5. Summary

Słowo kluczowe: glejak wielopostaciowy, glejaki, HCMV, ludzki cytomegalowirus
Key words: glioblastoma multiforme, HCMV, Human Cytomegalo Virus

1. Wprowadzenie

Ludzki cytomegalowirus (HCMV – Human Cytomegalo Virus), niekiedy określany jako ludzki Herpesvirus-5 (Human herpesvirus 5 – HHV-5), należy do rodziny *Herpesviridae* i podrodziny *Betaherpesviridae*. HCMV stanowi powszechny czynnik infekcyjny, występujący endemicznie w wielu regionach świata [58]. W badaniach epidemiologicznych przeprowadzonych w Polsce stwierdzono obecność przeciwciał klasy IgG, świadczących o przebytych zakażeniach u 76,7% badanych kobiet ciężarnych, natomiast przeciwciał klasy IgM, przemawiających za aktywnym zakażeniem, u 13% przebadanych kobiet [24]. Porównywalną seroprevalencję uzyskano w badaniach przeprowadzonych w innych krajach (Sudan: IgG – 72,2%, IgM – 2,5% [26]; Stany Zjednoczone: IgG – 31–70% – różna częstość w zależności od rasy [56]; Egipt: IgG – 97,1% IgM – 0,6%; Wielka Brytania: IgG – 50,1%, IgM – 0,3% [50]). Metanaliza obejmująca badania epidemiologiczne 27 populacji z całego świata wykazała występowanie wrodzonego

zakażenia wirusem HCMV u 0,64% żywo urodzonych dzieci, natomiast zakażenia objawowego u 0,07% badanej grupy [30].

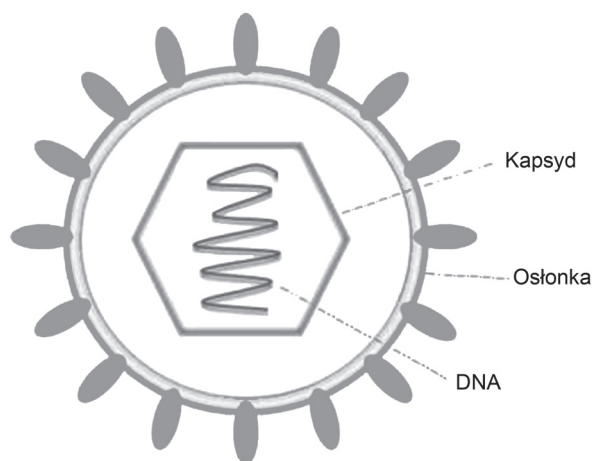
U immunokompetentnych osób dorosłych zakażenie HCMV przebiega zazwyczaj bezobjawowo [33]. Infekcja HCMV ma jednak krytyczne znaczenie u pacjentów poddanych immunosupresji, u których może dochodzić do reaktywacji infekcji. W tej grupie pacjentów stwierdza się wyższą śmiertelność wynikającą z powikłań wielonarządowych w przebiegu współistniejącego aktywnego zakażenia HCMV [28]. Drugą grupą w sposób szczególny zagrożoną zakażeniem HCMV są noworodki, u których w przypadku zakażenia wrodzonego stwierdza się poważne, z reguły nieodwracalne, zaburzenia w zakresie rozwoju ośrodkowego układu nerwowego (OUN), takie jak upośledzenie umysłowe, porażenie mózgowe, czy ubytek słuchu [13], innymi częstymi objawami są: trombocytopenia, zwykle współistniejąca z wybroczynami, wewnątrzmaciczne zahamowanie wzrostu (IUGR), hepatosplenomegalia, żółtaczka, utrata słuchu, mikrocefalia, zapalenie naczyń i siatkówki,

* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Farmakologii i Terapii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Marii Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz, tel.: (052) 585-35-86, faks: (052) 585-40-23, e-mail: wicinski4@wp.pl

zwapnienia wewnątrzmożgowe [1, 14]. HCMV wykazuje szczególne powinowactwo do gruczołów ślinowych [33], ponadto wykazuje silny neurotropizm, ze szczególnym powinowactwem do komórek endotelium małych naczyń, astrocytów, neuronów, komórek oligodendrogleju, mikrogleju oraz komórek progenitorowych [13].

2. Budowa HCMV

Wirion HCMV zbudowany jest z izosahedralnego kapsydu o średnicy 100 nm, zawierającego genom pod postacią dwuniciowego DNA zawierającego 230 kbp [5, 33, 58], kodującego przez ponad 145 unikalnych genów i ponad 200 ramek odczytu (*open frames*) [5, 63]. Kapsyd HCMV otoczony jest przez warstwę białkową (tegument), pokrytą dwuwarstwową osłonką (envelope) zbudowaną z lipidów i wirusowych glikoprotein [5, 33, 59] (Rys. 1).



Rys. 1. Struktura wirionu HCMV – objaśnienia w tekście

Genom HCMV koduje białka o masie molekularnej mieszczącej się w przedziale od 8,5 do 200 kDa [63], budujących kapsyd, warstwę białkową i osłonkę wirionu [8, 63]. Około 40% masy wirionu stanowi warstwa białkowa [63], będąca amorficzną strukturą łączącą osłonkę i kapsyd [8]. Białka tej warstwy kodowane są przez co najmniej 30 genów (UL24, UL25, UL26, UL32, UL43, UL47, UL48, UL82, UL83, UL94, UL99, US22, US23, US24, UL44, UL45, UL54, UL57, UL69, UL72, UL84, UL89, UL97, UL122, UL35, UL51, UL71, UL79, UL88, UL96, UL103, UL104 oraz UL112), ich obecność stwierdzono zarówno w jądrze, jak i w cytoplazmie, zainfekowanych komórek [59]. Amorficzna warstwa białkowa pełni rolę inicjacji infekcji, modulacji metabolizmu komórek gospodarza, regulacji ekspresji genów wirusa, jest pomocna w transporcie nowo syntetyzowanych białek wirusa przez błonę jądrową, w kontroli upakowania wirusowego DNA jak i dojrzewania wirionów [63]. Kapsyd HCMV, strukturalnie przypominający kapsyd wirusa

opryszczki pospolitej typu 1 (Herpes simplex virus type 1 – HSV-1) i wirusa Kaposiego (Human herpesvirus 8 – HHV-8), jest zbudowany z 5 białek kodowanych przez geny: UL86, UL85, UL80, UL48.5, and UL46 [59, 63]. Osłonkę stanowią glikoproteiny: B, H, L, M, N, O, homologicznych do spotykanych w innych *Herpesviridae*, oraz swoistych dla HCMV glikoprotein: TRL 10, TRL 11 i UL132 [8], a także do białek kodowanych przez geny: RL10, UL5, UL22A (nazywana również UL21.5), UL33, UL38, UL41A, UL50, UL55, UL73, UL74, UL75, UL77, UL93, UL100, UL115, UL119, UL132, oraz US27 [59].

W zależności od etapu cyklu replikacyjnego, w którym dochodzi do ekspresji, białka kodowane przez genom HCMV dzieli się na 3 grupy kinetyczne: białka natychmiastowe wczesne (*immediate-early* – IE) potrzebne w okresie replikacji; białka wczesne (*early* – E) i białka późne (*late* – L), stanowiące strukturalne komponenty wirusa [3, 12, 53]. Ponadto HCMV wykazuje ekspresję szeregu receptorów dla chemokin: US28, US27, UL33 oraz UL78, funkcja US28 jest dotychczas najlepiej poznana, pozostałe trzy receptory prawdopodobnie modulują działanie US28 [60].

3. Charakterystyka glejaka wielopostaciowego

Nowotwory ośrodkowego układu nerwowego stanowią 1,7% wszystkich nowotworów spotykanych u ludzi, cechują się wzrastającą częstością występowania na przestrzeni ostatnich lat [10]. Dotychczas najlepiej udokumentowany związek z zakażeniem HCMV wykazuje glejak wielopostaciowy (glioblastoma multiforme) wraz z innymi glejakami pochodzenia astrocytarnego o niższym stopniu złośliwości histologicznej, pojawiają się jednak sugestie, że HCMV może odgrywać rolę również w etiopatogenezie rdzeniaków [4]. Wśród nowotworów glejowych w zależności od pochodzenia i budowy komórek nowotworowych wyróżniono gwiaździki (astrocytoma) wywodzące się z astrocytów, skąpodrzewiaki (oligodendroglioma) wywodzące się z oligodendrocytów oraz wyściółczaki (ependymoma) wywodzące się z komórek ependymy [19]. W klasyfikacji złośliwości według WHO glejaki uszeregowano w czterostopniowej skali (grade I–IV) uwzględniającej stopień anaplazji oraz indeks mitotyczny [38]. Najczęstszym nowotworem glejowym u dorosłych jest glejak wielopostaciowy wykazujący wysoki stopień złośliwości histologicznej (IV grade) [19], natomiast u dzieci częściej spotykane są gwiaździki o niskim stopniu złośliwości (I–II) [23, 43].

Glejaka wielopostaciowego klinicznie można podzielić na dwa podtypy: pierwotny i wtórny. Pierwotny glejak wielopostaciowy rozwija się *de novo*, natomiast typ wtórny powstaje na podłożu gwiaździków o niższym stopniu złośliwości histologicznej (I–III) [22]. Różnicowanie glejaka wielopostaciowego na podtypy nie ma

znaczenia klinicznego i prognostycznego, istotne są jednak różnice w jego molekularnej patogenezie [22]. Glejak wielopostaciowy charakteryzuje się wysoką śmiertelnością, średni czas przeżycia nieznacznie przekracza rok [29]. Najsilniejszym czynnikiem ryzyka wystąpienia glejaka wielopostaciowego jest ekspozycja głowy oraz szyi na promieniowanie jonizujące [43, 54]. Natomiast ryzyko nowotworzenia mniejsze niż populacyjne obserwuje się u pacjentów z alergiami, ta zależność prawdopodobnie wynika z immunologicznego podłoża glejaka wielopostaciowego [43, 54].

4. HCMV w etiopatogenezie glejaka wielopostaciowego

Stwierdzenie cech przewlekłego zapalenia w etiopatogenezie gwiżdżaków, w tym glejaka wielopostaciowego zapoczątkowały poszukiwania jego związku z czynnikami infekcyjnymi [18]. HCMV jest prawdopodobnie czynnikiem sprawczym nowotworów OUN przez wzgląd na częstość występowania i zdolność do zakażenia OUN. W pierwszym, przeprowadzonym w 2002 r. badaniu nad potencjalnym związkiem między przewlekłym zakażeniem HCMV a pierwotną transformacją nowotworową w obrębie OUN, stwierdzono obecność HCMV we wszystkich przebadanych wycinkach pobranych od pacjentów z glejakami o różnych stopniach złośliwości histologicznej (grade II–IV). Pobrany materiał pochodzący z badań autopsyjnych od immunokompetentnych pacjentów przebadano metodą immunohistochemiczną przeciwko białku IE-72. Badania tą samą metodą przeprowadzone na próbkach od tych samych pacjentów, ale z obszarów mózgu nie zajętych procesem nowotworowym wypadły ujemnie, nie stwierdzono także HCMV u pacjentów z oponiakiem, chorobą Alzheimera, udarem mózgu, zapaleniem mózgu oraz u osób zdrowych [16].

Od czasu tego pionierskiego badania o zdolnościach immunomodulacyjnych HCMV wiadomo znacznie więcej [3]. Infekcję HCMV stwierdza się, w zależności od zastosowanej metody, nawet w 80–100% przypadków glejaka wielopostaciowego, przy czym większą czułością cechuje się badanie immunohistochemiczne białek w preparacie histologicznym nad oznaczaniem DNA HCMV metodą PCR we krwi obwodowej [41, 47, 52]. Obecność HCMV stwierdza się również w postaciach gwiżdżaków o niższym stopniu złośliwości (grade II–III) [52].

Mniejsza liczba zainfekowanych przez HCMV komórek w obrębie glejaka wielopostaciowego koreluje z dłuższym przeżyciem pacjenta. Stwierdzenie obecności białek HCMV w mniej niż połowie komórek nowotworowych oznacza wyższe szanse długoletniego przeżycia pacjenta (powyżej 18 miesięcy) [47]. Tę obserwację

można wytłumaczyć jako zdolność HCMV do udziału w licznych molekularnych szlakach nowotworzenia, m.in. w inwazji, mitogenezie, angiogenezie i immunomodulacji [18].

4.1. Inicjacja nowotworzenia

HCMV wpływa na inicjację nowotworzenia poprzez modyfikację ekspresji protoonkogenów: STAT3, RAS, p53; modulacji szlaku PI-3K, stymulację PDGFR oraz indukcję HTERT. Protoonkogeny Rb i p53 są najważniejszymi genami regulatorowymi związanymi z patogenezą glejaków [22]. W normalnych komórkach geny p53 i pośrednio Rb odpowiadają za utrzymywanie komórek z uszkodzeniami w obrębie DNA w wydłużonej fazie G1 cyklu komórkowego, co umożliwia wdrożenie procesów naprawczych [3]. Mutacja genu Rb jest równie częsta w pierwotnym i wtórnym typie glejaka wielopostaciowego, natomiast mutacja p53 odgrywa większą rolę w patogenezie podtypu wtórnego [22]. HCMV moduluje działanie genów p53 i Rb poprzez białko IE-1, które inaktywuje białka supresorowe p53 i Rb [17, 18]. Działanie białka IE-1 powoduje zatem przewlekłą fosforylację Rb, co umożliwia komórkom z uszkodzeniami DNA przejście z fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego [17]. Drugim, niezależnym mechanizmem aktywacji Rb, jest aktywacja szlaku PI-3K z udziałem kinazy Akt [17].

Szlak 3-kinazy fosfatydylinozytolu (phosphatidylinositol-3 kinase – PI-3K) jest stymulowany za pośrednictwem wzmożonej aktywacji kinazy Akt. HCMV wykazuje zdolność do modulowania kinazy Akt za pośrednictwem białka IE-1 [17]. Nadmierna aktywacja szlaku PI3K z udziałem kinazy Akt uczestniczy w patogenezie licznych nowotworów, stanowiąc jeden z elementów inicjacji nowotworzenia poprzez hamowanie apoptozy, promowanie odpowiednich zmian w metabolizmie i proliferacji komórek, regulowanie ich zdolności do migracji i inwazji, a także modulację angiogenezy nowotworów [32].

Kolejnym etapem nowotworzenia modyfikowanym przez HCMV są szlaki wyzwalające proliferację komórek. W patogenezie glejaka wielopostaciowego, rzadziej w glejakach o niższym stopniu złośliwości, obserwuje się modyfikacje na szczeblu działania receptorów kinazy tyrozynowej: nabłonkowego czynnika wzrostu (epidermal growth factor receptor – EGFR) i płytkowego czynnika wzrostu (platelet-derived growth factor receptor – PDGFR) [22]. Jednak nadmierna aktywacja PDGF i EGF stanowi jedynie podłoże przyspieszające przebieg toczących się procesów nowotworzenia, a nie inicjujące tych procesów [21]. Zarówno PDGF, jak i EGF, odpowiadają za stymulację nerwowych komórek macierzystych do samoodnowy oraz różnicowania w kierunku neuronów, astrocytów i oligodendrocytów [3]. PDGFR pełni także kluczową rolę we wnikanii

wirionów HCMV do komórek [18] – selektywna blokada receptorów PDGF hamuje ekspresję białka IE1, [55]. W przebiegu zakażenia HCMV PDGFR jest stymulowane przez glikoproteinę B osłonki, która przyłączając się do receptora, pełni funkcję aktywacji szlaku PI-3K [18]. Natomiast EGFR nie bierze udziału w początkowym etapie infekcji HCMV [17].

Produkty genów HCMV promują transkrypcję protoonkogenu STAT3 – przetwornika sygnałów i aktywatora transkrypcji (signal transducers and activators of transcription – STAT). W normalnych komórkach STAT3 pełni funkcję regulatora komórkowych procesów proliferacji, różnicowania, apoptozy i wzrostu [45]. Jednak jego konstytutywna aktywacja sprzyja transformacji nowotworowej. Częsteczką kodowaną przez geny HCMV bezpośrednio związaną z aktywacją STAT3 jest receptor dla chemokin US28 [18]. Klinicznie zwiększona ekspresja STAT3 koreluje z wyższym stopniem złośliwości histologicznej [64] oraz gorszym rokowaniem [37].

Dodatkowym czynnikiem sprzyjającym transformacji nowotworowej jest konstytutywna indukcja odwrotnej transkryptazy telomerazy (human telomerase reverse transcriptase – hTERT), wywołana przez ekspresję białka IE1. Zwiększona aktywność tego enzymu obserwowana w zainfekowanych komórkach glejaka wielopostaciowego, nadaje im cechy „nieśmiertelności” [3, 18, 57].

4.2. Inwazyjność

Najważniejsze ścieżki sygnałowe wywołujące inwazyjność – migrację glejaków, obejmują aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (nuclear factor κ B) oraz kinaz tyrozynowych niereceptorowych FAK i Pyk-2 [21]. Zaobserwowano, że krótkotrwała ekspozycja komórek na HCMV powoduje aktywację fosfolipazy C oraz FAK, natomiast przewlekłe zakażenie promuje migrację glejowych komórek nowotworowych [17].

Transkrypcyjny czynnik jądrowego κ B (NF κ B) oraz czynnik transkrypcyjny AP-1 stanowią dwie ścieżki sygnalizacyjne wzajemnie powiązane na wielu etapach funkcjonowania [61]. Oba te szlaki pełnią podobne funkcje regulacyjne wielu genów, odpowiedzialnych m.in. za proliferację, różnicowanie, apoptozę, odpowiedź immunologiczną i onkogenezę [27, 61].

Aktywacja NF κ B zachodzi poprzez fosfolipazę C aktywowaną przez receptor dla chemokin US28 kodowany przez genom HCMV [60]. Natomiast AP-1 jest aktywowane przez dwa białka: IE-1 oraz IE-2, stymulujące składowe tego kompleksu białka c-Fos i c-Jun, kodowane przez protoonkogeny c-fos i c-jun [27]. Do modulacji AP-1 dochodzi dwuetapowo, początkowo HCMV powoduje nagły wzrost ekspresji białek c-Jun i c-Fos, w późniejszym etapie infekcji następuje ponowny wzrost ekspresji c-Fos [25, 27].

Fosforylowana przez HCMV kinaza ogniskowo-adhezyjna (focal adhesion kinaze – FAK) wykazuje związek z zależną od integryn ruchliwością komórek glejowych (integrin-dependent glioma cell motility). Ponadto kinaza FAK łącznie z opisaną wcześniej PI3K aktywowaną kinazą Akt tworzy szlak sygnalizacyjny dla haptotaktycznej migracji komórek glejowych. Szlaki te wykazują jednak selekcję względem komórek nowotworowych, podczas gdy normalne astrocycy nie wykazują zdolności do ruchliwości pod wpływem HCMV [17].

4.3. Angiogeneza

HCMV stymuluje angiogenezę na czterech etapach: promocji, degradacji błony podstawnej, migracji komórek oraz formowania i stabilizacji nowych naczyń [11]. Inicjacja angiogenezy z udziałem HCMV zachodzi za pośrednictwem licznych czynników aktywujących komórki śródbłonna, wśród których największą rolę odgrywają interleukina 6 (IL-6) oraz czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (vascular endothelial growth factor – VEGF) wydzielane przez zainfekowane komórki śródbłonna [11]. VEGF jest krytycznym regulatorem angiogenezy w przebiegu glejaka wielopostaciowego, który na tle innych glejaków pochodzenia astrocytarnego wyróżnia się wyjątkowo rozbudowanym unaczynieniem [31]. HCMV moduluje ekspresję VEGF za pośrednictwem receptora dla chemokin US28 [11, 18]. Natomiast IL-6 jest jedną z cytokin działających anty-apoptotycznie na komórki śródbłonna, kierującą prawidłowe procesy naprawcze w przebiegu odpowiedzi na uszkodzenie, w kierunku patologicznych procesów neoangiogenezy [7].

Następnym etapem angiogenezy po inicjacji jest niszczenie błony podstawnej. HCMV przyczynia się do tego procesu w dwojaki sposób, po pierwsze zmniejszając syntezę macierzy zewnątrzkomórkowej, a po drugie zwiększając jej degradację. Do utraty włókien kolagenowych typu 1 i fibronektyny w obrębie ściany naczyń dochodzi poprzez degradację indukowaną działaniem m.in. metaloproteinazy 2 macierzy zewnątrzkomórkowej [48]. Migrację komórek w obręb tkanek, obserwowaną w kolejnym etapie angiogenezy, stymulują chemokiny, m.in. kodowane przez HCMV CC-chemokina: UL128 oraz dwie CXC-chemokiny: UL146 i UL147. Opisywany wcześniej receptor dla chemokin US28 również posiada zdolność chemotaksji komórek mięśni gładkich i makrofagów, w działaniu US28 pośredniczy bogata w prolinę kinaza tyrozynowa Pyk2 [62]. W ostatnim etapie angiogenezy dochodzi do formowania tubularnych naczyń i stabilizacji ich struktury, w tej fazie istotną rolę odgrywa PDGF, którego działanie, jak opisano wcześniej, jest również modyfikowane przez HCMV [11].

Ponadto HCMV za pośrednictwem białka IE-1 wykazuje zdolność do zmniejszania ekspresji cząsteczek

trombospondyny-1 (TSP-1) [15, 18]. Funkcją TSP-1 jest hamowanie angiogenezy poprzez zablokowanie migracji i przylegania komórek śródbłonna oraz indukcję apoptozy tych komórek. Obniżona ekspresja TSP-1 obserwowana w zakażeniu HCMV sprzyja angiogenezie [3]. TSP-1 nie stanowi jednak istotnego markera angiogenezy w przebiegu glejaka wielopostaciowego [49].

4.4. Immunomodulacja

HCMV wywołuje działanie immunosupresyjne, hamując prawidłowe odpowiedzi immunologiczne gospodarza. Jeden z mechanizmów uczestniczący w tym procesie polega na blokadzie na powierzchni zainfekowanych komórek antygenów MHC klasy I oraz II, koniecznych to odpowiedzi cytotoksycznej zależnej od limfocytów CD8+ i komórek NK [18, 51, 65]. Zaburzenia ekspresji HLA klasy I oraz towarzyszące im nieprawidłowe działanie limfocytów T obserwuje się w patogenezie wielu nowotworów [9]. Zmniejszenie ekspresji (down-regulating) antygenów MHC klasy I zachodzi między innymi pod wpływem działania wirusowych białek HCMV: US2-US6 i US11, które oddziałują na antygeny HLA-A i HLA-B [51, 65], w mniejszym stopniu białka te blokują antygeny MHC klasy II [51]. Równoczesna obecność białek US2 i US3 przyspiesza blokowanie antygenów MHC klasy I, co jest szczególnie istotne w początkowej fazie infekcji – krytycznym okresie dla replikacji i proliferacji wirusa [42]. Ekspozycja na decytabinę, bądź interferon-gamma zwiększa ekspresję cząsteczek MHC klasy I oraz II, przez co sprzyja rozpoznawaniu i niszczeniu komórek nowotworowych przez specyficzne limfocyty T, ma to istotne implikacje terapeutyczne [39].

Innym mechanizmem unieczynnienia funkcji prezentacji antygenów przez komórki dendrytyczne jest działanie produktów genu UL111A strukturalnie zbliżonego do interleukiny 10 (IL-10) [18, 36]. Prawidłowo IL-10 reguluje dojrzewanie i funkcje efektorowe komórek dendrytycznych, a także hamuje wydzielanie cytokin prozapalnych i molekuł kostymulacyjnych, co w rezultacie zaburza stymulację limfocytów T [6], w zakażeniu HCMV funkcje te nasila ekspresja UL111A.

HCMV, podobnie, jak wirus opryszczki pospolitej typu 1, wirus opryszczki pospolitej typu 2, mysi wirus cytomegalii oraz wirus ospy wietrznej i półpaśca, wykazuje ekspresję receptorów Fcγ (FcγR). Prawidłową funkcją cząsteczki FcγR jest łączenie się z odpowiednim regionem IgG oraz wtórnie indukcja neutralizacji wolnych wirionów na drodze fagocytozy i cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity – ADCC) [35, 40]. Ekspresję glikoprotein pełniących funkcję receptorów Fcγ, kodowanych przez ramki odczytu TRL11/IRL11 oraz UL119-UL118, obserwuje się na powierzchni zainfekowanych

komórek. W tym mechanizmie do zakażonych komórek mogą przyłączać się wszystkie subklasy IgG, wówczas dochodzi do upośledzenia odporności humoralnej [35, 44].

4.5. Nowe koncepcje

Mimo tak rozbudowanych mechanizmów HCMV zaangażowanych w nowotworzenie, nie u wszystkich pacjentów z HCMV rozwijają się glejaki wielopostaciowe. Próbuje się to tłumaczyć różną wrażliwością gospodarza na działanie HCMV. Jedną z proponowanych hipotez uwzględnia mechanizm kodowania przez HCMV receptorów Fcγ. W związku z heterogennością alleli kodujących ludzkie immunoglobuliny obserwuje się różne powinowactwo FcγR do immunoglobulin kodowanych przez określone determinanty genowe [44]. Potwierdzono dotychczas, że wadliwy łańcuch A antygeny MHC klasy I (MHC class I-related chains A – MICA) obserwowany w niektórych populacjach fibroblastów nie ulega mechanizmowi down-regulating pod wpływem infekcji HCMV, co pozwala uniknąć tym komórkom upośledzenia reakcji immunologicznych [65]. Być może podobnym sposobem niektórym populacjom komórkowym udaje się uniknąć upośledzenia odporności wywołanego działaniem HCMV.

Według alternatywnej hipotezy rozwinięcie się glejaka wielopostaciowego na podłożu infekcji HCMV zależy od wieku, w którym dochodzi do zakażenia. Autor tej koncepcji przywołuje podobny przebieg zachorowań w przypadku wirusa Polio, zakażenie we wczesnym dzieciństwie miałoby chronić przed rozwojem nowotworu glejowego, natomiast infekcja w późniejszym okresie dzieciństwa, bądź też w wieku dorosłym, miałyby stanowić istotny czynnik ryzyka rozwoju glejaka wielopostaciowego [34].

HCMV jest kandydatem do potencjalnej szczepionki zapobiegającej rozwojowi glejaka wielopostaciowego [20]. Pojawiły się już próby zastosowania w terapii adjuwantowej autologicznej szczepionki przeciwko komórkom dendrytycznym zakażonych wirusem HCMV, celem tej terapii jest stymulacja swoistej odpowiedzi limfocytów CD8+, obecnie trwają badania II fazy nad tą szczepionką [2, 46].

5. Podsumowanie

Ludzki cytomegalowirus jest powszechnie występującym czynnikiem infekcyjnym, którego zakażenie przebiega zazwyczaj bezobjawowo. Doniesienia ostatnich lat wskazują na jego ścisły związek z patogenezą glejaka wielopostaciowego i innych nowotworów glejowych. HCMV wykazuje zdolność do modulowania licznych molekularnych szlaków sygnalizacyjnych,

dzięki czemu może przyczyniać się do różnych etapów nowotworzenia, tj. inwazji, mitogenezy, angiogenezy i immunomodulacji. Mimo wciąż nie w pełni wyjaśnionej roli HCMV w patogenezie nowotworów, poznawanie kolejnych etapów inicjacji zmian w przekazywaniu wewnątrzkomórkowym, może zaowocować wprowadzeniem bardziej celnych i skutecznych metod leczenia nowotworów glejowych OUN.

Piśmiennictwo

- Adler S.P., Nigro G., Pereira L.: Recent advances in the prevention and treatment of congenital cytomegalovirus infections. *Semin. Perinatol.* **31**, 10–18 (2007)
- Arko L., Katsyv I., Park G.E., Luan W.P., Park J.K.: Experimental approaches for the treatment of malignant gliomas. *Pharmacol. Ther.* **128**, 1–36 (2010)
- Barami K.: Oncomodulatory mechanisms of human cytomegalovirus in gliomas. *J. Clin. Neurosci.* **17**, 819–823 (2010)
- Baryawno N., Söderberg-Nauclér C. i wsp.: Detection of human cytomegalovirus in medulloblastomas reveals a potential therapeutic target. *J. Clin. Invest.* **121**, 4043–4055. (2011)
- Bego M.G., Jeor S.: Human cytomegalovirus infection of cells of hematopoietic origin: HCMV-induced immunosuppression, immune evasion, and latency. *Exp. Hematol.* **34**, 555–570 (2006)
- Bhattacharyya S., Sen P., Wallet M., Long B., Baldwin A.S. Jr, Tisch R.: Immunoregulation of dendritic cells by IL-10 is mediated through suppression of the PI3K/Akt pathway and of IkappaB kinase activity. *Blood*, **15**, 1100–1109 (2004)
- Botto S., Streblow D.N., De Filippis V., White L., Kreklywich C.N., Smith P.P., Caposio P.: IL-6 in human cytomegalovirus secretome promotes angiogenesis and survival of endothelial cells through the stimulation of survivin. *Blood*, **6**, 352–361 (2011)
- Britt W.J., Boppana S.: Human cytomegalovirus virion proteins. *Hum. Immunol.* **65**, 395–402 (2004)
- Bukur J., Jasinski S., Seliger B.: The role of classical and non-classical HLA class I antigens in human tumors. *Semin. Cancer Biol.* **22**, 350–358 (2012)
- Caldarella A., Crocetti E., Paci E.: Is the incidence of brain tumors really increasing? A population-based analysis from a cancer registry. *J. Neurooncol.* **104**, 589–594 (2011)
- Caposio P., Orloff S.L., Streblow D.N.: The role of cytomegalovirus in angiogenesis. *Virus. Res.* **157**, 204–211 (2011)
- Chambers J., Ghazal P. i wsp.: DNA microarrays of the complex human cytomegalovirus genome: profiling kinetic class with drug sensitivity of viral gene expression. *J. Virol.* **73**, 5757–5766 (1999)
- Cheeran M.C., Lokensgard J.R., Schleiss M.R.: Neuropathogenesis of Congenital Cytomegalovirus Infection: Disease Mechanisms and Prospects for Intervention. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 99–126 (2009)
- Chun Soo Kim, M.D., Ph.D.: Congenital and perinatal cytomegalovirus infection. *Korean J. Ped.* **53**, 14–20 (2010)
- Cinatl J. Jr., Kotchetkov R., Scholz M., Cinatl J., Vogel J.U., Driever P.H., Doerr H.W.: Human cytomegalovirus infection decreases expression of thrombospondin-1 independent of the tumor suppressor protein p53. *Am. J. Pathol.* **155**, 285–292 (1999)
- Cobbs C.S., Harkins L., Samanta M., Gillespie G.Y., Bharara S., King P.H., Nabors L.B., Cobbs C.G., Britt W.J.: Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. *Cancer Res.* **62**, 3347–3350 (2002)
- Cobbs C.S., Soroceanu L., Denham S., Zhang W., Britt W.J., Pieper R., Kraus M.H.: Human cytomegalovirus induces cellular tyrosine kinase signaling and promotes glioma cell invasiveness. *J. Neurooncol.* **85**, 271–280 (2007)
- Cobbs C.S.: Evolving evidence implicates cytomegalovirus as a promoter of malignant glioma pathogenesis. *Herpesviridae*, **2**, doi:10.1186/2042-4280-2-10 (2011)
- Crocetti E., Trama A., Stiller C., Caldarella A., Soffietti R., Jaal J., Weber D.C., Ricardi U., Slowinski J., Brandes A.: RARE-CARE working group. Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe. *Eur. J. Cancer.* **48**, 532–1542 (2012)
- De Leon G., Mitchell D., Sampson J.: A promising cancer vaccine. *Future Oncol.* **7**, 331–334 (2011)
- Domagała W.: Molekularne podstawy karcynogenezy i ścieżki sygnałowe niektórych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego. *Pol. Przegl. Neurol.* **3**, 127–141 (2007)
- Ferguson S.D.: Malignant gliomas: diagnosis and treatment. *Dis. Mon.* **57**, 558–569 (2011)
- Fleming A.J., Chi S.N.: Brain tumors in children. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care*, **42**, 80–103 (2011)
- Gaj Z., Rycel M., Wilczyński J., Nowakowska D.: Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the population of Polish pregnant women. *Ginek. Pol.* **83**, 337–341 (2012)
- Hagemeier C., Walker S.M., Sissons P.J., Sinclair J.H.: The 72K IE1 and 80K IE2 proteins of human cytomegalovirus independently trans-activate the c-fos, c-myc and hsp70 promoters via basal promoter elements. *J. Gen. Virol.* **73**, 2385–2393 (1992)
- Hamdan H.Z., Abdelbagi I.E., Nasser N.M., Adam I.: Seroprevalence of cytomegalovirus and rubella among pregnant women in western Sudan. *Virol. J.* **8**, doi:10.1186/1743-422X-8-217 (2011)
- Isern E., Gustems M., Messerle M., Borst E., Ghazal P., Angulo A.: The activator protein 1 binding motifs within the human cytomegalovirus major immediate-early enhancer are functionally redundant and act in a cooperative manner with the NF- κ B sites during acute infection. *J. Virol.* **85**, 1732–1746 (2011)
- Jain M., Duggal S., Chugh T.D.: Cytomegalovirus infection in non-immunosuppressed critically ill patients. *J. Infect. Dev. Count.* **12**, 571–579 (2011)
- Jones L.W., Ali-Osman F., Lipp E., Marcello J.E., McCarthy B., McCoy L., Rice T., Wrensch M., Il'yasova D.: Association between body mass index and mortality in patients with glioblastoma multiforme. *Canc. Cau. Control.* **21**, 195–201 (2010)
- Kenneson A., Cannon M.J.: Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev. Med. Virol.* **17**, 253–276 (2007)
- Keunen O., Niclou S.P. i wsp.: Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 3749–3754 (2011)
- Krześlak A.: Akt kinase: a key regulator of metabolism and progression of tumors. *Post. Hig. Med. Dośw.* **19**, 490–503 (2010)
- Landolfo S., Gariglio M., Gribaudo G., Lembo D.: The human cytomegalovirus. *Pharmacol. Ther.* **98**, 269–297 (2003)
- Lehrer S.: Cytomegalovirus infection in early childhood may be protective against glioblastoma multiforme, while later infection is a risk factor. *Med. Hypotheses*, **78**, 657–658 (2012)
- Lilley B.N., Ploegh H.L., Tirabassi R.S.: Human cytomegalovirus open reading frame TRL11/IRL11 encodes an immunoglobulin G Fc-binding protein. *J. Virol.* **75**, 11218–11221 (2011)
- Lin Y.L., Chang P.C., Wang Y., Li M.: Identification of novel viral interleukin-10 isoforms of human cytomegalovirus AD169. *Virus. Res.* **131**, 213–223 (2008)

37. Liu Y., Li C., Lin J.: STAT3 as a Therapeutic Target for Glioblastoma. *Anticancer Agents Med. Chem.* **10**, 512–519 (2010)
38. Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K., Burger P.C., Jouvet A., Scheithauer B.W., Kleihues P.: The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* **114**, 97–109 (2007)
39. Lucas K.G., Bao L., Bruggeman R., Dunham K., Specht C.: The detection of CMV pp65 and IE1 in glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol.* **103**, 231–238 (2011)
40. Miller-Kittrell M., Sparer T.E.: Feeling manipulated: cytomegalovirus immune manipulation. *Virol. J.* **6**, doi:10.1186/1743-422X-6-4 (2009)
41. Mitchell D.A., Xie W., Schmittling R., Learn C., Friedman A., McLendon R.E., Sampson J.H.: Sensitive detection of human cytomegalovirus in tumors and peripheral blood of patients diagnosed with glioblastoma. *Neuro. Oncol.* **10**, 10–18 (2008)
42. Noriega V.M., Tortorella D.: Human cytomegalovirus-encoded immune modulators partner to downregulate major histocompatibility complex class I molecules. *J. Virol.* **83**, 1359–1367 (2009)
43. Ostrom Q.T., Barnholtz-Sloan J.S.: Current state of our knowledge on brain tumor epidemiology. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **11**, 329–335 (2011)
44. Pandey J.P.: Genetic and viral etiology of glioblastoma- a unifying hypothesis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **20**, 1061–1063 (2011)
45. Paterski A., Antosz H.: Ekspresja STAT3 w limfocytach b prawidlowych i transformowanych nowotworowo. *Post. Biol. Kom.* **34**, 141–157 (2007)
46. Prins R.M., Cloughesy T.F., Liao L.M.: Cytomegalovirus immunity after vaccination with autologous glioblastoma lysate. *N. Engl. J. Med.* **31**, 539–541 (2008)
47. Rahbar A., Stragliotto G., Orrego A., Peredo I., Taher C., Willems J., Söderberg-Naucler C.: Low levels of Human Cytomegalovirus Infection in Glioblastoma multiforme associates with patient survival; -a case-control study. *Herpesviridae*, **3**, doi:10.1186/2042-4280-3-3 (2007)
48. Reinhardt B., Winkler M., Schaarschmidt P., Pretsch R., Zhou S., Vaida B., Schmid-Kotsas A., Michel D., Walther P., Bachem M., Mertens T.: Human cytomegalovirus-induced reduction of extracellular matrix proteins in vascular smooth muscle cell cultures: a pathomechanism in vasculopathies? *J. Gen. Virol.* **87**, 2849–2858 (2006)
49. Reynés G., Vila V., Martín M., Parada A., Fleitas T., Reganon E., Martínez-Sales V.: Circulating markers of angiogenesis, inflammation, and coagulation in patients with glioblastoma. *J. Neurooncol.* **102**, 35–41 (2011)
50. Salwa El-S., Abdel H., Kouka S.E., Abdel-Wahab, Laila H., Saleh, Graham E., Davis, Hastie I., James C.: Booth Comparative Epidemiology of Infection with Human Cytomegalovirus in Cairo and South London. *Int. J. Virol.* **7**, 116–122 (2011)
51. Schempp S., Topp M., Kessler T., Sampaio K.L., Dennehy K.M., Einsele H., Hahn G., Grigoleit G.U., Jahn G.: Deletion mutant of human cytomegalovirus lacking US2-US6 and US11 maintains MHC class I expression and antigen presentation by infected dendritic cells. *Virus Res.* **155**, 446–454 (2011)
52. Scheurer M.E., Bondy M.L., Aldape K.D., Albrecht T., El-Zein R.: Detection of human cytomegalovirus in different histological types of gliomas. *Acta Neuropathol.* **116**, 79–86 (2008)
53. Scholz M., Doerr H.W., Cinatl J.: Inhibition of cytomegalovirus immediate early gene expression: a therapeutic option? *Antiviral Res.* **49**, 129–145 (2001)
54. Smith C., James W.: Diagnosis and pathogenesis of gliomas. *Curr. Diagn. Pathol.* **13**, 180–192 (2007)
55. Soroceanu L., Akhavan A., Cobbs C.S.: Platelet-derived growth factor- α receptor activation is required for human cytomegalovirus infection. *Nature*, **18**, 391–395 (2008)
56. Staras S.A., Flanders W.D., Dollard S.C., Pass R.F., McGowan J.E. Jr., Cannon M.J.: Cytomegalovirus seroprevalence and childhood sources of infection: A population-based study among pre-adolescents in the United States. *J. Clin. Virol.* **43**, 266–271 (2008)
57. Strååt K., Xu D. i wsp.: Activation of telomerase by human cytomegalovirus. *J. Natl. Cancer Inst.* **101**, 488–497 (2009)
58. Szumera B., Lalik B., Szlęk R.: Współczesne osiągnięcia w badaniach nad cytomegalią *Przegl. Ped.* **36**, 51–63 (2006)
59. To A., Bai Y., Shen A., Gong H., Umamoto S., Lu S., Liu F.: Yeast two hybrid analyses reveal novel binary interactions between human cytomegalovirus-encoded virion proteins. *PLoS One*, **1**, e17796 (2011)
60. Tschische P., Tadagaki K., Kamal M., Jockers R., Waldhoer M.: Heteromerization of human cytomegalovirus encoded chemokine receptors. *Biochem. Pharmacol.* **15**, 610–619 (2011)
61. Wang X., Sonenshein G.E.: Induction of the RelB NF- κ B subunit by the cytomegalovirus IE1 protein is mediated via Jun kinase and c-Jun/Fra-2 AP-1 complexes. *J. Virol.* **79**, 95–105 (2005)
62. Vomaske J., Varnum S., Melnychuk R., Smith P., Pasa-Tolic L., Shutthanandan J.I., Streblow D.N.: HCMV pUS28 initiates pro-migratory signaling via activation of Pyk2 kinase. *Herpesviridae*, **1**, doi:10.1186/2042-4280-1-2 (2010)
63. Yu X., Shah S., Lee M., Dai W., Lo P., Britt W., Zhu H., Liu F., Zhou Z.H.: Biochemical and structural characterization of the capsid-bound tegument proteins of human cytomegalovirus. *J. Struct. Biol.* **174**, 451–460 (2011)
64. Zhu V.F., Yang J., Lebrun D.G., Li M.: Understanding the role of cytokines in Glioblastoma Multiforme pathogenesis. *Cancer Lett.* **316**, 139–150 (2011)
65. Zou Y., Bresnahan W., Taylor R.T., Stastny P.: Effect of human cytomegalovirus on expression of MHC class I-related chains A. *J. Immunol.* **174**, 3098–3104 (2005)

Ewa Oleńska^{1*}, Wanda Małek²

¹ Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu, Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku, ul. Świerkowa 20B, Białystok

² Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii,
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

Wpłynęło w marcu 2013 r.

1. Metale ciężkie – występowanie i toksyczność. 2. Bakteryjne mechanizmy oporności na metale ciężkie. 2.1. Modyfikacje osłon komórkowych uniemożliwiające wnikanie jonów metali do cytoplazmy. 2.2. Usuwanie jonów metali z cytoplazmy na zewnątrz komórki. 2.3. Enzymatyczna detoksyfikacja jonów metali. 2.4. Pozakomórkowe wiązanie jonów metali przez metabolity bakterii. 2.5. Wewnątrzkomórkowe wiązanie jonów metali. 3. Podsumowanie

Mechanisms of heavy metal resistance in bacteria

Abstract: Bacteria play a substantial role in the biogeochemical cycles of metals, many of which exhibit toxicity towards various organisms. These unicellular bacteria are persistently exposed to the intoxication by heavy metals which are natural components of the environment. Intensive industrialization and extensive anthropogenic exploitation of the environment resulted in the release of heavy metals formerly deposited as minerals in rocks and as a consequence, in the pollution increase of all environmental constituents the soil, air and water. Bacteria have evolved various mechanisms of heavy metal resistance. The two most important mechanisms are: (i) heavy metal exclusion by the cellular barrier permeability and their immobilization outside the cell by bacterium metabolites, and (ii) the detoxification of toxic metal ions which entered the cytoplasm by different chemiosmotic and/or energy-dependent efflux systems as well as by intracellular sequestration mechanisms involving low molecular weight proteins such as cysteine-rich metallothioneins. The development of various mechanisms of heavy metal resistance enables bacteria to survive in harsh conditions and also allows us to apply them in the remediation of metal contaminated areas.

1. Heavy metals – their occurrence and toxicity. 2. Mechanisms of bacterial resistance to heavy metals. 2.1. Modifications of the cellular barrier preventing metal ion penetration into the cytoplasm. 2.2. Efflux of metal ions out of the cell. 2.3. Enzymatic conversion of metal ions. 2.4. Extracellular sequestration of metal ions by bacterial metabolites. 2.5. Intracellular sequestration of metal ions. 3. Summary

Słowa kluczowe: detoksyfikacja, metale ciężkie, systemy oporności na metale ciężkie

Key words: detoxification, heavy metals, heavy metals resistance systems

1. Metale ciężkie – występowanie i toksyczność

Metale ciężkie są pierwiastkami o gęstości względnej przekraczającej 5 g/cm³. Metale te, jak na przykład kadm (Cd), ołów (Pb), nikiel (Ni), żelazo (Fe), miedź (Cu), kobalt (Co), chrom (Cr) czy cynk (Zn) są postrzegane głównie jako zanieczyszczenia środowiskowe, jakkolwiek są one naturalnymi komponentami środowiska i stanowią elementarny składnik litosfery [18]. W skorupie ziemskiej metale ciężkie występują w postaci minerałów, np. w formie: galeny (PbS), smitsonitu (ZnCO₃), sfalerytu (ZnS), arsenolitu (As₂O₃) czy chalkozynu (Cu₂S). Głównym naturalnym źródłem metali ciężkich w środowisku jest erozja skał i aktywność wulkaniczna, jednak największy ich ładunek dociera do środowiska w wyniku intensywnej działalności człowieka tj. z przemysłu wydobywczego, hutnictwa, rolnictwa oraz z odpadów komunalnych [49]. Metale ciężkie uruchomione z minerałów drogą naturalną bądź antropogeniczną,

wnikają do łańcucha troficznego i mogą oddziaływać negatywnie na wszystkie organizmy żywe, w tym również bakterie [14]. Niektóre metale, tj. Fe, Cu, Co, Ni, Cr czy Zn w niskim stężeniu są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania mikroorganizmów, np. katalizują reakcje biochemiczne, stabilizują strukturę białek i bakteryjne osłony komórkowe, są komponentami białek enzymatycznych np. peroksydaz (Fe), katalazy (Fe), dysmutaz (Cu, Zn, Fe, Mn), nitrogeazy (Mo, Fe), wchodzą w skład kompleksów oksydo-redukcyjnych np. cytochromów, uczestniczą w syntezie białek i kwasów nukleinowych, czy też biorą udział w regulacji ciśnienia osmotycznego komórki (K⁺) [8]. Kobalt jest kofaktorem kobalaminy oraz aminopeptydazy metioninowej, bromopeptydazy nitrylowej oraz aminomutazy-2,3-lizynowej [20], miedź, ze względu na względnie wysoki potencjał oksydo-redukcyjny, jest kluczowym składnikiem grup prostetycznych enzymów zaangażowanych w redukcję azotanów i tlenków azotu [57], natomiast

* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu, Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku, ul. Świerkowa 20B, 15-950 Białystok; tel. (85) 7457297; fax. (85) 7457301, chwelat@uwb.edu.pl

nikiel wchodzi w skład metalozależnej ureazy, hydrogenazy tlenku węgla, glioksylazy, dekarbonylasy acetylo-CoA oraz dysmutazy ponadtlenkowej [33].

Wyróżniono dwa szlaki wnikania jonów metali do wnętrza komórki bakteryjnej. Pierwszy, niespecyficzny substratowo, funkcjonuje na zasadzie niezależnego energetycznie gradientu chemiosmotycznego, który wykorzystuje różnicę stężeń substancji w poprzek błony cytoplazmatycznej, natomiast drugi wymaga dostarczenia energii w postaci ATP i jest wysoce specyficzny w stosunku do substratów. Jeżeli stężenie jonów metali niezbędnych przekracza ich poziom fizjologiczny w komórce, wówczas jony te mogą wywołać efekty toksyczne, podobnie jak jony metali balastowych, zbędnych dla procesów metabolicznych, tj. Cd, Pb, rtęć (Hg), arsen (As) czy srebro (Ag). Jony metali ciężkich, ze względu na podobną wielkość promienia jonowego i wartościowość, mogą zastępować na zasadzie tzw. „mimikry jonowej” jony metali niezbędnych, np. Zn czy Fe w centrach aktywnych białek enzymatycznych [6]. Substytucja jonów niezbędnych dla prawidłowego przebiegu metabolizmu oraz ich wypieranie z komórki są podstawowymi mechanizmami cytotoxyczności metali ciężkich wobec komórek bakterii. Rezultatem negatywnego oddziaływania metali ciężkich na poziomie komórki są zaburzenia fosforylacji oksydacyjnej, zmiany potencjału osmotycznego komórki oraz modyfikacje konformacyjne makrocząsteczek. W efekcie tych zmian może dojść do dezintegracji struktury błon komórkowych, zaburzenia procesów transportu, zahamowania aktywności metabolicznej komórek, a nawet śmierci organizmu [56]. W warunkach eksperymentalnych u bakterii glebowych, narażonych na intoksykację wysokimi stężeniami jonów metali ciężkich, obserwowano zmiany morfologiczne, zmniejszenie aktywności życiowej oraz ograniczenie tempa wzrostu [22, 51]. Mikroorganizmy w warunkach naturalnych są narażone na stres oksydacyjny wynikający z jednoczesnego wpływu wielu różnych metali [1]. W wyniku synergistycznego oddziaływania jonów metali ciężkich, ich indywidualna toksyczność ulega spotęgowaniu (potencjacja). Metale różnią się indywidualną toksycznością wobec mikroorganizmów. Według Błażewicza [4] pięć wybranych metali ciężkich można uporządkować w następujący sposób zgodnie z ich zmniejszającą się indywidualną toksycznością wobec komórek bakterii: $Ag > Cu > Cd > Zn > Pb$.

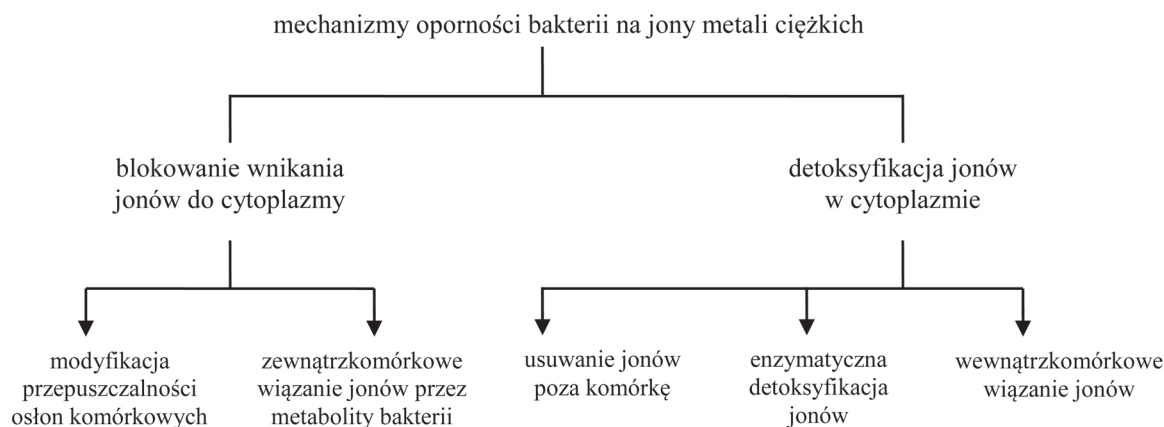
Toksyczność metali wobec komórek bakteryjnych jest uzależniona nie tylko od rodzaju i stężenia metalu, ale również jest wypadkową wielu innych czynników wpływających na ich mobilność i biodostępność. Warunki edaficzne, takie jak: odczyn gleby, pojemność sorpcyjna, warunki natlenienia (potencjał redox) oraz możliwość tworzenia ruchliwych połączeń kompleksowych (chelatów) jonów metali ze związkami orga-

nicznymi, są kluczowymi czynnikami warunkującymi przyswajalność metali przez organizmy żywe. Rozpuszczalne związki metali są łatwiej pobierane przez organizmy, a przez to są bardziej toksyczne niż trudno rozpuszczalne kompleksy metali czy ich rudy. Kwaśny odczyn środowiska sprzyja lepszej rozpuszczalności związków metali, a tym samym zwiększa ich mobilność. Pojemność sorpcyjna gleby, zależna od zawartości i rodzaju minerałów ilastych, zawartości próchnicy, uwodnionych tlenków glinu i żelaza w glebie, wpływa na unieruchamianie jonów metali, ponieważ wszystkie te elementy gleby silnie absorbują metale na swojej powierzchni [21].

Tolerancja metali ciężkich przez bakterie, często ma związek z jednoczesną opornością na antybiotyki, co nazywamy kotolerancją [2]. Stwierdzono, że geny determinujące oporność na metale oraz antybiotyki zazwyczaj są ze sobą sprzężone i są zlokalizowane głównie na plazmidach [50, 60–62]. Na przykład, na plazmidzie pHCM1 *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18, są zlokalizowane geny warunkujące oporność na trimetoprim (*dhfrIb*), sulfonamid (*sulII*), chloramfenikol (*catI*), ampicylinę (*bla*) czy streptomycynę (*strAB*) oraz występuje na nim operon determinujący oporność na rtęć [40].

2. Bakteryjne mechanizmy oporności na metale ciężkie

Bakterie generalnie wykazują szerokie spektrum adaptacji do różnych, skrajnie trudnych warunków środowiska (ekstremofile), w tym do wysokich stężeń metali ciężkich w podłożu. Wzrost i rozwój tej grupy mikroorganizmów w środowisku zanieczyszczonym metalami ciężkimi jest możliwy dzięki wykształceniu szeregu mechanizmów oporności [52]. Mechanizmy warunkujące zdolność przeżycia bakterii w warunkach wysokiego stężenia jonów metali ciężkich w podłożu są determinowane genetycznie [26]. U bakterii geny oporności na sole metali ciężkich są zlokalizowane na chromosomie oraz pozachromosomowo na plazmidach. Zasadniczą funkcją plazmidowych produktów genów oporności jest warunkowanie tolerancji na metale, natomiast rolą systemów kodowanych chromosomowo jest głównie utrzymywanie homeostazy jonowej organizmu [45]. Plazmidowa lokalizacja genów determinujących oporność bakterii na metale ciężkie sprzyja ich przenoszeniu na inne organizmy, drogą horyzontalnego transferu genów (HTG) [43]. Systemy oporności na metale ciężkie występują u wielu rodzajów i gatunków bakterii, co może wskazywać, że oporność na negatywne oddziaływanie toksycznych metali ciężkich mogła wyewoluować tuż po powstaniu komórki prokariotycznej w odpowiedzi na stały kontakt z metalami występującymi w środowisku [17]. W Domenie *Bacteria*



Rys. 1. Mechanizmy oporności na toksyczne działanie jonów metali ciężkich u bakterii

wyodrębniono kilka typów mechanizmów tolerancji na metale ciężkie (Rys.1) [28]:

1. Modyfikacje osłon komórkowych uniemożliwiające wnikanie jonów metali do cytoplazmy;
2. Usuwanie toksycznych jonów metali z cytoplazmy na zewnątrz komórki;
3. Enzymatyczna detoksyfikacja jonów metali;
4. Pozakomórkowe wiązanie jonów metali przez metabolity bakterii;
5. Wewnątrzkomórkowe wiązanie jonów metali.

2.1. Modyfikacje osłon komórkowych uniemożliwiające wnikanie jonów metali do cytoplazmy

Osłony komórek bakterii są zbudowane z błony komórkowej i ściany komórkowej. Błony komórkowe bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych mają podobną, typową budowę białkowo-lipidową i pełnią podstawowe funkcje, tj. uczestniczą w transporcie substancji pokarmowych, wydalaniu zbędnych produktów metabolizmu, procesach oksydo-redukcyjnych, w tworzeniu ściany komórkowej czy wydzielaniu egzoenzymów hydrolitycznych. Natomiast struktura ściany komórkowej u bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich nie jest jednakowa. U bakterii Gram-dodatnich ścianę komórkową buduje wiele warstw mureiny połączonej wiązaniami kowalencyjnymi z kwasami tejchojowymi lub tejchuronowymi. Mureina jest polimerem zbudowanym z powtarzających się jednostek utworzonych z N-acetyloglukozoaminy oraz kwasu N-acetylmuraminowego, połączonych wiązaniem β -1,4-glikozydowym. Z kolei ściana komórkowa bakterii Gram-ujemnych składa się maksymalnie z trzech warstw mureiny, lipoproteiny oraz błony zewnętrznej i nie zawiera kwasów tejchojowych. Lipoproteina łączy mureinę z błoną zewnętrzną. Błona zewnętrzna składa się z białek, fosfolipidów oraz lipopolisacharydów. Białka błony zewnętrznej zwane porynami, uczestniczące w transporcie substancji, mogą być specyficzne lub niespecyficzne substratowo. Lipopolisacharyd jest

zbudowany z lipidu A, wielocukru rdzeniowego oraz O-swoistego łańcucha cukrowego. Ponadto, bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne mogą wytwarzać i wydelać substancje o charakterze polimerów, które występują po zewnętrznej stronie komórki w postaci otoczek lub egzopolisacharydu (EPS) [58].

W wyniku kontaktu jonów metali z komórką bakterii może nastąpić związanie jonów metali z elementami strukturalnymi ścian komórkowych lub/i otoczek. Sposób ten nie jest specyficzny substratowo i warunkuje ograniczoną ochronę przed toksycznym oddziaływaniem metali ze względu na szybkie tempo wysycenia jonami metali grup funkcyjnych związków chemicznych wchodzących w skład tych struktur. Otoczka polisacharydowa umożliwia zewnątrzkomórkowe wiązanie metali u wielu gatunków bakterii, np. *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas putida* czy *Arthrobacter viscosus* [8]. Badania Mergea'y'a [29] wskazują, że szczepy *K. aerogenes* wytwarzające otoczki akumulują istotnie mniej kadmu w cytoplazmie w porównaniu do tych pozbawionych otoczek. Ponadto, jony metali mogą być wiązane również w przestrzeni peryplazmatycznej. Zmiany w przepuszczalności barier komórkowych, a więc ograniczenie kontaktu toksycznych metali ciężkich z kluczowymi składnikami komórki bakteryjnej, mogą być rezultatem mutacji. Na przykład, u *Escherichia coli* w wyniku pojedynczej mutacji punktowej zachodzi zmiana w syntezie poryn, stanowiących kanał dyfuzyjny w błonie zewnętrznej i w rezultacie zablokowanie transportu jonów miedzi do komórki.

2.2. Usuwanie toksycznych jonów metali na zewnątrz komórki

Drugi typ oporności na metale polega na transporcie jonów poza komórkę bakterii (*efflux system*) i jest wykorzystywany do usuwania toksycznych jonów metali z cytoplazmy. Koszt energetyczny utrzymania wielu, wysoce substratowo specyficznych systemów eksportu jonów metali jest większy w porównaniu do innych

mechanizmów oporności, np. mechanizmu enzymatycznej detoksyfikacji metali. Mimo to, wiele takich, bardzo różnych mechanizmów usuwania toksycznych jonów z komórki funkcjonuje w świecie mikroorganizmów [8]. U bakterii wyodrębniono siedem głównych typów pomp usuwających jony metali na zewnątrz komórki [53]. Dwa typy pomp to ATP-azy: jedna jest ATP-azą typu P, natomiast druga to ATP-aza ABC. Kolejne trzy pompy są chemiosmotycznymi antyporterami jon/ H^+ o względnie szerokim spektrum substratów. Należą do nich następujące rodziny białek: nadrodzina białek MFS (*Major Facilitator Superfamily*), w której skład wchodzi 17 rodzin o charakterze uniportera, symportera i antyportera [39], które transportują związki niskocząsteczkowe w odpowiedzi na chemiosmotyczny gradient jonów, rodzina białek CDF (*cation diffusion facilitator*) stymulujących przepływ kationów, do której należy białko CzcD warunkujące oporność na $Cd(II)$, $Zn(II)$ i $Co(II)$ oraz rodzina białek CzcCBA transportująca na zewnątrz jony tych metali. Pozostałe dwie rodziny stanowią chemiosmotyczne systemy transportujące o wąskim spektrum substratu, tj. system transportu chromu (Cr) ChrA oraz transporter ArsB dla arseniu (III) i antymonu (III). W warunkach fizjologicznych białkowe transportery błonowe o szerokim spektrum substratu, przenoszą zarówno jony metali niezbędnych dla przebiegu procesów metabolicznych jak i jony metali balastowych naśladujące niezbędne jony [6]. Gdy stężenie jonów metali wewnątrz komórki przekracza określony poziom, co wywołuje efekt toksyczny, komórka uruchamia mechanizm usuwania jonów z cytoplazmy do otaczającego ją środowiska. Dotychczas opisano kilka systemów oporności na toksyczne oddziaływanie metali, związanych z ich transportem z cytoplazmy poza komórkę, a dotyczą one np. arseniu, cynku, kadmu czy miedzi.

Organizmy żywe są narażone na toksyczne oddziaływanie arseniu, występującego głównie w formie arsenianów $As(V)$, molekularnych analogów fosforanów oraz arseninów $As(III)$ [13]. Transport arsenianów do komórki bakterii może przebiegać dwiema drogami. Pierwszy to konstytutywny i niespecyficzny substratowo system przenoszenia składników odżywczych Pit, za którego pośrednictwem arsen dostaje się do komórki, gdy występuje nadmiar fosforanów w podłożu. Natomiast w przypadku deficytu fosforu jest indukowany specyficzny dla fosforanów system Pst. System Pst jest stukrotnie bardziej specyficzny względem fosforu niż arseniu [36]. Niektóre bakterie mogą regulować stężenie jonów arseniu w cytoplazmie komórki poprzez modyfikację systemu transportu fosforanów; inne bakterie, jak na przykład *E. coli*, wykształciły system usuwania toksycznych jonów arseniu z cytoplazmy za pośrednictwem specyficznego systemu detoksyfikacji, tzw. systemu ArsC. Determinanty genetyczne tego systemu

mogą znajdować się na chromosomach lub plazmidach w postaci operonu *ars* [13]. Za ekspresję operonu *ars* jest odpowiedzialne białko regulatorowe ArsR, produkt genu *arsR*, którego ekspresja jest indukowana arsenianami, arseninami, antymonem oraz bizmutem. Białko ArsR, zdolne do łączenia się z DNA jest dimerem zawierającym dwie cząsteczki cysteiny, za pomocą których wiąże się z aktywującymi je jonami arseniu. Ponadto, w operonie *ars*, znajdującym się u *E. coli* na plazmidzie R773, poza *arsR*, występuje drugi gen regulatorowy – *arsD*. Gen *arsD* determinuje białko, które nie jest niezbędne w regulacji ekspresji genów *ars* na podstawowym poziomie, działa *in trans* niezależnie od czynników indukujących [9]. Głównym enzymem operonu *ars* jest cytoplazmatyczna reduktaza arsenianowa kodowana przez gen *arsC*. Reduktaza arsenianowa katalizuje redukcję $As(V)$ do $As(III)$, który następnie jest usuwany poza komórkę za pomocą specyficznego transportera $As(III)$ – ArsB. Białko ArsA jest wewnątrz błonową ATP-azą aktywowaną obecnością jonów arseniu, która przyłącza się jako dimer do błonowego transportera tj. białka ArsB, tworząc kompleks ArsA-ArsB i poprzez hydrolizę ATP dostarcza energii do transportu jonów arseniu (III) poza komórkę [17]. Szczególną właściwością pompy usuwającej jony arseniu jest jej dualistyczny charakter. Pompa ta może funkcjonować chemiosmotycznie, bez nakładu energii pochodzącej z ATP przy udziale białka ArsB, jak również przy wykorzystaniu energii pochodzącej z ATP, z udziałem kompleksu ArsA-ArsB [53]. Ponadto wykazano, że operon *ars*, zlokalizowany u *E. coli* na plazmidzie R773, może warunkować oporność na tellur. Za usuwanie jonów telluru poza komórkę są odpowiedzialne produkty trzech genów strukturalnych: *arsA*, *arsB* i *arsC*. System Ars nie gwarantuje jednoczesnej kotolerancji na tellur i arsen u wszystkich gatunków bakterii np. u *Staphylococcus aureus* nie wykryto takiej właściwości. Oporność na arsen u niektórych bakterii może mieć związek z aktywnością oksydazy arseninowej. Oksydaza arseninowa przekształca wysoce toksyczny arsenin do względnie mniej toksycznego arsenianu [32, 53].

Oporność bakterii na $Cd(II)$ i $Zn(II)$ jest determinowana przez geny zlokalizowane głównie na plazmidach [23]. Dotychczas, u bakterii Gram-dodatnich (np. *Staphylococcus aureus*) opisano dwa mechanizmy oporności na te metale: CadA i CadB determinowane odpowiednio przez operony *cadA* i *cadB*. Operon *cadA* zmapowano u *S. aureus* na plazmidzie pI258. Składa się on z dwóch genów: *cadA* i *cadC*. Gen *cadA* determinuje 727 aminokwasowe białko CadA, które jest ATP-azą typu P i funkcjonuje jako pompa jonowa. Pompa ta czerpie energię do eksportu jonów metali poza komórkę z hydrolizy ATP [45]. CadA składa się z sześciu domen, obejmujących m.in. cytoplazmatyczny region wiążący metale, domenę uczestniczącą w przenoszeniu jonów

na powierzchnię błony komórkowej, domenę o potencjalnej funkcji kanału transportującego kationy oraz wewnątrzkomórkową konserwatywną domenę wiążącą ATP [8, 17]. Jony metali Cd(II), czy Zn(II) są przyłączane do CadA prawdopodobnie za pośrednictwem jednego z dwóch motywów: Cys-Pro-Cys lub Cys-Pro-His zlokalizowanych w regionach odpowiedzialnych za specyficzność tego białka wobec substratu. W obecności jonów metali następuje fosforylacja CadA przy udziale ATP i w konsekwencji zmiana konformacji białka. Usunięciu jonów metali poza błonę komórkową towarzyszy hydroliza ATP i uwolnienie energii [35]. Drugim białkiem operonu *cadA* jest znacznie mniejsze białko CadC, składające się ze 122 aminokwasów. Białko to pełni funkcję regulatora transkrypcji operonu *cadA*, który może działać *in cis* lub *in trans* [11]. Wiedza na temat mechanizmu funkcjonowania drugiego systemu oporności na toksyczne działanie jonów Cd i Zn, tzw. systemu *CadB* jest ograniczona. Operon *cadB* zmapowano u *S. aureus* na plazmidzie pII147 i w jego obrębie zidentyfikowano dwa geny: *cadB* i *cadX*. Przypuszcza się, że ochronne działanie systemu *CadB* nie wynika z usuwania toksycznych jonów metali poza komórkę, a raczej polega na immobilizacji jonów w błonie komórkowej.

U bakterii Gram-ujemnych znane są dwa systemy zaangażowane w usuwanie jonów Cd(II), Zn(II) i Co(II) poza komórkę: system *CzcD*, który jest chemiosmotyczną, jednobiałkową pompą błonową, należącą do rodziny białek CDF (*cation diffusion facilitator*) oraz chemiosmotyczny kompleks trójpeptydowy *CzcCBA* [25, 35]. System *CzcCBA* po raz pierwszy zidentyfikowano u *Ralstonia eutropha* CH34 (wcześniej *Alcaligenes eutrophus*), a kodujące go geny zmapowano na megaplazmidzie (238 kbp) pMOL30 [12, 36]. System ten należy do dużej superrodziny pomp chemiosmotycznych zwanych RND (*Resistance Nodulation Division*) o różnorodnej funkcji, np. uczestniczą w transporcie toksycznych kationów, małych związków organicznych, a także w tworzeniu brodawek u ryzobiów i w podziałach komórkowych, np. u bakterii *E. coli*. System *CzcCBA* funkcjonuje jako ATP-niezależny antyporter proton/kation, zaangażowany w usuwanie kationów Zn^{2+} , Cd^{2+} i Co^{2+} poza komórkę [35], dla którego źródłem energii jest elektrochemiczny gradient protonów [46]. System ten jest kompleksem białkowym, w którego skład wchodzi duże, złożone z około 1000 aminokwasów białko błony wewnętrznej *CzcA*, białko błony zewnętrznej *CzcC*, należące do rodziny białek OMF (*outer membrane factors*) oraz białko peryplazmatyczne *CzcB*, które łączy białka *CzcA* i *CzcC* tworząc kanał pomiędzy cytoplazmą a środowiskiem zewnętrznym komórki [53] i należy do rodziny białek MFP (*membrane fusion protein*) [35].

Efektywnym sposobem detoksyfikacji miedzi przez komórkę bakteryjną jest jej usuwanie z cytoplazmy. Miedź w postaci jonu jednowartościowego jest bardziej

toksyczna od formy Cu^{2+} [44]. Eksport miedzi poza komórkę bakteryjną może odbywać się z udziałem energii lub bez jej nakładu. Dotychczas najlepiej poznano mechanizm transportu toksycznych jonów miedzi u bakterii *E. coli*. U tego gatunku wyodrębniono następujące systemy transportu miedzi z komórki: *CopA*, *CusCFBA* oraz system oporności na miedź *Pco*. Białko *CopA* jest ATPazą typu P, wyposażoną w motywy bogate w reszty cysteinowe i histydynowe o wysokim powinowactwie do metali, zlokalizowane na N-końcu białka [47]. Chemiosmotyczny system usuwający metale na zewnątrz komórki *CusCFBA*, jest kodowany na chromosomie i obejmuje białko *CusF* wiążące miedź w peryplazmie oraz kompleks białek *CusCBA*. *CusC* jest pompą zlokalizowaną w błonie wewnętrznej, która wiąże i usuwa jony z komórki, *CusB* jest białkiem peryplazmatycznym łączącym błonę wewnętrzną z zewnętrzną, natomiast *CusA* jest poryną błony zewnętrznej [57]. *Singh* i wsp. [54] sugerują, że ochrona komórki bakteryjnej, w pozakomórkowej przestrzeni peryplazmatycznej, może wynikać ze współdziałania systemu *CusCFBA* oraz wielomiedziowej oksydazy *CueO*. Niektóre szczepy *E. coli* są wyposażone w system oporności na miedź *Pco*, determinowany przez operon *pcoABCD*, który zidentyfikowano na plazmidzie pRJ1004. Mechanizm działania systemu *Pco* jest słabo poznany. Prawdopodobnie białko *PcoA*, należące do rodziny oksydaz wielomiedziowych uczestniczy w utlenianiu nadmiaru kationów miedzi (I), natomiast białka *PcoB*, *PcoC* i *PcoD* są zaangażowane w wiązanie jonów tego metalu oraz ich transport poza komórkę [44, 53].

2.3. Enzymatyczna detoksyfikacja jonów metali

Tolerancja metali ciężkich u bakterii może być realizowana na drodze enzymatycznej transformacji jonu metalu w formę mniej toksyczną, mniej przyswajalną przez komórkę i/lub w postać lotną [3]. Ten typ oporności dotyczy na przykład inaktywacji wysoce toksycznej rtęci (II). Toksyczność tego metalu wobec organizmów żywych wynika z łatwości przyłączania się jego formy dwuwartościowej do grup tiolowych, wchodzących w skład enzymów oraz innych białek i ich inaktywacji. System oporności na Hg^{2+} , determinowany przez operon *mer*, występuje u bakterii Gram-dodatnich, np. *S. aureus*, *Bacillus* sp. oraz u Gram-ujemnych, np. *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Serratia marcescens* i *Acidithiobacillus ferrooxidans* [15, 17, 64]. Wśród operonów *mer* wyróżniono operony o szerokim spektrum działania, warunkujące oporność na organiczną i nieorganiczną postać rtęci oraz operony o wąskim spektrum działania, determinujące oporność jedynie na nieorganiczne formy tego metalu [31].

Najistotniejszą cechą mechanizmu oporności bakterii na toksyczne działanie jonów rtęci jest wytworzenie

wysokiego specyficznego systemu transportu jonów tego pierwiastka do wnętrza komórki, gdzie przy udziale reduktazy rtęciowej, Hg^{2+} ulega przekształceniu w mniej toksyczną formę Hg^0 , która jest uwalniana poza komórkę [63]. Typowy region *mer* u bakterii Gram-ujemnych składa się z genu *merR*, głównego promotora $P_{merTPAD}$ oraz genów operonu *merTP(C/F)A/BD(E)*. Produkt genu *merR* – białko MerR jest aktywatorem głównego promotora *mer* w obecności jonów Hg(II) , zaś represorem w przypadku braku jonów tego metalu. Zarówno aktywacja jak i hamowanie ekspresji genów operonu *mer* odbywa się poprzez przyłączanie białka regulatorowego w rejonie głównego promotora $P_{merTPAD}$, zlokalizowanym na odcinku pomiędzy sekwencjami -35 i -10, które są rozdzielone 19 nukleotydami [7]. Według modelu regulacji operonu *mer* przez białko MerR, zaproponowanego przez Brown'a i wsp. [7], przy braku jonów rtęci homodimeryczne białko MerR, transkrybowane z promotora *merR*, przyłącza się za pośrednictwem specyficznej domeny helisa-pętla-helisa do regionu operator/promotor głównego operonu *mer*. W wyniku takiego połączenia DNA zostaje wygięte i odwinęte w pobliżu sekwencji operatora, a polimeraza RNA, połączona z promotorem *mer* i tworząca trójskładnikowy kompleks z DNA i MerR, nie może utworzyć otwartego kompleksu transkrypcyjnego, co powoduje zahamowanie ekspresji genów operonu *mer*. Natomiast w obecności Hg^{2+} , jony tego metalu przyłączają się do jednego z dwóch miejsc wiążących białko MerR, w wyniku czego MerR przyjmuje konformację aktywną. Mocne związanie MerR z operatorem operonu *mer* powoduje odkształcenie DNA przy centrum operatora, odwinęcie DNA o około 33° i wyprostowanie podwójnej helisy DNA. Reorientacja sekwencji -35 i -10 pozwala na ich produktywną interakcję z podjednostką σ^{70} polimerazy RNA i utworzenie otwartego kompleksu transkrypcyjnego, a więc inicjację transkrypcji operonu *merTP(C/F)A/BD(E)* [7].

Produkty ekspresji genów: *merT*, *merP* i *merC* są zaangażowane w wiązanie i transport jonów Hg^{2+} do wnętrza komórki. Gen *merP* koduje białko, które w przestrzeni peryplazmatycznej wiąże jony Hg^{2+} i dostarcza je białku MerT, które jest zlokalizowane w wewnętrznej błonie komórkowej i transportuje Hg(II) do cytoplazmy. Produkty genów *merA/merB* uczestniczą w enzymatycznej detoksyfikacji, odpowiednio, nieorganicznych i organicznych związków rtęci w komórkach bakterii. Gen *merA* koduje reduktazę rtęciową, homodimeryczną oksydoreduktazę flawinową wysoce specyficzną dla jonów rtęciowych, która redukuje jony Hg^{2+} do Hg^0 w NAD(P)H zależnej reakcji. Lotny Hg^0 przedostaje się z cytozolu do przestrzeni peryplazmatycznej [28] i jest uwalniany na zewnątrz komórki. Jony Hg^{2+} są przenoszone na N-koniec reduktazy rtęciowej za pośrednictwem białka MerC [16]. Gen *merB*, stanowiący element

operonów *mer* o szerokim spektrum działania, koduje enzym – liazę organicznych pochodnych rtęci, która katalizuje uwalnianie Hg^{2+} z jej kompleksów organicznych. Hg^{2+} jest następnie transportowany do cytoplazmy, zredukowany do Hg^0 i w tej formie uwalniany na zewnątrz komórki drogą wolatilizacji (wyparowania). Liaza organicznych pochodnych rtęci jest enzymem monomerycznym, rozszczepiającym wiązania kowalencyjne Hg-C i uwalniającym rtęć [53]. Jej aktywność jest uwarunkowana obecnością konserwatywnych cystein w pozycji Cys96 i Cys 159 enzymu [41]. Produkt białkowy genu *merF*, który zmapowano na elemencie transpozycyjnym Tn5053 u *Pseudomonas putida*, jest dodatkowym białkiem transportującym jony rtęci. Podobną funkcję pełni prawdopodobnie produkt genu *merE* [7]. Białko MerD, podobnie jak MerR, pełni funkcję regulatorową, łącząc się z tym samym rejonem promotorowym, z tym że białko MerD wykazuje mniejsze powinowactwo, a także jest syntetyzowane w mniejszych ilościach w porównaniu do białka MerR.

Organizacja operonów *mer* u bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych różni się nieznacznie, np. jeden z elementów strukturalnych operonu, gen *merB* występuje częściej w operonach *mer* bakterii Gram-ujemnych niż u Gram-dodatnich [3]. U bakterii Gram-ujemnych gen regulatorowy *merR* stanowi odrębny operon i jest transkrybowany w przeciwnym kierunku wobec genów strukturalnych głównego operonu *merTP(C/F)A/BD(E)*, co umożliwia precyzyjne hamowanie ekspresji genów operonu przy braku jonów rtęci. Natomiast u bakterii Gram-dodatnich, gen *merR* jest elementem składowym operonu *mer* i ulega transkrypcji w tym samym kierunku jak pozostałe geny w wyniku czego, operon *mer* funkcjonuje w tej grupie mikroorganizmów stale, nawet przy braku jonów rtęci [43].

2.4. Pozakomórkowe wiązanie jonów metali przez metabolity bakterii

Innym sposobem ochrony komórki bakteryjnej przed toksycznym działaniem metali ciężkich jest chelatowanie metali przez metabolity drobnoustrojów, np. siderofory oraz powierzchniowe egzo- (EPS) i lipopolisacharydy (LPS) [38, 42]. Siderofory są niskocząsteczkowymi chelatorami żelaza [30], a także innych metali, tj. Al, Cd, Cu, Ga, In, Pb, Zn oraz radionuklidów, np.: U i Np [34]. Egzopolisacharyd jest wielkocząsteczkowym polimerem wydzielanym do środowiska bakterii. W warunkach naturalnych EPS odgrywa kluczową rolę w adhezji komórek, powstawaniu agregatów mikrobiologicznych, takich jak biofilmy czy biogranule [59]. W obrębie EPS wyodrębniono neutralne chemicznie homopolisacharydy oraz polianionowe heteropolisacharydy bogate w kwasy uronowe, np. kwas glukuronowy, galakturonowy czy mannuronowy oraz pirogronian

[65]. Przyłączanie metali ciężkich do bakteryjnych biopolimerów najczęściej przebiega na drodze elektrostatycznej interakcji na przykład z ujemnie naładowanymi grupami funkcyjnymi kwasów uronowych [48]. Nieorganiczne fosforany, czy rzadziej siarczany mogą zwiększać status polianionowy EPS [59], co może znacząco zwiększyć potencjał EPS do przyłączania jonów metali.

2.5. Wewnątrzkomórkowe wiązanie jonów metali

Obniżenie toksyczności metali ciężkich, które mimo obecności barier ochronnych komórki bakteryjnej wnikają do cytoplazmy, może nastąpić na drodze chelatowania metali na terenie cytoplazmy przez niskocząsteczkowe peptydy, np. metalotioneiny [27]. W wyniku związania toksycznych jonów metali przez ligand zmniejsza się ich reaktywność i są one odseparowywane od kluczowych organelli komórkowych i makrocząstek. Metalotioneiny (MT) są wewnątrzkomórkowymi białkami o niskiej masie cząsteczkowej (6–7 kDa), bogatymi w cysteinę (30%), które występują u niektórych prokariotów, zwierząt, roślin wyższych oraz eukariotycznych mikroorganizmów [37]. Wszystkie cysteiny wchodzące w skład jednej cząsteczki MT uczestniczą w koordynacyjnym wiązaniu siedmiu atomów dwuwartościowych jonów metali [19]. Oporność na toksyczne działanie metali ciężkich za pośrednictwem metalotioneiny należy do rzadkości w świecie bakterii i dotychczas została zidentyfikowana jedynie u cyjanobakterii z rodzaju *Synechococcus* sp., u których warunkuje oporność na Cd(II), Zn(II) i Cu(II). Metalotioneina ta posiada mniej reszt cysteinowych w porównaniu do metalotionein zwierzęcych (9:20) [17] i jest kodowana przez gen *smtA*. Gen *smtA* jest indukowany na poziomie transkrypcji przez metale, a hamowany przez produkt genu *smtB*. Białko SmtB funkcjonuje jako trans-działający represor transkrypcyjny wyłączający ekspresję genu *smtA*. SmtB jest białkiem dimerycznym, zawierającym motyw helisa-pętla-helisa, podobnym do innych białek wiążących DNA [10]. U niektórych bakterii, np. *Pseudomonas putida*, wyodrębniono inne niskocząsteczkowe i bogate w cysteinę białka, zdolne do wiązania jonów metali ciężkich, które prawdopodobnie są spokrewnione z metalotioneinami [8].

3. Podsumowanie

Bakterie, odkąd powstały, są stale narażone na działanie metali ciężkich, które stanowią naturalny komponent środowiska. O długim ewolucyjnie kontakcie żywych komórek bakteryjnych z jonami metali ciężkich może świadczyć włączenie wielu metali w struktury makrocząstek, które są kluczowe dla przebiegu procesów metabolicznych, np. kobaltu jako atomu cen-

tralnego witaminy B₁₂, czy niklu w centrum aktywnym ureazy. Dodatkowo, intensywna działalność człowieka związana z przemysłem, rolnictwem i nieprawidłowym gospodarowaniem odpadami istotnie przyczyniła się do uruchomienia zdeponowanych w skałach metali ciężkich i w konsekwencji zanieczyszczenia na szeroką skalę wszystkich składowych środowiska, tj. gleby, wody i powietrza. Pod wpływem czynnika selekcyjnego w postaci jonów metali ciężkich, u bakterii wyewoluowały różnorodne systemy determinujące tolerancję wobec toksycznych metali ciężkich [8, 46]. Oporność na metale ciężkie może być realizowana dwoma sposobami: (i) poprzez blokowanie wnikania toksycznych jonów metali do cytoplazmy oraz (ii) uruchamianie mechanizmów detoksyfikacji jonów na terenie cytoplazmy. Oporność na jony metali ciężkich może mieć związek z modyfikacją przepuszczalności osłon komórkowych oraz wiązaniem jonów metali przez metabolity bakterii. Jeżeli jony metali wnikną do cytoplazmy bakterii, uruchamiane są mechanizmy ich detoksyfikacji. Jony metali mogą być usunięte poza komórkę za pomocą różnorodnych transporterów, wykorzystujących energię pochodzącą z hydrolizy ATP lub za pośrednictwem przenośników niewymagających nakładu energii, działających na zasadzie chemiosmotycznego gradientu stężeń. Ponadto, u niektórych bakterii toksyczne jony metali mogą być chelatowane przez niskocząsteczkowe białka na terenie cytoplazmy [24]. Wykształcenie przez bakterie mechanizmów oporności na metale ciężkie pozwala nie tylko na egzystowanie tych jednokomórkowych organizmów w zanieczyszczonym środowisku, ale również umożliwia ich wykorzystanie do oczyszczania skażonych terenów (bioremediacja) oraz pozyskiwania metali (biogórnictwo) [5, 55].

Piśmiennictwo

1. Aoyama M., Nagumo T.: Comparison of the effects of Cu, Pb, and As on plant residue decomposition, microbial biomass, and soil respiration. *Soil Sci. Plant Nutr.* **43**, 613–622 (1997)
2. Baker-Austin C., Wright M.S., Stepanauskas R., McArthur J.V.: Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.* **14**, 176–182 (2006)
3. Barkay T., Miller S.M., Summers A.O.: Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 355–384 (2003)
4. Bååth E.: Thymidine incorporation into macromolecules of bacteria extracted from soil by homogenization-centrifugation. *Soil Biol. Biochem.* **24**, 1157–1165 (1992)
5. Błaszczak M.K.: Mikroorganizmy w ochronie środowiska. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2007, s. 110–175
6. Bridges Ch.C., Zalups R.K.: Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **204**, 274–308 (2005)
7. Brown N.L., Stoyanov J.V., Kidd S.P., Hobman J.L.: The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 145–163 (2003)

8. Bruins M.R., Kapil S., Oehme F.W.: Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **45**, 198–207 (2000)
9. Busenlehner L.S., Pennella M.A., Giedroc D.P.: The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: structural insights into procaryotic metal resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 131–143 (2003)
10. Cook W.J., Kar S.R., Taylor K.B., Hall L.M.: Crystal structure of the cyanobacterial metallothionein repressor SmtB: a model for metalloregulatory proteins. *J. Mol. Biol.* **275**, 337–346 (1998)
11. Crupper S.S., Worrell V., Stewart G.C., Iandolo J.J.: Cloning and expression of CadD, a new cadmium resistance gene of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **181**, 4071–4075 (1999)
12. Diels L., Dong Q., van der Lelie D., Baeyens W., Mergeay M.: The *czc* operon of *Alcaligenes eutrophus* CH34: from resistance mechanism to the removal of heavy metals. *J. Ind. Microbiol.* **14**, 142–153 (1995)
13. Drewniak Ł., Skłodowska A.: Rola bakterii w biogeochemicznym cyklu arsenu. *Post. Mikrobiol.* **46**, 275–285 (2007)
14. Giller K.E., Witter E., McGrath S.P.: Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol. Biochem.* **30**, 1389–1414 (1998)
15. Inoue C., Sugawara K., Kusano T.: *merR* regulatory gene in *Thiobacillus ferrooxidans* is spaced apart from the *mer* structural genes. *Mol. Microbiol.* **5**, 2707–2718 (1991)
16. Jan A.T., Ali A., Mohd Q., Haq R.: Mercury pollution: an emerging problem and potential bacterial remediation strategies. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 1529–1537 (2009)
17. Ji G., Silver S.: Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern. *J. Ind. Microbiol.* **14**, 61–75 (1995)
18. Kabata-Pendias A., Pendias H.: Biogeochemia pierwiastków śladowych. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 1993, s. 13–88
19. Klaassen C.D., Liu J., Choudhuri S.: Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 267–294 (1999)
20. Kobayashi M., Shimizu S.: Cobalt proteins. *Eur. J. Biochem.* **261**, 1–9 (1999)
21. Kucharski R., Sas-Nowosielska A., Małkowski E.: Wybrane metody remediacji gleb a zawartość metali ciężkich w glebach i roślinach (w) Metale ciężkie w środowisku. Prace Instytutu Ekologii Terenów Uprzemysłowych, red. S. Hławiczko, Wyd. Ekonomia i Środowisko, Białystok, 2008, s. 122–150
22. Lakzian A., Murphy P., Turner A., Beynon J.L., Giller K.E.: *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* populations in soils with increasing heavy metal contamination: abundance, plasmid profiles, diversity and metal tolerance. *Soil Biol. Biochem.* **34**, 519–529 (2002)
23. Lebrun M., Audurier A., Cossart P.: Plasmid-borne cadmium resistance genes in *Listeria monocytogenes* are similar to *cadA* and *cadC* of *Staphylococcus aureus* and are induced by cadmium. *J. Bacteriol.* **176**, 3040–3048 (1994)
24. Ledin M.: Accumulation of metals by microorganisms – processes and importance for soil systems. *Earth-Sci. Rev.* **51**, 1–31 (2000)
25. Legatzki A., Franke S., Lucke S., Hoffmann T., Anton A., Neumann D., Nies D.H.: First step towards a quantitative model describing Czc-mediated heavy metal resistance in *Ralstonia metallidurans*. *Biodegradation*, **14**, 153–168 (2003)
26. Lloyd J.R., Lovley D.R.: Microbial detoxification of metals and radionuclides. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 248–253 (2001)
27. Majáre M., Bülow L.: Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *Trends Biotechnol.* **19**, 67–73 (2001)
28. Mathema V.B., Thakuri B.Ch., Sillanpää M.: Bacterial *mer* operon-mediated detoxification of mercurial compounds: a short review. *Arch. Microbiol.* **193**, 837–844 (2011)
29. Mergeay M.: Towards an understanding of the genetics of bacterial metal resistance. *Trends Biotechnol.* **9**, 17–24 (1991)
30. Miethke M., Marahiel M.A.: Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 413–451 (2007)
31. Misra T.K.: Bacterial resistance to inorganic mercury salts and organomercurials. *Plasmid*, **27**, 4–16 (1992)
32. Muller D., Lievreumont D., Simeonova D.D., Hubert J.C., Lett M.C.: Arsenite oxidase *aox* genes from a metal-resistant beta-proteobacterium. *J. Bacteriol.* **185**, 135–141 (2003)
33. Mulrooney S.B., Hausinger R.P. Nickel uptake and utilization by microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 239–261 (2003)
34. Neubauer U., Furrer G., Kayser A., Schulin R.: Siderophores, NTA, and citrate: potential soil amendments to enhance heavy metal mobility in phytoremediation. *Int. J. Phytoremediation*, **2**, 353–368 (2000)
35. Nies D.H.: Efflux-mediated heavy metal resistance in procaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 313–339 (2003)
36. Nies D.H., Silver S.: Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J. Ind. Microbiol.* **14**, 189–199 (1995)
37. Nordberg M.: Metallothioneins: historical review and state of knowledge. *Talanta*, **46**, 243–254 (1998)
38. Pal A., Paul A.K.: Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. *Ind. J. Microbiol.* **48**, 49–64 (2008)
39. Pao S., Paulsen I.T., Saier M.H.Jr.: Major Facilitator Superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1–34 (1998)
40. Parkhill J., B.G. Borell i wsp.: Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature*, **413**, 848–852 (2001)
41. Pitts K.E., Summers A.O.: Role of thiols in the bacterial organomercurial lyase. *Biochemistry*, **41**, 10287–10296 (2002)
42. Rajkumar M., Ae N., Prasad M.N.V., Freitas H.: Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnol.* **28**, 142–149 (2010)
43. Rasmussen L.D., Sørensen S.J.: Effects of mercury contamination on the culturable heterotrophic, functional and genetic diversity of the bacterial community in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **36**, 1–9 (2001)
44. Rensing Ch., Grass G.: *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 197–213 (2003)
45. Rensing Ch., Ghosh M., Rosen B.P.: Families of soft-metal-ion-transporting ATPases. *J. Bacteriol.* **181**, 5891–5897 (1999)
46. Rosen B.P.: Bacterial resistance to heavy metals and metalloids. *JBIC*, **1**, 273–277 (1996)
47. Rosen B.P.: Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eucaryotic and procaryotic microbes. *Comp. Biochem. Physiol. A*, **133**, 689–693 (2002)
48. Santamaria M., Diaz-Marreto A.R., Hernandez J., Uutierrez-Navarro A.M., Corzo J.: Effect of thorium on the growth and capsule morphology of *Bradyrhizobium*. *Environ. Microbiol.* **5**, 916–924 (2003)
49. Satarug S., Baker J.R., Urbenjapol S., Haswell-Elkins M., Reilly P.E.B., Williams D.J., Moore M.R.: A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicol. Lett.* **137**, 65–83 (2003)
50. Schlüter A., Heuer H., Szczepanowski R., Forney L.J., Thomas C.M., Pühler A., Top E.M.: The 64 508 bp IncP-1 b antibiotic multiresistance plasmid pB10 isolated from a waste-water treatment plant provides evidence for recombination between members of different branches of the IncP-1 b group. *Microbiology*, **149**, 3139–3153 (2003)
51. Shi W., Bischoff M., Turco R., Konopka A.: Long-term effects of chromium and lead upon the activity of soil microbial communities. *Appl. Soil Ecol.* **21**, 169–177 (2002)

52. Silver S., Phung L.T.: Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 753–789 (1996)
53. Silver S., Phung L.T.: A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 587–605 (2005)
54. Singh S.K., Grass G., Rensing C., Montfort W.R.: Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**, 7815–7817 (2004)
55. Słaba M., Długoński J.: Mikrobiologiczne usuwanie i odzyskiwanie metali ciężkich. *Post. Mikrobiol.* **41**, 167–183 (2002)
56. Słaba M., Paraszkiwicz K.: Mikroorganizmy w ochronie środowiska. Metale ciężkie (w) Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy w biotechnologii, ochronie środowiska i produkcji żywności, red. Z. Libudziński, K. Kowal, Z. Żakowska, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2008, s. 518–529
57. Solioz M., Stoyanov J.V.: Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 183–195 (2003)
58. Sutcliffe I.C.: A phylum level perspective on bacterial cell envelope architecture. *Trends Microbiol.* **18**, 464–470 (2010)
59. Sutherland I.W.: Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, **147**, 3–9 (2001)
60. Szczepanowski R., Braun S., Riedel V., Schneiker S., Krahn I., Pühler A., Schlüter A.: The 120 592 bp IncF plasmid pRSB107 isolated from a sewage-treatment plant encodes nine different antibiotic-resistance determinants, two iron-acquisition systems and other putative virulence-associated functions. *Microbiology*, **151**, 1095–1111 (2005)
61. Tauch A., Schlüter A., Bischoff N., Goesmann A., Meyer F., Pühler A.: The 79 370 bp conjugative plasmid pB4 consists of an IncP-1 backbone loaded with a chromate resistance transposon, the strA-strB streptomycin resistance gene pair, the oxacillinase gene bla (NPS-1), and a tripartite antibiotic efflux system of the resistance-nodulation-division family. *Mol. Genet. Genomics*, **268**, 570–584 (2003)
62. Tennstedt T., Szczepanowski R., Krahn I., Pühler A., Schlüter A.: Sequence of the 68 869 bp IncP-1 plasmid pTB11 from a waste-water treatment plant reveals a highly conserved backbone, a Tn402-like integron and other transposable elements. *Plasmid*, **53**, 218–238 (2005)
63. Valls M., de Lorenzo V.: Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 327–338 (2002)
64. Wang Y., Moore M., Levinson H.S., Silver S., Walsh C.T., Mahler I.: Nucleotide sequence of a chromosomal mercury resistant determinant from a *Bacillus* sp. with broad spectrum mercury resistance. *J. Bacteriol.* **171**, 83–92 (1989)
65. Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C. What are bacterial extracellular polymeric substances? (w) Microbial Extracellular Polymeric Substances red. J. Wingender, T.R. Neu, H.C. Flemming, Springer, Berlin, 1999, s. 1–20

Monika Staniszeńska^{1*}, Małgorzata Bondaryk¹, Wiesław Kurzątkowski¹

¹Independent Laboratory of Streptomyces and Fungi Imperfecti,
National Institute of Public Health-National Institute of Hygiene, Chocimska 24, 00-791 Warsaw, Poland

Wpłynęło w lutym 2013 r.

1. Introduction. 2. Biochemical properties of aminopeptidases. 3. Activation and regulation of the *C. albicans* leucine arylamidase. 4. Leucine arylamidase production by *C. albicans* and by other non-*albicans* yeast species. 5. Leucine arylamidase production and *C. albicans* yeast-to-hypha transition. 6. Conclusions

Abstract: *Candida albicans* is an opportunistic pathogen that frequently causes infections ranging from superficial mucosal lesions to disseminated or bloodstream infections. *Candida* infections are a problem of a growing clinical importance worldwide; therefore virulence factors of this pathogen have been extensively studied. This review focuses on the role and function of leucine arylamidase (Ape2) in *C. albicans*' virulence and pathogenesis in human infections. The L-leucine arylamidase is a member of metallo-peptidase group that removes the N-terminal L-leucine from peptide substrates. The hydrolytic enzymes play an important role in both colonization and invasion; moreover, it has been estimated that Ape2 facilitates penetration of *C. albicans* into the host tissue. Therefore, the comparison of Ape2 activity between *Candida* species might reveal their still unknown function during infection *in vivo*. As *C. albicans* can potentially cause superficial and systemic candidiasis with high mortality in immunocompromised patients, the involvement of this enzyme's activity in virulence (human tissues destruction) ought to be thoroughly evaluated in the future.

Rola arylamidazy leucynowej w wirulencji *Candida albicans*

1. Wstęp. 2. Biochemiczne właściwości aminopeptydaz. 3. Indukcja arylamidazy leucynowej w komórkach *C. albicans*. 4. Wytwarzanie arylamidazy leucynowej przez *C. albicans* i inne gatunki z rodzaju *Candida*. 5. Arylamidaza leucynowa a morfogeneza *C. albicans*. 6. Wnioski

Streszczenie: Oportunistyczny patogen *Candida albicans* jest przyczyną zakażeń skóry oraz błon śluzowych u ludzi jak również wieloukładowych kandydoz zagrażających życiu pacjentów. Zakażenia o etiologii *C. albicans* stanowią poważny problem kliniczny o wymiarze światowym. Częstość ich występowania, a także wysoka śmiertelność u chorych z immunosupresją spowodowały konieczność lepszego poznania czynników wirulencji *C. albicans*. Niniejsza praca przedstawia rolę arylamidazy leucynowej (Ape2) w wirulencji *C. albicans* (adhezji oraz inwazji do tkanek ludzkich). Enzymy hydrolityczne odgrywają rolę w procesie kolonizowania i inwazji morfotypów *C. albicans* do ludzkich tkanek. Według danych literaturowych arylamidaza leucynowa należy do grupy egzopeptydaz (trawi wiązanie w miejscu L-leucyny zlokalizowanej na N-końcu substratów białkowych). Dotychczas wykazano również udział Ape2 w inwazji ludzkich tkanek. Porównanie funkcji tego enzymu u różnych gatunków *Candida* pozwoli na dokładną analizę jego roli, jak dotąd nie poznanej, w patogenie kandydoz. Jeśli ze względu na częste zakażenia o etiologii *C. albicans* obarczone wysoką śmiertelnością, patogen ten stanowi przedmiot licznych badań, to szczególną uwagę należy poświęcić jednemu z jego czynników wirulencji tj., arylamidazie leucynowej i jej roli w inwazji i destrukcji tkanek.

Key words: *Candida albicans*, leucine arylamidase, virulence
Słowa kluczowe: arylamidaza leucynowa, *Candida albicans*, wirulencja

1. Introduction

Candida albicans is a common commensal that is part of the normal microflora of the oral cavity, urogenital, gastrointestinal and vaginal tract of healthy individuals [34]. However in immunocompromised hosts this opportunistic pathogen frequently causes infections ranging from superficial mucosal lesions to disseminated or bloodstream infections [29]. The rapid medicine progress over the last 30 years as well as the development of new surgery and transplantology techniques have led to an enormous increase in the number of immunocompromised individuals that are more susceptible to opportunistic *Candida* infections

[17, 34]. *Candida* infections are a problem of growing clinical importance worldwide, as the incidence of infections has increased dramatically over the past two to three decades, and this trend will inevitably continue into the 21st century [29]. By far, *Candida* remains the fourth most common hospital-acquired pathogen at the Intensive Care Units [34]. Both host and fungal attributes affect the development of *Candida* infections [36]. Moreover, factors such as the use of immunosuppressive agents, diabetes mellitus, AIDS, cancer chemotherapy, long-term catheterization, local disorders of the gastrointestinal tract, parenteral nutrition, mechanical ventilation, or organ transplantation enhance the risk of candidaemia [17, 34]. Most pathogens developed

* Autor korespondencyjny: Independent Laboratory of Streptomyces and Fungi Imperfecti, National Institute of Public Health-National Institute of Hygiene, 24 Chocimska, 00-791 Warsaw; tel.: +48 22 54 21 228; fax: + 48 22 849 74 84; e-mail address: mstaniszewska@pzh.gov.pl

Table I

Virulence attributes of *Candida albicans*

Virulence attribute	Putative virulence role	References
Adhesins (e.g. Als family, Hwp1, Int1) ^a	Adhesion and colonization	[2, 29, 32, 49]
Hypha formation	Adhesion, invasion, tissue damage	[23, 29, 41–42, 46]
Extracellular hydrolytic enzymes (e.g., Sap families, Plb, Lip families, Ape2)	Nutrient acquisition, invasion, tissue damage, evasion of host response	[29, 36–37, 43–44]
Phenotypic switching	Adhesion, evasion of host response	[1, 6, 15, 29]

^a Als, agglutinin-like sequence; Hwp1, hyphal cell wall protein 1; Int1, integrin-like protein; Sap, aspartic protease; Plb, Phospholipase B; Lip, lipases; Ape2, leucine arylamidase 2.

an effective set of putative virulence factors and strategies that enhance their ability to colonize host tissues, overcome host defenses and cause diseases [30]. Despite many years of genetic, biochemical and microscopical analyses, factors contributing to *C. albicans* pathogenesis are not fully known [5]. Virulence factors identified so far include such phenomena as biofilm formation, adhesion, yeast to hyphae morphogenetic transition, surface recognition molecules, phenotypic switching, hydrolytic enzyme production and secretion [29–30]. The reader is guided to several excellent papers on the topics of virulence attributes of *C. albicans* listed in Table I.

Hydrolytic activity is considered as a key virulence factor of *C. albicans* [29]. It was confirmed that among extracellular hydrolytic enzymes of this pathogen phospholipases, lipases and secreted aspartyl proteinases are linked to virulence [22, 36–37]. These enzymes not only facilitate adherence and tissue penetration, but also enhance invasion of the host [36, 48]. Furthermore, similar role is suspected for other *C. albicans* hydrolytic enzymes such as acid and alkaline phosphatase, esterase, esterase-lipase and leucine arylamidase Ape2 [48]. So far, most attention has been paid to secreted aspartyl proteinases [29–31, 36–37], however, contribution of other hydrolytic enzymes to *C. albicans*' virulence is also important. Thus, this review focuses on the characteristics and function of leucine arylamidase, a recently identified member of zinc-metallo aminopeptidase group. Below, we discuss whether secretion of Ape2 varies depending on the *C. albicans*' morphology and whether the enzyme influences *C. albicans*' virulence and disease prevalence.

2. Biochemical properties and regulation of aminopeptidases

Aminopeptidases can be subdivided into three groups: I) aminopeptidases in the strict sense which hydrolyze the first peptide bond in the polypeptide chain with the release of a single amino acid residue (aminoacyl- and iminoacyl peptidases [EC 3.4.11]); II) aminopeptidases which remove dipeptides or trip-

ptides (dipeptidyl- and tripeptidyl peptidases [EC 3.4.14]) from polypeptide chains; III) aminopeptidases which hydrolyze only di- or tripeptides (dipeptidases [EC 3.4.15] and those which hydrolyze tripeptides [EC 3.4.14.4]) [35].

These three groups of aminopeptidases consists of exopeptidases that have the ability to hydrolyze the N-terminal amino acids of oligopeptides or/ and proteins [9]. It has been shown previously [11] that these enzymes are vital for metabolic pathway regulation, cell maturation and turnover of proteins, including utilization of exogenous proteins as nutrient substances and elimination of non-functional proteins. They usually utilize a zinc ion for activity, however other metal ions like Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , and Mg^{2+} might also be involved [9]. Moreover, it has been demonstrated that aminopeptidases exist in both soluble and membrane-bound forms and can be identified in different cellular compartments and in the extracellular environment [9]. Their localization in subcellular compartments include the cytoplasm, lysosomes and membranes, however, aminopeptidases can also be secreted extracellularly into the medium [35]. These enzymes play an important role in cell maintenance; therefore, it is not surprising that they are widely distributed throughout the animal, plant and microorganism kingdoms [11]. Moreover, some of microbial aminopeptidases seem to contribute to virulence [35; 48]. According to S a n z [35], microbial aminopeptidases can be divided according to their specificities into (I) general aminopeptidases showing broad specificity (PepN, PepC, LAP/APE and PepS); (II) aminopeptidases of narrow specificity that selectively hydrolyse certain amino acid residues such as acidic residues (PepA) and methionine (MAP) and D-amino acid residues (DppA) or peptide bounds containing proline (PepI and PepP); (III) dipeptidases hydrolysing peptide bounds containing proline (PepQ and PepR); (IV) dipeptidases (PepV and PepDA) and tripeptidases (PepT) of broad specificity that only hydrolyse dipeptides or tripeptides, respectively, and (V) dipeptidyl peptidases showing specificity for N-terminal X-Pro. Moreover, microbial aminopeptidase activity is strongly influenced by environmental factors i.e., pH and tem-

perature [33]. The optimal pH conditions for activity of aminopeptidases ranges from pH=6 to 9, and the optimal temperature of enzyme assay coincides with the optimal growth temperature [33]. It was also described [33] that fungal aminopeptidases from *Aspergillus* sp. have high thermal stability.

Main types of microbial aminopeptidases include: PepN/Lysyl aminopeptidase; bleomycin hydrolase; aminopeptidase C (PepC); aminopeptidase A (PepA); PepS; CAP/PepA; leucine aminopeptidase/ arylamidase (Ape); aminopeptidase Y (yscI I); aminopeptidase M (MAP); aminopeptidase P (PepP); proline iminopeptidase PepI; D-stereospecific aminopeptidase DppA [35]. The present review is restricted to studies addressing the relationship between leucine arylamidase production and *C. albicans* pathogenicity.

3. Activation and regulation of the *C. albicans* leucine arylamidase

L-leucine arylamidases are metallo-peptidases which remove the N-terminal L-leucine from peptide substrates [8, 33]. These enzymes are members of the M1 or M17 peptidase families and, therefore, their nomenclature is quite complex [28]. The leucine arylamidases are highly conserved at the amino acid level and monomers assembled into a homo-hexameric enzyme [26]. The leucine arylamidase enzymes consist of two unrelated functional domains: a unique N-terminal domain, which might play a regulatory role and a well-conserved catalytic C-terminal domain [13]. Moreover, leucine arylamidase is a ubiquitous enzyme that was the first cytosolic aminopeptidase to be identified [35]. The Ape have a preference for catalyzing the hydrolysis of leucine residues (Leu), however, they can exhibit a broader substrate range including proline (Pro) but not arginine (Arg) or lysine (Lys) [26, 28, 35]. In animals leucine arylamidase belong to exopeptidase group [9]. Contrariwise, most of the microbial leucine arylamidase are intracellular enzymes, yet extracellular enzymes are found in filamentous fungi [33]. These enzymes are homohexamers, comprising two trimers stacked on top of one another [7, 13]. Moreover, their activity is dependant on metal ions as enzymatic reaction will not proceed unless an enzyme-metal complex is formed to which the substrate can be bound [13]. All aminopeptidases of M17 family, including leucine arylamidase, bind two metal ions, both essential for catalysis [13], but those ions differ among organisms. Usually, a zinc ion is utilized, but a number of other metal ions, including Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , and Mg^{2+} , can be involved [9]. In mammals, each monomer of leucine arylamidase enzyme binds two Zn^{2+} ions [7]. In plants Mn^{2+} -activated leucine arylamidase has been detected [12]. In

the case of microorganisms, Ku o et al. [24] proposed to classify microbial Ape into three groups depending on the ion used for catalysis; I) the leucine arylamidase enzymes containing at least one Zn^{2+} per monomer and displaying the characteristic peptide motif HEXXH i.e., the PepN aminopeptidases from *E. coli* and lactic acid bacteria; II) enzymes binding two closely located Zn^{2+} per monomer whose activity is strongly inhibited by bestatin; III) the leucine arylamidase enzymes containing two Co^{2+} per monomer i.e., the prolidase of *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris*, aminopeptidase-A of *L. lactis* subsp. *lactis*, a dipeptidase of *Lactobacillus sake*, and leucine arylamidase II of *B.(G.) stearothermophilus*.

While similar in primary structure, the animal, plant and prokaryotic leucine arylamidase enzymes appear to have distinct functions [12]. In microorganisms these enzymes might be involved in virulence [8]. The study by Carrol et al. [8] demonstrated that *Staphylococcus aureus* strains containing a mutation in the pepZ gene encoding leucine arylamidase are severely attenuated in virulence. Moreover, the same authors [8] described that *S. aureus* leucine arylamidase is required for survival inside human macrophages which also contribute to virulence. The microbial leucine arylamidase have been described in both Gram-positive and Gram-negative bacteria as well as in filamentous fungi [8, 11, 33]. Based on the present data (see the section below) it is highly probable that the main role of the *C. albicans* arylamidases is to provide nutrition to the cells aiding penetration and invasion.

4. Leucine arylamidase production by *Candida albicans* and by other non-*albicans* yeast species

The presence of leucine arylamidase (Ape) in both *C. albicans* and culture medium was first described by Kim et al. [19]. In this early study [19] both endogenous and exogenous Ape activities were evaluated. The exogenous Ape activity was shown to be much lower in comparison to the endogenous enzyme activity by ratios of 1:8 to 1:20, when referred to the protein concentration of the aliquots used for the assay. According to Kim et al. [19] the lower exogenous Ape activity in comparison to endogenous Ape may possibly reflect the liberation of the enzyme from dead or dying organisms rather than active enzyme secretion for purposes of extracellular digestion of nutrient substrates, but this conclusion was based on activity level only. Later studies [33] on Ape activity in filamentous fungi revealed their ability of extracellular Ape production. Moreover, Imbert et al. [16] demonstrated *C. albicans* metallo-peptidase activity in culture medium, suggesting that the enzyme can be secreted. Furthermore, Klinke et al. [20] described secretion mechanism for

arginine/alanine/leucine-specific metallo-aminopeptidase isolated from *C. albicans* indicating extracellular function of this enzyme. The authors [20] also ruled out the possibility CaApe2 plays a role in the degradation of human dentin and other collagen-based extracellular structures. The biological role of leucine arylamidase in yeast and factors regulating Ape activity are still not completely understood [13]. Kim et al. [19] indicated that Ape activity in *C. albicans* varies with the type of culture medium and growth phase, since Ape activity was higher in Sabouraud dextrose agar than in the liquid medium. Moreover, according to Bautista-Muñoz et al. [5] highest enzyme activity was found in the medium with proline as sole nitrogen source, which indicates higher enzyme production during nutritional stress since proline is considered non-preferential nitrogen source. The study of Kim et al. [19] revealed also that Ape activity was increased up to 24 hours of incubation during the active growth phase of the colonies. Those results stay in agreement with Bautista-Muñoz et al. [5] who indicated highest enzyme activity during logarithmic (6 h) and early stationary phases (12 h) of growth. The studies of Herrera-Camacho et al. [13] and Klinke et al. [20] indicated that Ape activity is strongly inhibited by bestatin (a peptide produced by *Streptomyces olivoreticuli*), while EDTA also displayed considerably high inhibition effect. Moreover, the results of Glowacka et al. [10] showed that Fir Siberian essential oil lowers *C. albicans* Ape activity as proved in api⁹Zym test.

The leucine aminopeptidase seems to be a new potential factor in the yeast pathogenicity. Therefore, in the last years attempts were made [5, 13, 20] to evaluate the proteolytic potential of yeasts by identifying novel aminopeptidases able to cleave leucine residues. The leucine arylamidase of *S. cerevisiae* has been described by Hirsch et al. [14]. In 2007 Herrera-Camacho et al. [13] reported the identification of new leucyl aminopeptidase in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. The enzyme was characterized as a hexameric manganese-dependent metallo-exopeptidase, named leucyl aminopeptidase yspII (LAP yspII) and classified as cytosolic leucyl aminopeptidase [13]. Moreover, the location of the gene coding LAP yspII enzyme was estimated to be in chromosome I of *S. pombe* [13]. The identified LAP yspII enzyme cleaved synthetic aminoacyl-4-nitroanilides at an optimum of pH 8.5 and preferred leucine and methionine as N-terminal amino acids. Although arginine and lysine were also recognized as substrates, they were cleaved at a much reduced rate [13]. Furthermore, a clear dependence on Mn²⁺ ion was found, however Mg²⁺ and Ni²⁺ also enhanced aminopeptidase activity [13]. As LAP enzymes are usually Zn²⁺ dependent [9], Herrera-Camacho et al. [13] reported that for LAP yspII from

S. pombe Zn²⁺ is among ions that had inhibitory effect on enzyme activity. The ability to inhibit cell surface leucine aminopeptidase of various species has been described for bestatin [47]. Herrera-Camacho et al. [13] tested the effect of protease inhibitors on *S. pombe* LAP yspII enzyme activity. As expected bestatin behaved as a competitive inhibitor of LAP yspII, and chelating agents such as chloroquine, EDTA and phenanthroline also reduced enzyme activity [13].

Imbert et al. [16] indicated that *C. albicans* metallo-peptidase located in the cell wall can degrade some of host extracellular matrix components, indicating its potential role in pathogenesis. In 2008 Klinke et al. [20] reported the identification of arginine/alanine/leucine-specific metallo-aminopeptidase from *C. albicans* (CaApe2). This enzyme was isolated from the cell wall as a result of secretion and acted on N-terminal arginine, alanine and leucine residues as substrates for hydrolysis. Moreover, the secretion of this novel enzyme suggested its extracellular function [20]. The optimal conditions for CaApe2 activity were estimated to be pH = 7.2 and temperature of 30°C [20]. Furthermore, according to Klinke et al. [20] the enzyme should exhibit 85% of its maximum catalytic activity at the host body temperature 37°C, which suggests its role during infection. Similarly as in the study of Herrera-Camacho et al. [13] bestatin proved to be effective on CaApe2 activity even in micromolar concentrations [20]. Moreover, EDTA and phenanthroline also strongly inhibited CaApe2-dependant peptide hydrolysis. Contrariwise, the pepstatin A and PMSF – the known inhibitors of aspartic and serine proteases respectively, had no effect on CaApe2 activity [20]. The CaApe2 enzyme has a broader substrate specificity when compared to the *Saccharomyces cerevisiae* aminopeptidases *S. cerevisiae* two main aminopeptidases (API) – yscI and yscII encoded by *API1* and *API2* genes, respectively [14, 21]. The *API* yscI is an alanine/arginine specific aminopeptidase which lacks the ability to cleave leucine residues [21], while the *API* yscII has the activity of leucine/lysine specific aminopeptidase [14]. These distinct functions might be the result of the whole-genome duplication event in evolution history of *Saccharomyces* [50]. The most common outcome of duplication event is subfunctionalization of proteins encoded by the duplicated genes [50] only small fraction of the genes is retained in duplicate and thus. In contrast to aminopeptidases of *S. cerevisiae*, CaApe2 combines the substrate specificities of those aminopeptidases [20]. This broader substrate specificity might be the result of the fact that *C. albicans* is unlikely to have undergone whole genome duplication [25]. The extracellular role of Ape2 in *C. albicans* is still unknown, however this enzyme may support fungal growth and proliferation by providing free amino acids required for metabolism [20].

Enzymatic activity has been recognized as one of the factors influencing the course of *Candida* infection [3]. As hydrolytic enzymes play an important role in both colonization and invasion, comparison of hydrolytic activity between *Candida* species might enlighten their role during infection [3]. Therefore, in last decade many authors examined hydrolytic activity of *C. albicans* and others non-*albicans Candida* strains using the api[®]Zym test [3, 10, 18, 22, 27, 39, 48]. Moreover, the activity of candidal leucine arylamidase has received more attention in the recent studies (Table II, Table III). According to Łukaszuk et al. [27], 89–94% of tested *C. albicans* clinical isolates, displayed hydrolytic activity. Further-

more, leucine arylamidase, esterase lipase and esterase were enzymes with the highest activity in strains isolated from cancer patients [27]. These results are in agreement with other studies [4, 22] which also showed high activity of these enzymes in *C. albicans* clinical isolates indicating their role in *Candida* spp. virulence. Moreover, according to Vidotto et al. [48], leucine arylamidase facilitates penetration of *C. albicans* into the host tissue. The recent studies of *Candida* sp. enzymatic activity conducted on clinical isolates have shown that *C. albicans* Ape2 activity is higher (Table II) than in other non-*albicans Candida* species (Table III). Moreover, *C. albicans* Ape2 activity varied among isolates

Table II

Comparison of *Candida albicans* leucine arylamidase activity estimated by apiZym test in various studies

Material used (no. of strains tested)/ strain isolation source	Activity in apiZym scale	Statistic method	Mean activity [nmoles]	Reference
Sputum (48)/ LC, COPD patients	4,5 ± 0,6	Mann-Whitney test	30–40	[3]
Swab (27)/ OO of HIV patients	4,96			[48]
Urether (65)	3,75±0,13	Wilcoxon test	20–30	[22]
Swab (92)/ OO of cancer patients	4±1		30	[27]
Swab (92)/ OO of cancer patients	3,9±0,9		20–30	
Swab (6)/ pharyngeal mucosa, swab (1)/ tongue, peritoneal fluid (3), sputum (4), ear secretion (1), urine (4), stools (2), blood (1), after-surgery wound secretion (2)	4,04		30–40	[10]
Blood (6), swab (5)/ drain, swab (9)/ OO, swab (6)/ vagina, pancreas samples (1), aspirate samples (1), swab (4)/ wound, stool (3), urine samples (1)	3–5	Cohen s kappa coefficient	20–40	[39]

Activity in apiZym 0–5 scale, where 0 is 0 nmol; 1 is 5 nmol; 2 is 10 nmol; 3 is 20 nmol; 4 is 30 nmol; and 5 is ≥ 40 nmol; LC, lung cancer; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; OO, oral ontocenosis; HIV, human immunodeficiency virus.

Table III

Comparison of non-*albicans* spp. leucine arylamidase activity estimated by apiZym test in various studies

<i>Candida</i> species	Material used (no. of strains tested)/ strain isolation source	Activity in apiZym scale	Statistic method	Mean activity [nmoles]	Reference
<i>glabata</i>	Urether (10)	1,2±0,13	Wilcoxon test	5–10	[22]
<i>krusei</i>	Urether (4)	1,75±0,75		5–10	
	Swab (1)/ pharyngeal of LTR	5	–	≥40	[18]
	Swab (1)/ nose of LTR				
	Swab (1)/ drain of LTR				
	Feces (1) of LTR				
	Swab (1)/ drain of LTR	1		5	
	Bile (1) of LTR			20	
	Fluid (1)/ abdominal cavity of LTR			3	
<i>tropicalis</i>	Urether (2)	4,5 ± 0,5		Wilcoxon test	
<i>kefyr</i>	Urether (1)	0	0		
<i>rugosa</i>	Urether (1)	4,5 ± 0	30–40		
<i>dubliniensis</i>	Swab (26)/ OO of HIV patients	4,7	Mann-Whitney test		[48]

Activity in apiZym 0–5 scale, where 0 is 0 nmol; 1 is 5 nmol; 2 is 10 nmol; 3 is 20 nmol; 4 is 30 nmol; and 5 is ≥ 40 nmol; LC, lung cancer; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; HIV, human immunodeficiency virus; LTR, liver transplant recipients; OO, oral ontocenosis; – none statistic method used.

from different sources. Still the knowledge about these enzymes and their role in yeasts, especially in *Candida* spp. is limited. Thus, the construction of *ape2Δ* mutant strains is expected to provide an experimental tool which is required to analyze the enzyme activity in the virulence of *C. albicans*. Therefore, the *in vivo* and *in vitro* studies of CaApe2 activity in the future should shed more light on morphotypes strategies and adaptation to the host niches.

5. Leucine arylamidase production and yeast-to-hypha transition

Among the factors contributing to the pathogenicity of yeast, hydrolytic enzymes play a significant role during infection [27]. One of the most extensively studied virulence trait of *C. albicans* is its ability to form true hyphae helping to invade the host tissues and cause deep-seated infections [23]. Our recent studies have provided evidence for true hyphae formation under human serum influence at human body temperature. We established that hyphae are essential elements providing the structural integrity of fungal-ball model, which may be expected to play a role in bloodstream infections [39–42]. Furthermore, our comparative analysis of morphogenesis mutants and clinical isolates showed that Efg1 is required for human serum-induced cell growth and morphological switching (forthcoming publication). Our current studies shed light on the role of *C. albicans* hyphal morphologies in biofilm formation at the surface of intestinal epithelial cells (Fig. 1). Moreover, our data strongly suggest that the epithelial cell type (cell line Caco-2, ATTC) influences the behaviour of *C. albicans* hyphal cells attached to their surface. Previous studies [38–39] have shown that the high invasiveness of hyphal forms is associated with the expression of numerous hydrolytic enzymes regarded as virulence factors. Also, it has been confirmed that a distinct set of SAP genes is expressed during candidal infection [36]. Moreover, aspartic protease isoenzymes Sap1-3, Sap4-6 exhibit a higher expression level in true hyphae compared with blastoconidial cells [38]. However, detailed information on leucine arylamidase gene (*APE*) expression in different pleomorphic forms of *C. albicans* is still not available. Significantly, an intriguing phenomenon has recently been revealed by us [39], namely satisfactory agreement ($\kappa=0.770$) between the levels of Ape activity for the two examined pleomorphic (blastoconidial and hyphal) forms was observed. By contrast, results obtained by Bautista-Muñoz et al. [5] suggested the participation of this enzyme during dimorphism as its activity increased during the formation of germ tube and pseudohyphae. Yet, the highest enzyme activity was detected during the true hyphae formation [5]. Indeed,

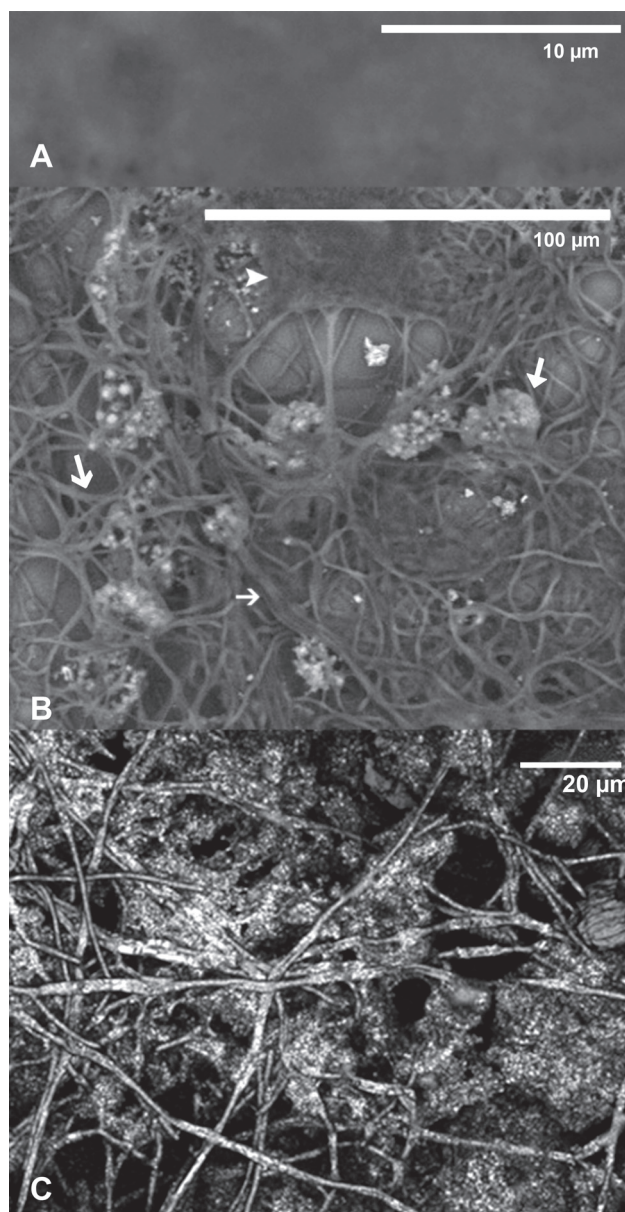


Fig. 1. The architecture of mono-species biofilm (18 h) of *Candida albicans* at the surface of Caco-2 cell monolayer covering glass slides in 24-well plates. Adherence pattern of *C. albicans* strains showing forms of uniform morphology (true hyphae). (A) Scanning electron microscopy (SEM) image of Caco-2 monolayer with no biofilm (control). (B, C) The cell line treated with blastoconidial cells resulted in hyphal biofilm covering cell line. (B) SEM image of *C. albicans* strain SC5314 mature biofilm (18 h). *C. albicans* hyphal forms (open arrows) appear adherent to Caco-2 monolayer. Adherent filamentous forms are able to form aggregate (arrow) at the surface of intestinal cells. The extracellular material is visible (arrowhead) (C) Confocal laser scanning electron (CLSM) image of *C. albicans* mutant strain $\Delta sap1-2$ biofilm grown for 18 h on Caco-2 monolayer. True hyphal forms (open arrows) and extracellular material (arrowhead) are condensed

we suggest that it may be related to the role of the various morphotypes in particular steps of pathogenesis. Such pattern shared by two pleomorphic forms may be virulence a marker of both morphotypes. For clinical

benefits, this phenomenon ought to be explored in further studies. Moreover, according to Vidotto et al. [48], Ape facilitates penetration of *C. albicans* into the host tissue. Taking into consideration the Ape activity, it seems that both morphotypes play a similar role in virulence. Whether Ape affects morphogenesis in *C. albicans* or plays an essential role in virulence still needs to be analyzed. In our opinion, elucidation of factors that influence leucine arylamidase activity could lead to a deeper understanding of the mechanisms that underpin pathogenicity of *C. albicans*. Moreover, we have undertaken further experiments based on the quantification of the *APE2* gene expression level in clinical samples from patients suffering from *Candida* infection. These studies should shed some light on the possible role of these proteins as determinants of *Candida* virulence and will also allow for the assessment of Ape contribution in the pathogenesis process. Furthermore, better understanding of the role and function of leucine arylamidase in *C. albicans* infections will help to design new arylamidase inhibitors with potential anticandidal activity.

6. Conclusions

The leucine arylamidase (Ape) belongs to metalloproteases which remove the N-terminal L-leucine from peptide substrates [33]. These hydrolytic enzymes are widely distributed throughout the animal, plant and microorganism kingdoms [11]. In microorganisms the enzymes may play a role in virulence [8]. Biological role of Ape in yeasts is still not fully understood [13], however this enzyme might be involved in candidal pathogenesis. According to some authors leucine arylamidase facilitates penetration of *C. albicans* into the host tissue and for that reason further studies are required.

Since *C. albicans* infections are associated with high mortality in immunocompromised patients, they remain a serious problem worldwide. Therefore, the role of leucine arylamidase activity in virulence (human tissue destruction) ought to be evaluated in future.

Acknowledgement

Our work was supported by the research project 28/EM founded by the National Institute of Public Health-National Institute of Hygiene

References

1. Antony G., Saralaya V., Bhat G.K., Shenoy S.M., Shivananda P.G.: Effect of phenotypic switching on expression of virulence factors of *Candida albicans* causing candidiasis in diabetic patients. *Rev. Iberoam. Micol.* **26**, 202–205 (2010)
2. Argimón S., A.J.P. Brown et al.: Developmental regulation of an adhesin gene during cellular morphogenesis in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eucaryot. Cell*, **6**, 682–692 (2007)
3. Batura-Gabryel H., Młynarczyk W.: Hydrolytic activity of *Candida* strains and oral candidiasis in lung cancer and COPD patients. *Mikol. Lek.* **7**, 77–82 (2000)
4. Batura-Gabryel H., Brajer B., Kuźniar B., Młynarczyk W.: Can hydrolytic activity of *Candida* strains isolated from COPD patients change with the basic disease progression? *Post. Derm. Alerg.* **3**, 148–55 (2003)
5. Bautista-Muñoz C., Hernández-Rodríguez C., Villa-Tanaa L.: Analysis and expression of STE3ca gene encoding a putative X-propyl dpeptidyl aminopeptidase from *Candida albicans*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **45**, 459–469 (2005)
6. Brand A.: Hyphal growth in human fungal pathogens and its role in virulence. *Int. J. Microbiol.* 2012; doi:10.1155/2012/517529.
7. Burley S.K., David P.R., Taylor A., Lipscomb W.N.: Molecular structure of leucine aminopeptidase at 2.7-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 6878–6882 (1990)
8. Carroll R.K., Robison T.M., Rivera F.E., Davenport J.E., Jonsson I.M., Florczyk D., Tarkowski A., Potempa J., Koziol J., Shaw L.N.: Identification of an intracellular M17 family leucine aminopeptidase that is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect.* 2012; doi:10.1016/j.micinf.2012.04.013
9. Chen S.H., Cao M.J., Su W.J., Wu G.P.: Purification and characterization of a novel leucine aminopeptidase from the earthworm *Eisenia foetida*. *Process Biochem.* **46**, 1641–1648 (2011)
10. Głowacka A., Wittek N., Bednarek-Gejo A., Tyczkowska-Sieroń E., Bartoszko-Tyczkowska A., Trojanowska D., Budak A.: Evaluation of the potential effect of the Fir Siberian essential oil modulator of proteolytic activity of *Candida albicans* isolated from several biological materials. *Mikol. Lek.* **16**, 220–223 (2009)
11. Gonzales T., Robert-Baudouy J.: Bacterial aminopeptidases: properties and functions. *FEMS Microbiol.* **18**, 319–344 (1996)
12. Gu Y.Q., Walling L.L.: Specificity of the wound-induced leucine aminopeptidase (LAP-A) of tomato. Activity on dipeptide and tripeptide substrates. *Eur. J. Biochem.* **267**, 1178–1187 (2000)
13. Herrera-Camacho I., Rosas-Murrieta N.H., Rojo-Domínguez A., Millán L., Reyes-Leyva J., Santos-López G., Suárez-Rendueles P.: Biochemical characterization and structural prediction of a novel cytosolic leucyl aminopeptidase of the M17 family from *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS J.* **274**, 6228–6240 (2007)
14. Hirsch H.H., Saurez Rendueles P., Achstetter T., Wolf D.H.: Aminopeptidase yscII of yeast. Isolation of mutants and their biochemical and genetic analysis. *Eur. J. Biochem.* **173**, 589–598 (1988)
15. Huang G., Srikantha T., Sahni N., Yi S., Soll D.R.: CO₂ Regulates White-to-Opaque Switching in *Candida albicans*. *Curr. Biol.* **19**, 330–334 (2009)
16. Imbert C., Kauffmann-Lacroix C., Daniault G., Jacquemin J.L., Rodier M.H.: Effect of matrix metalloprotease inhibitors on the 95kDa metalloprotease of *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**, 1007–1010 (2002)
17. Karkowska-Kuleta J., Rapala-Kozik M., Kozik A.: Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim. Polon.* **56**, 211–224 (2009)
18. Kawecki D., Swoboda-Kopec E., Dabkowska M., Stelmach E., Wroblewska M., Krawczyk M., Blachnio S., Luczak M.: Enzymatic variability of *Candida krusei* isolates in a course of fungal infection in a liver transplant recipient. *Transplant. Proc.* **38**, 250–252 (2006)
19. Kim Y.P., Adachi K., Chow D.: Leucine aminopeptidase in *Candida albicans*. *J. Invest. Dermatol.* **38**, 115–116 (1962)
20. Klinke T., Rump A., Pönisch R., Schellenberger W., Müller E.C., Otto A., Klimm W., Kriegl T.M.: Identification and characterization of CaApe2 – a neutral arginine/alanine/leucine-specific

- metallo-aminopeptidase from *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* **8**, 858–869 (2008)
21. Klionsky D.J., Cueva R., Yaver D.S.: Aminopeptidase I of *Saccharomyces cerevisiae* is localized to the vacuole independent of the secretory pathway. *J. Cell Biol.* **119**, 287–299 (1992)
 22. Krajewska-Kula E., Łukaszuk C., Niczyporuk W., Trybuła J.: Evaluation of activity of selected hydrolytic enzymes of the yeast-like fungi of *Candida* isolated from urether. *Mikol. Lek.* **5**, 165–170 (1998)
 23. Kumamoto C.A., Vines M.D.: Alternative *Candida albicans* life-styles: growth on surfaces. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**, 113–133 (2005)
 24. Kuo L.Y., Hwang G.Y., Lai Y.J., Yang S.L., Lin L.L.: Overexpression, purification, and characterization of the recombinant leucine aminopeptidase II of *Bacillus stearothermophilus*. *Curr. Microbiol.* **47**, 40–45 (2003)
 25. Langkjaer R.B., Clifton P.F., Johnston M., Piskur J.: Yeast genome duplication was followed by asynchronous differentiation of duplicated genes. *Nature*, **421**, 848–852 (2003)
 26. Liu B.X., Du X.L., Zhou L.G., Hara K., Su W.J., Cao M.J.: Purification and characterization of a leucine aminopeptidase from the skeletal muscle of common carp (*Cyprinus carpio*). *Food Chem.* **108**, 140–147 (2008)
 27. Łukaszuk C., Krajewska-Kula E., Niczyporuk W., Theodosopoulou E., Hatzopulu A., Krawczuk-Rybak M., Wojtukiewicz M.: Variations of enzymatic activity and biotypes of the yeast like fungi strains isolated from cancer patients. *Roczniki AMB*, **50** (Suppl.1), 16–19 (2005)
 28. Mikiko M., Fowler J.H., Walling L.L.: Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. *Biol. Chem.* **387**, 1535–1544 (2006)
 29. Naglik J.R., Challacombe S.J., Hube B.: *Candida albicans* Secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 400–428 (2003)
 30. Naglik J.R., Tsiachlakis E., Challacombe S.J.: *Candida* secreted aspartyl proteinases – expression and function during infection. *Mikol. Lek.* **11**, 139–144 (2004)
 31. Naglik J.R., B. Hube i wsp.: Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiology*, **154**, 3266–3280 (2008)
 32. Nails H., Kuchariková S., Řičicová M., Van Dijck P., Deforce D., Nelis H., Coenye T.: Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and -independent gene expression. *BMC Microbiol.* 2010; doi: 10.1186/1471-2180-10-114
 33. Nampoothiri K.M., Nagy V., Kovacs K., Szakacs G., Pandey A.: L-leucine aminopeptidase production by filamentous *Aspergillus* fungi. *Lett. Appl. Microbiol.* **41**, 498–504 (2005)
 34. Pfaller M.A., Diekema D.J.: Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 133–163 (2007)
 35. Sanz Y. Aminopeptidases. (w) Industrial Enzymes, red. J. Polaina, A.P. MacCabe; Springer Dordrecht, 2007, s. 243–260.
 36. Schaller M., Borelli C., Korting H.C., Hube B.: Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*, **48**, 365–377 (2005)
 37. Schild L., Heyken A., de Groot P.W.J., Hiller E., Mock M., de Koster C., Horn U., Rupp S., Hube B.: Proteolytic cleavage of covalently linked cell wall proteins by *Candida albicans* Sap9 and Sap10. *Eukaryot. Cell*, **10**, 98–109 (2011)
 38. Staniszevska M.: Search for *Candida albicans* virulence factors. Dissertation, National Institute of Public Health-National Institute of Hygiene, Warsaw 2009
 39. Staniszevska M., Rabczenko D., Kurzażkowski W.: Discrimination between the enzymatic activities of *Candida albicans* pleomorphic forms determined using the api[®]ZYM test. *Mycoses*, **54**, e744–e750 (2011a)
 40. Staniszevska M., Bondaryk M., Kurzażkowski W.: Morphotypes of *Candida albicans*. Phase-contrast microscopy. *Mikol. Lek.* **18**, 5–10 (2011b)
 41. Staniszevska M., Bondaryk M., Siennicka K., Kurzażkowski W.: Ultrastructure of *Candida albicans* pleomorphic forms: Phase-contrast microscopy, scanning and transmission electron microscopy. *Pol. J. Microbiol.* **61**, 129–135 (2012)
 42. Staniszevska M., Bondaryk M., Siennicka K., Kurzażkowski W.: *Candida albicans* morphotypes. Scanning electron microscopy. *Candida albicans* morphogenesis. *Mikol. Lek.* **19**, 53–56 (2012)
 43. Staniszevska M., Bondaryk M., Siennicka K., Piłat J., Schaller M., Kurzażkowski W.: Role of aspartic proteinases in *Candida albicans* virulence. Part I: Substrate specificity of aspartic proteinases and *Candida albicans* pathogenesis. *Post. Mikrobiol.* **51**, 127–135 (2012c)
 44. Staniszevska M., Bondaryk M., Siennicka K., Piłat J., Schaller M., Kurzażkowski W.: Role of aspartic proteinases in *Candida albicans* virulence. Part II: expression of SAP1-10 aspartic proteinase during *Candida albicans* infectins *in vivo*. *Post. Mikrobiol.* **51**, 137–142 (2012d).
 45. Staniszevska M., Bondaryk M., Swoboda-Kopeć E., Siennicka K., Sygitowicz G., Kurzażkowski W.: *Candida albicans* morphogenesis revealed by scanning electron microscopy analysis. *Braz. J. Microbiol.* 2013, 3 (accepted for publication).
 46. Sullivan D.J., Moran G.P.: Differential virulence of *Candida albicans* and *C. dubliniensis* A role for Tor1 kinase? *Virulence*, **2**, 77–81 (2011)
 47. Umezawa H., Aoyagi T., Suda H., Hamada M., Takeuchi T.: Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B, produced by actinomycetes. *J. Antibiot.* **29**, 97–99 (1976)
 48. Vidotto V., Pantón J., Aoki S., Quindós G., Mantoan B., Pugliese A.: Differences in extracellular enzymatic activity between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates. *Rev. Iberoam. Micol.* **21**, 70–74 (2004)
 49. Wächter B., Wilson D., Haedicke K., Dalle F., Hube B.: From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. *PLOS ONE*, 2011; doi:10.1371/journal.pone.0017046
 50. Wolfe K.H., Shields D.C.: Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature*, **387**, 708–713 (1997)

Agnieszka Zabłotni^{1*}, Anna Dziadosz^{**}

¹ Zakład Mikrobiologii Ogólnej Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź

Wpłynęło w marcu 2013 r.

1. Wprowadzenie. 2. Warunki życia i przystosowanie do nich. 2.1. Psychrofile. 2.2. Termofile. 2.3. Acidofile. 2.4. Alkalifile. 2.5. Halofile. 2.6. Piezofile. 3. Z ekstremofilami w przyszłość – biotechnologiczne możliwości wykorzystania. 4. Podsumowanie

Extremophiles – microorganisms with the past and the future

Abstract: Extremophilic microorganisms can live and grow under extreme conditions. They exist in many natural, as well as human made habitats characterized by an elevated or low temperature, extreme pH value, high salt concentration and hydrostatic pressure. They represent Bacteria, Archaea and Eucarya domains. Many of them are polyextremophiles. Extremophilic microorganisms use a variety of strategies for survival under unfavourable conditions. Their structural and physiological features have been studied for many years and a novel application area for extremophilic enzymes and other products have been found. A range of new applications is still in development.

1. Introduction. 2. Living conditions and adaptation to them. 2.1 Psychrophiles. 2.2. Thermophiles. 2.3. Acidophiles. 2.4. Alkaliphiles. 2.5 Halophiles. 2.6. Piezophiles. 3. The future with extremophiles – biotechnological potential for use. 4. Abstract

Słowa kluczowe: ekstremofile, poliekstremofile, środowiska skrajne

Key words: extremophiles, polyextremophiles, extreme environments

1. Wprowadzenie

Według słownika synonimów [7] ekstremalny oznacza: skrajny, krańcowy, radykalny, ale także wyjątkowo trudny, a w odniesieniu do wielkości matematycznej, mierzalnej: minimalny lub maksymalny. W tym kontekście, środowiska skrajne to takie, w których panujące warunki fizyczne lub chemiczne (bądź też jedno i drugie) przyjmują wartości skrajne.

Środowiska cechujące się ekstremalnymi warunkami znane są od dawna. Jako typowe przykłady można wymienić tu chociażby: gorące źródła, rejony ujść hydrotermalnych na dnie oceanów, zimne wody polarne, ale także silnie zasolone jeziora śródlądowe, czy nawet kwaśne odpływy wód kopalnianych. Przez długi czas obszary takie uważane były za pozbawione jakichkolwiek organizmów – właśnie ze względu na panujące w nich radykalne warunki, które z antropocentrycznego punktu widzenia nie pozwalały na egzystencję żywych organizmów. Wartości parametrów fizycznych czy chemicznych we wspomnianych środowiskach, drastycznie odbiegające od tych, które powszechnie uznawano za „normalne” czy „fizjologiczne”, były tylko jedną z przyczyn traktowania ich jako jałowe. Drugą przyczyną stała się jasna wraz z postępującym rozwojem metod izolacji i hodowli drobnoustrojów. Możliwość dobrania odpo-

wiednich podłoży, stworzenia i utrzymania warunków typowych dla środowisk skrajnych i przede wszystkim zastosowanie technik molekularnych, pozwoliły wykazać nie tylko obecność, ale także możliwość rozwoju wielu różnych organizmów w tych środowiskach [13]. Po raz pierwszy terminu „ekstremofile” na określenie organizmów zasiedlających wspomniane środowiska użył w 1974 roku MacElroy i od tego czasu na stałe wszedł on do terminologii biologicznej. Do grupy ekstremofili zaliczani są nieliczni przedstawiciele organizmów eukariotycznych (glonów, grzybów czy pierwotniaków), a najliczniej reprezentują ją organizmy prokariotyczne, zarówno przedstawiciele domeny Archaea jak i Bacteria, chociaż archeony stanowią większość [11–13, 33].

Podział na określone grupy w obrębie ekstremofili wynika z działających na nie w danym środowisku czynników fizycznych lub/i chemicznych o skrajnych wartościach. Do czynników tych należą przede wszystkim: temperatura, pH, zasolenie oraz ciśnienie hydrostatyczne. Restrykcyjne wartości poszczególnych czynników bywają warunkiem koniecznym funkcjonowania ekstremofili, to jest: właściwego przebiegu procesów metabolicznych i ich namnażania. Dlatego kwestią sporną bywa włączanie do ekstremofili organizmów opornych na wysokie stężenia jonów metali ciężkich, promieniowanie UV, a także promieniowanie przenikliwe, czy

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Ogólnej Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16; tel. (042) 635 44 69; fax: (42) 665 58 18; e-mail: agzab@biol.uni.lodz.pl

** Anna Dziadosz (studentka Uniwersytetu Łódzkiego)

niską zawartość wody, ponieważ organizmy zdolne do wzrostu w takich warunkach mogą równie dobrze rozwijać się w środowiskach, w których czynniki te nie działają. Sugeruje się więc traktownie ich raczej jako organizmów o dość szerokim spektrum tolerancji, niż organizmów ekstremalnych [33]. W wielu przypadkach ekstremofile żyją w środowiskach, w których wystawione są na działanie więcej niż jednego czynnika ekstremalnego – takie organizmy nazywamy poliekstremofilami [8, 33]. Jako przykład można tu wymienić choćby mikroorganizmy głębin oceanicznych (niska temperatura i bardzo wysokie ciśnienie hydrostatyczne), chemolitotrofy występujące w okolicach podwodnych ujść hydrotermalnych (panuje tutaj zarówno wysokie ciśnienie hydrostatyczne, bardzo wysoka temperatura jak i niskie pH), czy drobnoustroje rozwijające się w gorących, silnie zakwaszonych źródłach [5, 54, 95].

W dalszej części artykułu opisane zostaną mikroorganizmy ekstremofilne i środowiska w których żyją, ich przystosowania do panujących tam warunków oraz możliwości biotechnologicznego wykorzystania tych drobnoustrojów.

2. Ekstremofile – warunki życia i przystosowanie do nich

Ekstremofile zależnie od działających na nie fizycznych i chemicznych czynników środowiskowych podzielono na sześć głównych grup. Są nimi: psychro- i termofile zdolne do wzrostu odpowiednio w niskiej i wysokiej temperaturze, acido- i alkalofile żyjące w niskim i wysokim pH, piezofile występujące w głębinach morskich charakteryzujących się wysokim ciśnieniem hydrostatycznym i halofile – typowe dla środowisk o wysokiej zawartości soli.

2.1. Psychrofile

Termin „psychrofile” został po raz pierwszy zaproponowany już w 1902 roku przez Schmidt-Nielsen a i odnosił się do organizmów zdolnych do wzrostu i namnażania w temperaturze 0°C [42]. Obecnie, zgodnie z propozycją Mority [55], za mikroorganizmy psychrofilne uznaje się takie, które nie rosną w temperaturze powyżej 20°C, a optymalne warunki do ich rozwoju stwarza temperatura poniżej 15°C. Oddzielną grupę stanowią zaś drobnoustroje psychrotolerancyjne, które co prawda są zdolne do wzrostu w temperaturze poniżej 5°C, ale optymalna temperatura ich wzrostu mieści się w zakresie 20–25°C. Nie ma więc wątpliwości, że organizmy psychrofilne to inaczej organizmy środowisk zimnych – a tym samym środowisk, które można uznać za dominujące na Ziemi [13, 69]. Psychrofile izolowane są z takich miejsc jak: lody

Antarktyki czy Arktyki, lodowce, wieczne zmarzliny, stale zimne wody nie tylko regionów polarnych, ale też głębin oceanicznych i morskich czy nawet wodonośne, podziemne warstwy skał. Pozyskuje się je także z próbek pobieranych wysoko w górach i w jaskiniach [4, 13, 18, 30]. Bardzo szczególnymi psychrofilami są mikroorganizmy, dla których w ostatnich latach zaproponowana została nazwa eutektofile. Są nimi bakterie, które żyją w przestrzeni na granicy ciekłej i stałej fazy kryształków lodu [18]. Mnogość środowisk, w których występują sprawia, że psychrofile uznawane są za najliczniejsze z ekstremofili pod względem różnorodności czy rozmieszczenia, a także wytwarzania biomasy [64]. Oprócz wyżej wymienionych naturalnych środowisk, psychrofile rozwijają się także w miejscach powstałych dzięki działalności człowieka. Dobrym przykładem mogą tu być zbiorniki z wodą w układach chłodzenia i zbiorniki przetrzymywania mleka [13]. Warto tu przypomnieć, że w środowiskach zimnych rzadko kiedy temperatura jest jedynym restrykcyjnym czynnikiem – w morzach i oceanach dochodzi jeszcze wysokie ciśnienie hydrostatyczne, w innych miejscach np. wysokie stężenie NaCl. W większości przypadków organizmy psychrofilne zaliczyć można więc do wspomnianych wcześniej poliekstremofili (w podanych przykładach odpowiednio: piezopsychrofilii i halopsychrofilii) [30].

Psychrofile stanowią grupę bardzo zróżnicowaną filogenetycznie. Zalicza się do nich przedstawicieli wszystkich trzech domen – znajdziemy tu zarówno bakterie jak i archeony, a nawet organizmy eukariotyczne [13, 30, 64]. Wśród bakterii dominują Gram-ujemne proteobakterie (α -, β - i γ -) oraz przedstawiciele typu *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteriodes*. Typowymi przykładami są tu wybrane gatunki z rodzajów: *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Serratia*, *Polaromonas*, *Polaribacter*, *Psychroflexus*, *Psychromonas*, *Psychrobacter*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Cellulophaga*, *Marinobacter*, *Maribacter* (np. *Psychrobacter pacificensis*, *Psychromonas antarctica*, *Cellulophaga baltica*, *Marinobacter psychrophilus*, *Maribacter antarcticus*). Nieco mniej licznie psychrofile reprezentowane są przez bakterie Gram-dodatnie, należące do *Firmicutes* i *Actinobacteria* (gatunki z rodzajów: *Micrococcus* – *M. antarcticus*, *Bacillus* – *B. marinus*, *Clostridium* – *C. vincentii*, *Arthrobacter* – *A. psychrolactophilus*). Psychrofilne archeony to np. metanogenne drobnoustroje z rodzaju *Methanococcoides* – *M. burtonii*, *Methanogenium* – *M. frigidum*, ale także nieliczni przedstawiciele rodzajów: *Halorubrum* czy *Cenarchaeum*. Psychrofilni przedstawiciele trzeciej domeny to wybrane gatunki grzybów takich rodzajów jak: *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, a spośród drożdży: *Candida*, *Torulopsis*, *Mrakiella*, *Rhodotorula*. Znane są także psychrofilne glony *Chlamydomonas nivalis*, izolowane z alpejskich śniegów, nadające im charakterystyczny, intensywny czerwono-różowy kolor [13, 30].

Wszystkie wyżej wymienione organizmy, aby przetrwać w warunkach niskiej temperatury wykształciły określone mechanizmy adaptacji. Przystosowania te obejmują zmiany w różnych składnikach komórkowych takich jak: lipidy, białka enzymatyczne, kwasy nukleinowe, co z kolei ma wpływ na przebieg procesów transportu oraz replikacji [14, 30, 64]. Wiele uwagi w dotychczasowych badaniach poświęcono błonie komórkowej psychrofili, zwłaszcza jej właściwościom fizycznym, za które w największym stopniu odpowiadają kwasy tłuszczowe. Wzmocniona lepkość błon psychrofili powiązana jest ze zwiększoną ilością *cis*-nienasyconych oraz rozgałęzionych kwasów tłuszczowych, które dodatkowo często są metylowane i mają skrócony łańcuch główny [71]. Pozwala to regulować płynność błony komórkowej (dwuwarstwa lipidowa pozostaje w niskiej temperaturze luźniej upakowana) i utrzymać transport różnych substancji na odpowiednim poziomie. Pewne charakterystyczne cechy wykazują również białka enzymatyczne psychrofilnych organizmów. Ich wspólną właściwością jest zachowanie aktywności katalitycznej w niskich temperaturach, z jednoczesną niską stabilnością w zmienionym zakresie temperatur. Aby enzymy komórkowe mogły być aktywne w niskich temperaturach muszą ulec określonym modyfikacjom polegającym na: zmniejszeniu liczby grup hydrofobowych i wiązań wodorowych, czy zwiększeniu ilości obdarzonych ładunkiem grup powierzchniowych oraz liczby polarnych pętli powierzchniowych. Zauważa się w nich również niską zawartość argininy i proliny. Wszystkie te zmiany prowadzą do zwiększenia elastyczności cząsteczki białka, co pozwala na zachowanie jego aktywności [64]. Kolejnym przystosowaniem psychrofilnych organizmów jest wytwarzanie białek chroniących przed zamarzaniem oraz białek szoku zimna, a także charakterystycznych krioprotektantów – ekstremolitów. Białka chroniące przed zamarzaniem są zdolne do wiązania powstających w komórce kryształków lodu i zapobieganie ich powiększania co mogłoby doprowadzić do zniszczenia komórki. Białka szoku zimna kontrolują prawidłowy przebieg kluczowych procesów w komórce takich jak transkrypcja czy translacja (stabilizują rybosomy, mRNA). Krioprotektanty (ekstremolity) – ektoina, karnityna, trehaloza, a nawet polisacharydy zewnątrzkomórkowe, prawdopodobnie chronią między innymi przed agregacją i denaturacją białek [28, 51, 63].

2.2. Termofile

Termofile to organizmy, których optymalna temperatura wzrostu wynosi ponad 50°C. Grupę tę można podzielić na trzy klasy: termofile ($T_{opt} \geq 50^\circ\text{C}$, $T_{max} \geq 60^\circ\text{C}$), ekstremalne termofile ($T_{min} \geq 35^\circ\text{C}$, $T_{opt} \geq 65^\circ\text{C}$, $T_{max} < 85^\circ\text{C}$) i hipertermofile ($T_{min} \geq 60^\circ\text{C}$, $T_{opt} \geq 80^\circ\text{C}$, $T_{max} \geq 85^\circ\text{C}$). Dodatkowo wyróżnia się organizmy termotolerancyjne,

zdolne do przeżycia w maksymalnej temperaturze 60°C, ale charakteryzujące się optymalną temperaturę wzrostu poniżej 50°C [53]. Obecnie uznaje się, że 122°C jest maksymalną temperaturą przeżycia hipertermofili. W takiej maksymalnej temperaturze wzrasta i rozwija się archeon *Methanopyrus kandlerii* [92].

Termofile zamieszkują środowiska, w których wysokie temperatury są skutkiem aktywności wulkanicznej, uwalniania wód geotermalnych lub nawet ogrzewania słońcem. Przykładem takich naturalnych środowisk mogą być gorące źródła, występujące na niemal wszystkich kontynentach, np. w Parku Narodowym Yellowstone, na Kamczatce, Nowej Zelandii, Islandii. Kolejnym źródłem izolacji termofili są kominy hydrotermalne na dnie oceanicznym, gdzie temperatura wody przy podwyższonym ciśnieniu dochodzi do ponad 100°C. Termofile bytują również w gorących, ale sztucznie stworzonych środowiskach, takich jak: przyzmy kompostowe, hałdy węgla kamiennego oraz rurociągi z gorącą wodą [84, 92].

Do hipertermofili należą przede wszystkim archeony z następujących rodzin: *Archeaoglobaceae*, *Desulfurococcaceae*, *Methanocaldococcaceae*, *Methanopyraceae*, *Methanothermaceae*, *Pyrodictiaceae*, *Sulfolobaceae*, *Thermococcaceae*, *Thermofilaceae*, *Thermoproteaceae* oraz kilka gatunków bakterii z rodzin *Thermotogaceae* i *Aquificaceae* [92]. Do najbardziej znanych przykładów należą mikroorganizmy z rodzajów: *Archeoglobus* (*A. fulgidus*), *Thermoproteus* (*T. tenax*), *Pyrococcus* (*P. furiosus*), *Aeropyrum* (*A. pernix*), *Thermococcus* (*T. kodakarensis*), *Desulfurococcus* (*D. kamchatkensis*), *Sulfolobus* (*S. solfataricus*), *Methanothermus* (*M. fervidus*), *Methanopyrus* (*M. kandleri*). Ekstremalne termofile i umiarkowane termofile wykazują większą bioróżnorodność. Ekstremalnie termofilnymi bakteriami są: beztlenowce *Thermodesulfobacterium commune*, *Ammonifex degensii*, tlenowce: *Geobacillus stearothermophilus*, *Thermus thermophilus*. Do umiarkowane termofilnych mikroorganizmów należą np. bakterie (*Bacillus caldolyticus*), archeony (*Thermoplasma acidophilum*), niektóre grzyby (*Rhizomucor miehei*, *Chaetomium thermophile*, *Phanerochaete chrysosporium* i *Acremonium alabamensis*), a także glony (np. *Cyanidium caldarium*) i pierwotniaki (np. *Naegleria fowleri*) [74].

Oddziaływanie wysokiej temperatury spowodowało wykształcenie przez termofile szeregu przystosowań na poziomie komórkowym i molekularnym. Podstawowymi strukturami wymagającymi ochrony przed denaturacją pod wpływem wysokiej temperatury są białka i kwasy nukleinowe. Stabilizacja białek zapewniona jest przez wytworzenie w cząsteczkach między innymi dodatkowych wiązań i oddziaływań w postaci mostków di-siarczkowych i wiązań wodorowych. W białkach termofili obserwuje się również zmniejszoną liczbę aminokwasów termolabilnych oraz wrażliwych na deaminację i oksydację (takich jak: Met, Gly, Asn, Ser i Thr).

Łańcuchy polipeptydowe termofili zawierają zaś więcej: Ile, Arg, Pro, Lys, Tyr i Glu. Białka termofili są bardziej zwarte i sztywne dzięki zmniejszeniu liczby i wielkości pętli peptydowych na powierzchni cząsteczki, większemu upakowaniu i ograniczeniu wolnych przestrzeni, obniżeniu hydrofilowości, zwiększeniu hydrofobowości rdzenia oraz podwyższeniu punktu izoelektrycznego cząsteczki białka. Taka struktura zapewnia zachowanie aktywności białek i enzymów w wyższej temperaturze. Kolejnym przystosowaniem termofili jest wytwarzanie i gromadzenie w komórce substancji zwiększających termostabilność, takich jak różnego rodzaju związki organiczne, sole i białka stabilizujące. Do najważniejszych białek stabilizujących termofili należą białka szoku termicznego (HSPs – heat shock proteins) [84, 87, 97]. Termofile wykształciły również szereg przystosowań chroniących kwasy nukleinowe. Zaobserwowano zwiększenie ilości stabilizujących wiązań wodorowych. W przypadku rRNA i tRNA termofili wykazano zależność polegającą na zwiększeniu liczby par zasad G-C, wraz ze wzrostem optymalnej temperatury wzrostu. Innymi przystosowaniami są: występowanie określonych kombinacji dinukleotydów w DNA oraz ekspresja charakterystycznych enzymów, np. termofilnej odwrotnej gyrazy [97]. Wysoka temperatura ma również wpływ na wzrost płynności błon komórkowych. Aby zachować integralność, u termofili zawierają one więcej nasyconych i prostych kwasów tłuszczowych [68]. Dodatkowo lipidy w błonach komórkowych tych drobnoustrojów są połączone wiązaniem eterowym ze ścianą komórkową. U archeonów termofilnych może występować miejscami jednowarstwowa błona komórkowa, zamiast dwuwarstwowej. Taka budowa znacznie podnosi termooporność komórki i wpływa na ochronę białkowego wnętrza w porównaniu z komórkami, w których błonach znajdują się kwasy tłuszczowe typowe dla mezofili [30]. Dodatkowo niektóre archeony np. *Methanococcus jannaschii* posiadają parakrystaliczną warstwę powierzchniową (S-layer) białkową lub glikoproteinową [74].

2.3. Acidofile

Za organizmy acidofilne uznaje się takie, które optymalny wzrost wykazują w pH pomiędzy 2 i 4 [3, 13]. Podobnie jak inne grupy ekstremofili nie jest to grupa jednorodna jeśli chodzi o zakres pH, w którym żyją. Stąd w literaturze wyróżniane są ekstremalne acidofile (wykazujące optymalny wzrost w pH 3 lub niższym) i organizmy acidotolerancyjne (tolerują niskie pH, ale nie wykazują w nim wzrostu optymalnego).

Acidofile zamieszkują środowiska o drastycznie niskim pH i są to zarówno środowiska naturalne, jak i powstałe na skutek określonej działalności człowieka. Izolowano je z rejonów morskich kominów hydrotermalnych, gorących źródeł, gejzerów, fumaroli a także

solfatar, czyli ze środowisk, w których niskiemu pH towarzyszy jednocześnie wysoka temperatura. Niskie pH wspomnianych środowisk wynika z różnorodnych procesów naturalnych. Zaliczyć do nich można aktywność wulkaniczną (obecność magmy blisko pod powierzchnią – co ma miejsce np. w gejzerach, solfatarach), ale także aktywność metaboliczną wielu organizmów prokariotycznych (produkcja kwasów organicznych, zdolność utleniania siarki elementarnej). Jednak powstawanie środowisk silnie zakwaszonych ma także czasem nierozzerwalny związek z aktywnością człowieka. Do środowisk tych zaliczyć można np. kwaśne wody odpływowe kopalni różnych minerałów, czy wody spływające z hałd węgla kamiennego. Niestety, wody takie mogą być źródłem zanieczyszczenia rzek, jezior oraz otaczających gleb. Niskie pH wspomnianych środowisk sprzyja rozwojowi acidofili, które często na skutek aktywności metabolicznej powodują dalsze zakwaszanie takich miejsc. Wiąże się to z występowaniem w omawianych rejonach różnego rodzaju metali, które bardzo często występują w postaci nierozpuszczalnych siarczków. Zdolność utleniania siarczków przez drobnoustroje powoduje przeprowadzenie jonów metali w formę, z której łatwo te metale odzyskać (bioługowanie), ale jednocześnie doprowadza do powstawania utlenionej formy siarki (SO_4^{2-}), co w obecności wody powoduje powstawanie kwasu siarkowego. Zanieczyszczenie wód powierzchniowych (jezior, rzek) kwaśnymi odpływami zawierającymi jony metali niesie ze sobą dwie poważne konsekwencje dla tych ekosystemów: po pierwsze zmianę pH środowiska na tak niskie, że jest ono szkodliwe dla większości żyjących tam organizmów i po drugie: występowanie metali (w tym metali ciężkich) w stężeniach osiagających wartości toksyczne [3, 13, 77].

Acidofile są grupą różnorodną, zarówno pod względem filogenetycznym (archeony, bakterie, eukariota), jak i reprezentowanego przez nie typu troficznego. Tam gdzie dostępne są organiczne związki węgla rozwijają się heterotrofy. Acidofile korzystają z różnorodnych akceptorów elektronów, a także energii zarówno chemicznej jak i słonecznej. Przykładem acidofilnych organizmów eukariotycznych są glony: *Dunaliella acidophila*, *Cyanidium caldarium*, *Chlamydomonas acidophila*, *Galdieria sulphuraria*. Należą tu także heterotroficzne grzyby i drożdże (*Trichosporon cerebriae*, *Acontium cylatium*, niektóre gatunki z rodzajów *Rhodotorula* i *Candida*), a nawet pierwotniaki (z rodzajów *Cinetochilium*, *Vahlkampfia*) [13, 58]. Prokariotyczne acidofile reprezentują obie domeny mikroorganizmów. Dobrze poznaną grupę stanowią archeony, w tym takie rodzaje drobnoustrojów jak: *Acidianus* (*A. brierleyi*, *A. infernus*), *Metallosphaera* (*M. sedula*, *M. prunae*), *Sulfurococcus* (*S. yellowstonii*, *S. mirabilis*), *Sulfolobus* (*S. shibatae*, *S. metallicus*, *S. yangmingensis*). Wszystkie wymienione organizmy są jednocześnie chemolitoautotrofami, pozyskują one

energię z utleniania związków żelaza lub siarki. W grupie tej występują oczywiście także heterotrofy: *Picrophilus* (*P. oshimae*, *P. torridus*), *Thermoplasma* (*T. acidophilum*, *T. volcanium*). Niektóre z acidofilnych archeonów (np. *Ferroplasma acidiphilum*) są organizmami mikсотroficznymi [13, 76, 77]. Omawianą grupę ekstremofili reprezentują także bakterie. Podobnie jak archeony wykazują one zróżnicowane możliwości metaboliczne. Typowymi przedstawicielami chemolitoautotroficznych bakterii środowisk kwaśnych są: *Acidithiobacillus* (*A. albertensis*, *A. caldus*, *A. ferrooxidans*), *Thiobacillus* (*T. prosperus*), *Leptospirillum* (*L. ferrooxidans*, *L. thermoferrooxidans*). Do heterotrofów należą: *Ferrimicrobium acidiphilum*, *Acidiphilium* (*A. cryptum*, *A. angustum*, *A. facilis*, *A. rubrum*), *Alicyclobacillus* (*A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestris*) [32, 40, 93, 94]. Mikсотroficzny typ metabolizmu stwierdzono między innymi u przedstawicieli gatunku *Thiobacillus acidophilus*, *Sulfobacillus acidophilus*, *Acidimicrobium ferrooxidans* [16, 57, 66].

Niskie pH, w którym egzystują acidofile powoduje konieczność wykształcenia odpowiednich przystosowań, zapobiegających destrukcyjnemu działaniu silnie kwaśnego środowiska na składniki komórkowe (białka czy kwasy nukleinowe). Wykazano, że mimo wysokiego stężenia jonów H^+ na zewnątrz komórki, wewnątrz komórkami acidofile utrzymują prawie zawsze pH na poziomie zbliżonym do neutrofilii (pH 5–7). Wyjątkiem są gatunki z rodzaju *Picrophilus*, u których pH wnętrza komórki wynosi około 4,6 [3]. Stwierdzono, że ciąglemu napływowi jonów H^+ do komórek acidofilii zapobiega wysoce nieprzepuszczalna błona komórkowa, czy też zmiana ładunku wewnątrz komórki na silnie dodatni, ale także wzmożona synteza czynników odpowiedzialnych za aktywny transport protonów na zewnątrz. Obniżenie przepuszczalności błony komórkowej przypisuje się zmianom struktury pewnych jej elementów np. w błonie komórkowej acidofilnych archeonów stwierdza się obecność grubej warstwy izoprenoidowej, czy też wiązań tetraeterowych, a nie estrowych w lipidach. Wiązania takie są bardziej stabilne w obecności kwasów w porównaniu z wiązaniami estrowymi [52]. Napływ jonów H^+ jest hamowany także poprzez gromadzenie dodatnio naładowanych jonów wewnątrz komórki. Jak wykazano, są to głównie jony K^+ [83]. Acidofile wykazują także wzmożoną ekspresję genów odpowiedzialnych za syntezę transporterów protonów. Usuwanie protony, które napłynęły do komórki z powrotem na zewnątrz. Gradient pH między wnętrzem komórki a środowiskiem stanowi podstawową siłę napędową komórki, ponieważ dzięki systemowi pomp protonowych powodują wydajne działanie ATPaz i produkcję dużej ilości energii.

Zaobserwowano również zwiększona liczbę genów związanych z naprawą uszkodzeń DNA i białek. Przypuszcza się, że ważną rolę w przystosowaniu do życia

w niskim pH może odgrywać obecność żelaza związanego z białkami komórkowymi. Wykazano, że np. *F. acidiphilum* wytwarza zwiększoną ilość białek wiążących właśnie żelazo, a usunięcie jonów tego metalu z cząsteczki proteiny skutkuje utratą odpowiedniej struktury i funkcji białka [3].

2.4. Alkalifile

Czynnikiem środowiskowym, który decyduje o przynależności drobnoustrojów do alkalifili jest wysokie pH. Termin „alkalifile” określa organizmy, wykazujące optymalny (lub przynajmniej bardzo dobry) wzrost w pH powyżej 9 i jednocześnie nierosnące lub słabo rosnące w pH obojętnym. Duża część organizmów alkalifilnych to haloalkalifile – wymagają do wzrostu zarówno alkalicznego pH jak i wysokiego stężenia soli (halofile zostaną omówione szerzej w kolejnym rozdziale). W literaturze opisywane są także organizmy uznawane za alkalitolerancyjne, czyli takie które mają zdolność wzrostu w pH około 9, ale optymalne dla nich warunki to jednak te typowe dla neutrofilii [13, 35, 56].

Oprócz środowisk o podwyższonym pH alkalifile izolowane były także z próbek gleby, w których pH zbliżone jest do obojętnego, a nawet z gleb kwaśnych. Tłumaczyć to można tworzeniem się w takich miejscach pewnych nisz, w których dochodzi do podwyższenia pH (np. na skutek mikrobiologicznej amonifikacji), co umożliwia rozwój alkalifili. Mikroflora alkalifilna znajdowana jest także w próbkach kału pochodzących od niektórych owadów np. termitów czy ćmy brudnicy nieparki [9]. Środowiska typowo alkaliczne naturalnego pochodzenia mogą mieć dwojaki charakter. Albo cechują się wysoką zawartością jonów Ca^{2+} , albo niewielkim ich stężeniem lub nawet brakiem. Jeziora, których wody są bogate w Ca^{2+} i osiągają pH nawet powyżej 11 znajdują się między innymi w Turcji, w Kalifornii, w krajach byłej Jugosławii. Alkaliczny odczyn wód tych jezior wynika z powstającego w nich $Ca(OH)_2$. Z kolei jeziora i pustynie sodowe zawierają bardzo niewielkie ilości jonów wapnia i magnezu, za to wysokie stężenia związków zawierających Na^+ (chlorki, dwuwęglany i węglany, a także siarczany). Są to środowiska powstające w rejonach suchych i gorących, gdzie gwałtowne odparowywanie wody powoduje koncentrację określonych związków [73, 79]. Oczywiście wielkie znaczenie mają tu także uwarunkowania geochemiczne. Otaczające gleby, skały zawierają duże ilości związków sodu, które wymywane są przez wody, stąd sodowy charakter jezior. Do tego typu jezior zaliczyć można między innymi: Wadi Natrun w Egipcie, Mono w Kalifornii, Magadi czy Logipi w Kenii. Dużo mniejsze i płytsze, ale także o charakterze sodowym są też jeziora na Syberii, np. na stepie w okolicach Kułundy. W każdym z wymienionych środowisk pH waha się w granicach

Tabela I

Główne grupy ekstremofili i środowiska ich występowania

Kryteria podziału	Przykłady	Środowiska
Psychrofile $T_{opt} < 15^{\circ}\text{C}$ $T_{max} < 25^{\circ}\text{C}$ Psychrotolerancyjne $T_{min} < 5^{\circ}\text{C}$ $T_{opt} = 20\text{--}25^{\circ}\text{C}$	Gram-ujemne: <i>Psychrobacter pacificensis</i> , <i>Psychromonas antarctica</i> , <i>Cellulophaga baltica</i> , <i>Marinobacter psychrophilus</i> , <i>Maribacter antarcticus</i> Gram-dodatnie: <i>Micrococcus antarcticus</i> , <i>Bacillus marinus</i> , <i>Clostridium vincentii</i> , <i>Arthrobacter psychrolactophilus</i> Archeony: <i>Methanococcoides burtonii</i> , <i>Methanogenium frigidum</i> , Grzyby: <i>Penicillium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Aspergillus</i> Drożdże: <i>Candida</i> , <i>Torulopsis</i> , <i>Rhodotorula</i> Glony: <i>Chlamydomonas nivalis</i>	Lody Antarktyki i Arktyki, lodowce, wieczne zmarzliny, stałe zimne wody regionów polarnych, głębin oceanicznych i morskich, wodonośne warstwy skał, regiony wysokogórskie, jaskinie, zbiorniki z systemami chłodzenia.
Termofile $T_{opt} \geq 50^{\circ}\text{C}$ $T_{max} \geq 60^{\circ}\text{C}$ Ekstremalne termofile $T_{min} \geq 35^{\circ}\text{C}$ $T_{opt} \geq 65^{\circ}\text{C}$ $T_{max} \geq 85^{\circ}\text{C}$ Hipertermofile $T_{min} \geq 60^{\circ}\text{C}$ $T_{opt} \geq 80^{\circ}\text{C}$ $T_{max} \geq 85^{\circ}\text{C}$	Termofile: Bakterie: <i>Bacillus caldolyticus</i> Archeony: <i>Thermoplasma acidophilum</i> Niektóre grzyby: <i>Rhizomucor miehei</i> Glony: <i>Cyanidium caldarium</i> Pierwotniaki: <i>Naegleria fowleri</i> Ekstremalne termofile: <i>Thermodesulfobacterium commune</i> , <i>Geobacillus stearothermophilus</i> , <i>Thermus thermophilus</i> . Hipertermofile: <i>Archeoglobus fulgidus</i> , <i>Pyrococcus furiosus</i> , <i>Thermococcus kodakarensis</i> , <i>Desulfurococcus kamchatkensis</i> , <i>Sulfolobus solfataricus</i> , <i>Methanopyrus kandleri</i>	Wody podgrzewane hydrotermalnie, gorące źródła, kominy hydrotermalne na dnie oceanicznym, przyzmy kompostowe, hałdy węgla kamiennego, rurociągi z gorącą wodą.
Acidofile: $\text{pH}_{opt} = 2\text{--}4$ Ekstremalne acidofile $\text{pH} \leq 3$ Acidotolerancyjne $\text{pH}_{min} < 3$, $\text{pH}_{opt} > 4$	Glony: <i>Dunaliella acidophila</i> , Grzyby i drożdże: <i>Trichosporon cerebriae</i> , <i>Candida</i> sp. Pierwotniaki z rodzaju <i>Cinetochilium</i> , <i>Vahlkampfia</i> , Archeony: <i>Sulfolobus shibatae</i> , <i>Picrophilus oshimae</i> , <i>Thermoplasma acidophilum</i> , Bakterie: <i>Acidithiobacillus albertensis</i> , <i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	Kominy hydrotermalne, gorące źródła, gejzery, fumarole solfatar, kwaśne wody odpływowe kopalni różnych minerałów, wody spływające z hałd węgla kamiennego.
Alkalifile obligatoryjne $\text{pH}_{opt} > 9$ $\text{pH}_{min} > 7$ Alkalitolerancyjne $\text{pH}_{max} < 9$ $\text{pH}_{opt} \sim 7$	Cyjanobakterie: <i>Nostoc calcicola</i> , Bakterie: <i>Anaerobranca horikoshii</i> , <i>Amphibacillus xylanum</i> , Promieniowce: <i>Streptomyces</i> , <i>Nocardia</i> Archeony: <i>Halorubrum vacuolatum</i> , <i>Natrialba magadii</i> , <i>Natronobacterium</i> , <i>Natronococcus</i> , <i>Natronorubrum</i> , <i>Methanohalophilus</i> , <i>Methanosalsus</i>	Gleba, jelita owadów, np. brudnicy nieparki, jeziora bogate w Ca^{2+} , jeziora i pustynie sodowe, wody, zakładów produkujących papier, detergenty, odpady z garbarni.
Halotolerancyjne tolerują podwyższone stężenie soli Halofile umiarkowane 0,5 – 2,5 M soli Ekstremalne halofile 2,5 M – 5,2 M soli	Glony: <i>Dunaliella salina</i> Grzyby: <i>Trimmatostroma salinum</i> , Pierwotniaki: <i>Pleurostomum flabellatum</i> , Krewetki: <i>Artemia salina</i> , Archeony: <i>Halobacterium salinarum</i> , <i>Haloferax mediterranei</i> , <i>Haloarcula marismortui</i> , <i>Natronococcus occultus</i> , <i>Methanohalobium evestigatum</i> , <i>Methanocalculus halotolerans</i> Bakterie: <i>Thermohalobacter berrensii</i> , <i>Halocella cellulolytica</i> , <i>Desulfobacter halotolerans</i>	Saliny (np. na pustyni Atakama w Chile), Morze Martwe, saliny w Huelva u wybrzeży Hiszpanii, jezioro Assal w Dżibuti w Afryce, antarktyczne jeziora w pobliżu Wzgórz Vestfold, lody polarne, żywność konserwowana solą, pustynne rośliny i zwierzęta.
Piezofile obligatoryjne $p_h = 10\text{--}50\text{ MPa}$ Piezofile ekstremalne $p_h > 50\text{ MPa}$ Piezotolerancyjne optimum $p_h = 0,1\text{ MPa}$ maksymalne $p_h = 10\text{--}50\text{ MPa}$	Psychropiezofile: <i>Colwellia hadaliensis</i> , <i>Moritella yayanosii</i> , <i>Shewanella violacea</i> Termopiezofilne: <i>Marinitoga piezophila</i> , <i>Desulfovibrio hydrothermalis</i> , <i>Piezobacter thermophilus</i> Promieniowce: <i>Demacoccus abyssi</i> , Archeony: <i>Thermococcus barophilus</i> , <i>Pyrococcus abyssi</i> , <i>Methanopyrus kandleri</i>	Wody oceaniczne i morskie na znacznych głębokościach, np. Rów Mariański, syberyjskie jezioro Bajkał antarktyczne podlodowe jezioro Wostok.

9.5–11, czasem osiągając wartość nawet 12. Oprócz tych naturalnych środowisk alkalifile znajdują odpowiednie warunki do rozwoju w miejscach, które powstają wskutek procesów prowadzonych przez człowieka: w wodach odpływających z zakładów produkujących papier, detergenty, z garbarni [13, 80].

Alkalifile to w zdecydowanej większości organizmy prokariotyczne. Ich metaboliczna różnorodność jest imponująca. Bardzo wiele z nich to chemolitotrofy, odgrywające ogromne znaczenie w obiegu pierwiastków w przyrodzie. Znajdziemy tu zarówno autotrofy jak i heterotrofy. Są to i tlenowce i beztlenowce, niektóre to

Tabela II

Przykłady praktycznego wykorzystania ekstremofili

	Zastosowania	Piśmien- nictwo
Psychrofile	Enzymy: produkcja detergentów (lipazy, proteazy, amylazy, celulazy), przemysł garbarski – usuwanie włosów i sierści (keratynazy, proteazy), przemysł spożywczy – ekstrakcja i klarowanie soków, poprawa walorów smakowych, uzyskiwanie produktów piekarniczych, (pektynazy, proteazy, glikozydazy), czyszczenie szkieł kontaktowych (proteazy), do produkcji karmy dla zwierząt, w browarnictwie i winiarstwie, bioremediacja środowisk skażonych olejami, węglowodarami i innymi zanieczyszczeniami	[14, 17, 30, 42, 56]
Termofile	Termostabilne enzymy – PCR Proteazy: przemysł farmaceutyczny, spożywczy, tekstylny, garbarstwo, produkcja detergentów Ksylanazy: wybielanie papieru Chitynazy: modyfikacja chityny Lipazy i esterazy: produkcja detergentów i reakcje stereo-specyficzne Keratynazy: usuwanie odpadów z przemysłu mięsnego i drobiarskiego Usuwanie toksycznych zanieczyszczeń Biorafinacja: produkcja biowodoru i biopaliw oraz rozkład biomasy o dużej zawartości celulozy i hemiceluloz	[25, 48, 84, 90]
Acidofile	Biologowanie rud zawierających siarczki wielu metali Bioremediacja kwaśnych wód kopalnianych Oczyszczanie gazu z lotnych związków siarki Enzymy zewnątrzkomórkowe: amylazy, glukozylazy, α-glukozylazy, celulazy, ksylanazy, enzymy proteolityczne	[12, 13, 45, 77]
Alkalifile	Enzymy zewnątrzkomórkowe: Lipazy, proteazy, amylazy, celulazy: dodatek do detergentów; proteazy: dodatek do roztworów czyszczących szkła kontaktowe, produkcja serów i mięs; celulazy: produkcja tkanin; pektynazy: produkcja papieru, obróbka włókien roślinnych dla przemysłu tekstylnego; ksylanazy: wybielanie w produkcji papieru, wybielający dodatek do detergentów Cyjanobakterie: suplement diety Neutralizacja silnie alkalicznych ścieków pochodzących z różnych gałęzi przemysłu (np. z produkcji barwników czy przemysłu tekstylnego używającego tych barwników), rozkład fenolu, pirenu Neutralizacja ścieków silnie zasadowych zawierających duże ilości chloru Polepszanie wytrzymałości zaprawy murarskiej	[30, 34, 62, 67, 73]
Halofile	Osmolity: przemysł farmaceutyczny, spożywczy, kosmetyczny (np. w kremach nawilżających – chroni przed efektami promieniowania UV-A, przez co przeciwdziała starzeniu się skóry) Uzyskiwanie naturalnego β-karotenu, jako suplementu diety, czynnika kolorującego i antyoksydanta w produktach kosmetycznych, spożywczych i farmaceutycznych Nukleaza H: produkcja kwasu 5'-guanylowego, używanego jako składnik nadający zapach	[36, 61, 65, 72, 75]
Piezofile	Wykorzystywane jest działanie wysokiego ciśnienia na drobnoustroje, np. do dezynfekcji wysokim ciśnieniem	[23]

metanogeny, inne należą do bakterii biorących udział w obiegu siarki. Do grupy autotrofów alkalofilnych należą niektóre cyjanobakterie, np. z rodzajów: *Anabaenopsis*, *Cyanospira*, *Spirulina*, *Synechocystis*, *Nostoc* (*N. calcicola*). Bakterie heterotroficzne reprezentowane są np. przez: tlenowce z rodzaju *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, a także promieniowce (*Streptomyces*, *Nocardia*), beztlenowce: *Clostridium* (*C. paradoxum*), *Anaerobranca* (*A. horikoshii*), *Amphibacillus* (*A. xylanus*), *Tindallia* (*T. magadii*). Niektóre beztlenowe bakterie alkalofilne to jednocześnie termofile np. *Thermobrachium celere*. W pewnych ekosystemach szczególne znaczenie odgrywają alkalofilne bakterie utleniające związki siarki jak np.: *Thioalkalimicrobium* sp., *Thioalkalivibrio* sp., *Thioalkalispira* sp. oraz bakterie redukujące siarkę w siarczanach: *Desulfonatronovibrio* sp.,

Desulfonatronum sp.. Alkalifilne archeony obejmują przedstawicieli np. rodzajów: *Halorubrum* (*H. vacuolatum*), *Natrialba* (*N. magadii*), *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natronorubrum* czy też *Methanohalophilus* lub *Methanosalsus*. Trzeba pamiętać, że wiele z wymienionych wcześniej organizmów to jednocześnie halofile, dlatego często obie grupy: alkali- i halofile omawiane są łącznie, a przedstawiciele poszczególnych grup wymieniani są jako przykłady i jednej i drugiej [13, 15, 20, 27, 35, 79].

Podobnie jak acidofile, organizmy alkalofilne utrzymują pH wnętrza komórki na poziomie zbliżonym do neutralnego. Jest to możliwe dzięki aktywności odpowiedniego systemu transportu jonów. Gradient pH jest utrzymywany wskutek aktywnego antyportu Na^+/H^+ , polegającego na stałym usuwaniu jonu Na^+ w zamian

za pobierany proton. Obecność jonów sodu w środowisku wzrostu alkalifili jest konieczna do sprawnego funkcjonowania takiej wymiany. Oprócz wspomnianych mechanizmów, na regulację wewnątrzkomórkowego pH może mieć wpływ struktura ściany komórkowej alkalifili. Wykazano bowiem, że niektóre z nich posiadają w ścianie komórkowej dodatkowe, ujemnie naładowane polimery. Są to np. reszty kwasów: teichuronowego, czy asparaginowego oraz teichurono-peptydy. Dzięki ich obecności możliwe jest wiązanie dodatnio naładowanych jonów, zwłaszcza Na^+ [46, 47].

2.5. Halofile

Halofile to organizmy środowisk słonych. Reprezentowane są zarówno przez prokariota jak i przez organizmy eukariotyczne, o zróżnicowanych wymaganiach co do stężenia soli (przeważnie NaCl) w środowisku ich wzrostu. Klasyfikacja tej grupy bywa niejednoznaczna, najczęściej uznawany jest podział podawany przez Kushnera [49]. Wyróżniane są w nim: organizmy halotolerancyjne (nie wymagają wysokiego stężenia soli do wzrostu, jednak w środowisku o podwyższonym ich stężeniu rosną dobrze), halofile umiarkowane (rosnące w zakresie od 0,5 do 2,5 M NaCl) i ekstremalne halofile (2,5–5,2 M). Kushner wyodrębnia jeszcze tzw. graniczne („bordenline”) halofile czyli takie, które rosną w przedziale stężeń: 1,5–4 M NaCl [1, 44, 49, 91]. Nieco inny, spotykany również w literaturze podział omawianej grupy, opiera się na definicji Larsena. I tak, wśród obligatoryjnych halofili wyróżnia się drobnoustroje: w małym stopniu halofilne („slight”) – rosną w przedziale 0,34–0,85 M NaCl , umiarkowanie halofilne (0,85–3,4 M) i ekstremalnie halofilne (3,4–5,1 M) [6, 13]. Jednoznaczny podział organizmów halofilnych w obrębie grupy często utrudnia dodatkowo fakt, iż zakres tolerancji na dane stężenie soli jest bezpośrednio związany z innymi parametrami wpływającymi na wzrost takimi jak: rodzaj podłoża, pH czy temperatura.

Wspólną cechą środowisk życia halofili jest zwiększona zawartość soli. Jednak rodzaj tych soli, pH, temperatura, zawartość składników odżywczych oraz inne czynniki różnią się często od siebie drastycznie w poszczególnych środowiskach, co pozwala na zasiedlanie ich przez bardzo zróżnicowane społeczności halofili. Zawartość i rodzaj soli zależy przede wszystkim od rodzaju wód zasilających dany obszar (morskich albo śródlądowych). Słone środowiska śródlądowe zasilane podziemnymi solankami odznaczają się najczęściej wyższą zawartością jonów Mg^{+2} i Ca^{+2} . Ich przykładem mogą być nasłonecznione saliny (sól koncentruje się tu na skutek parowania wody) np. salina na pustyni Atakama w Chile czy salina La Mala w Hiszpanii. Do tego typu środowisk zaliczane są także wody Morza Mar-

twego. Środowiska słone o składzie wody podobnym do wody morskiej to: saliny, z których odzyskuje się sól np. Alicante, Huelva u wybrzeży Hiszpanii, jezioro Assal w Dżibuti w Afryce, a także antarktyczne jeziora w pobliżu Wzgórz Vestfold, lody polarne. Niektóre ze słonych jezior mają pH obojętne jak np. Wielkie Jezioro Słone oraz Morze Martwe. Jednak jak wspomniano w poprzednim rozdziale, wiele zasolonych jezior to jeziora typowo alkaliczne – rozwijające się tam mikroorganizmy to typowe poliekstremofile (haloalkalifile). Organizmy halofilne i halotolerancyjne izolowano także z żywności konserwowanej solą (np. solonych mięs, ryb), a także pustynnych roślin i zwierząt (np. z jam nosowych iguan). Istnieją także doniesienia o izolacji umiarkowanych halofili z wód wokół pól naftowych na Morzu Północnym i w Oklahomie [13, 19, 91].

Halofile są bardzo heterogenną grupą. Organizmy prokariotyczne reprezentują i bakterie i archeony, tlenowe i beztlenowe, termo- mezo- i psychrofilne. Niektóre są fototrofami i stanowią o produktywności określonych ekosystemów. W omówionych wcześniej środowiskach rozwijają się także, czasami bardzo licznie powodując nawet zakwity, eukariotyczne glony. Wśród tych ostatnich do najlepiej poznanych należą: *Dunaliella* (*D. salina*), *Asteromonas* (*A. gracilis*). Nie są to jedyne halofilne eukarionty. Właściwościami takimi cechują się także niektóre grzyby np. *Trimmatostroma salinum* i *ortaea werneckii* [31, 96]. W salinach i stawach solnych żyją także pierwotniaki (*Pleurostomum flabellatum*), a nawet krewetki (*Artemia salina*) [60].

Środowiska o najwyższym stopniu zasolenia zdominowane są głównie przez halofilne archeony, mocno zróżnicowane pod względem metabolicznym. Heterotroficznie odżywiają się one zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych. Tlenowce to przedstawiciele klasy *Halobacteria*, rodziny *Halobacteriaceae* (*Euryarchaeota*), przeważnie neutrofile chociaż niektóre gatunki są także alkalifilne lub organizmami umiarkowanie acidofilnymi [1]. Większość gatunków z tej rodziny uznawana jest za halofile ekstremalne [60]. Cechą charakterystyczną przedstawicieli tej grupy jest wytwarzanie czerwonych barwników karotenoidowych, które powodują np. intensywne czerwone zabarwienie wód, w których się rozwijają. Do chwili obecnej opisano już ponad 130 gatunków w prawie 40 rodzajach rodziny *Halobacteriaceae*. Jako przykłady należy wymienić przedstawicieli rodzajów: *Halobacterium* (*H. salinarum*), *Haloferax* (*H. mediterranei*), *Haloarcula* (*H. marismortui*), *Halosimplex* (*H. carlsbadense*), *Haloquadratum* (*H. walsbyi*), *Natronococcus* (*N. occultus*), *Haladaptatus* (*H. paucihalophilus*), *Halococcus* (*H. saccharolyticus*), *Halorhabdus* (*H. utahensis*), *Haloterrigena* (*H. turkmenica*), *Halorubrum* (*H. salsolis*), *Natronorubrum* (*N. tibetense*), *Natrialba* (*N. magadi*). Jako źródło węgla drobnoustroje te wykorzystują głównie aminokwasy

i węglowodany, ale niektóre z nich mają także zdolność rozkładu alifatycznych i aromatycznych węglowodórów [1, 8]. Bardzo ciekawą cechą wymienionego wcześniej gatunku *H. salinarum* jest zdolność wykorzystywania energii świetlnej i przetwarzania jej w energię w postaci ATP mimo prowadzenia heterotroficznego trybu życia. Jest to możliwe dzięki wytwarzaniu specjalnego białka – bakteriorodopsyny, zawierającej retinal, dzięki któremu wychwytywana jest część promieniowania i poprzez błonę przenoszone są protony. Dzięki powstającej różnicy potencjału dochodzi następnie do syntezy ATP [10].

Niektóre z wymienionych wyżej archeonów przy braku tlenu, ale w obecności innych akceptorów elektronów, mogą prowadzić metabolizm beztlenowy. Z kolei ściśle beztlenowe halofilne archeony są metanogenami. Należą one do rodziny *Methanosarcinaceae* i jako substrat w procesie metanogenezy wykorzystują trimetyloaminę. Znanych jest obecnie około 30 gatunków halofilnych metanogenów (np. *Methanohalobium evestigatum*, *Methanohalophilus portucalensis*, *Methanosalsum zhilinae*, *Methanocalculus halotolerans*) [1].

Halofilne lub halotolerancyjne beztlenowe bakterie odżywiają się zarówno heterotroficznie jak i autotroficznie. Dużą grupę beztlenowych halofili stanowią bakterie fermentujące. W zdecydowanej większości należą one do rzędu *Halanaerobiales* (*Firmicutes*). Tylko nieliczne wyjątki na podstawie analizy filogenetycznego pokrewieństwa zostały umieszczone w rzędzie *Clostridiales* (*Thermohalobacter berrensensis*) i *Natranaerobiales* (*Natranaerobius thermophilus* – ekstremalnie halofil). Przedstawicielami rzędu *Halanaerobiales* są np.: *Halothermothrix* (*H. orenii*), *Halanaerobium* (*H. lacurosei*), *Halocella* (*H. cellulosilytica*), *Halarsenatibacter* (*H. silvermanii*), a także *Halanaerobaculum* (*H. tunisiense*), *Halobacteroides* (*H. halobius*), *Halonatronum* (*H. saccharophilum*), *Acetohalobium* (*A. arabaticum*), *Orenia* (*O. marismortui*), *Selenihalobacter* (*S. shriftii*). Większość wymienionych bakterii to gramujemne, urzęsione pałeczki, umiarkowanie halofilne, za ekstremalne halofile uznawane są: *H. tunisiense*, *A. arabaticum* oraz *H. lacurosei*. [13, 44]. Część halofilnych bakterii beztlenowych ma zdolność redukcji siarczanów i są to przeważnie „słabe” lub umiarkowane halofile. Należą do nich między innymi bakterie z rodzajów: *Desulfobacter* (*D. halotolerans*), *Desulfobacterium* (*D. autotrophicum*), *Desulfocella* (*D. halophila*), *Desulfococcus* (*D. multivorans*), *Desulfohalobium* (*D. retbaense*), *Desulfonema* (*D. magnum*) czy *Desulfovibrio* (*D. halophilus*) [13, 24]. Intensywnie prowadzone badania nad tą grupą, zwłaszcza w ostatnich kilku latach, pozwoliły na wyizolowanie i scharakteryzowanie wielu nowych gatunków. Na szczególną uwagę zasługują bakterie izolowane ze słonych jezior sodowych takie jak: *Desulfonatronovibrio* (*D. halophilus*), *Desulfonatronum* (*D. lacustre*), *Desulfonatronobacter*

(*D. acidivorans*), *Desulfobulbus* (*D. alkaliphilus*) [81, 82]. W beztlenowych, ale jeszcze naświetlonych warstwach słonych wód występują także fotoautotroficzne bakterie – purpurowe i zielone. W zdecydowanej większości są to mikroorganizmy słabo albo umiarkowanie halofilne. Przykładami są takie drobnoustroje jak: *Chromatium* (*C. salexigens*), *Chlorobium* (*C. chlorovibrioides*), *Rhodospirillum* (*R. salinarum*), *Ectothiorhodospira* (*E. vacuolata*), *Thiocapsa* (*T. halophila*). Typowymi zaś ekstremofilami w tej grupie są bakterie należące do rodziny *Ectothiorhodospiraceae* np. *E. halophila* i *E. halochloris*. Izolowane są z solanek niemorskiego pochodzenia, zwłaszcza o alkalicznym pH [59].

Halofile są reprezentowane także przez bakterie tlenowe. Są to głównie przedstawiciele Gram-ujemnych proteobakterii, rodziny *Halomonadaceae*. Oprócz rodzaju *Halomonas* (*H. elongata*) do wspomnianej rodziny zalicza się także między innymi rodzaje: *Halotelea* (*H. alkalilenta*), *Chromohalobacter* (*C. salexigens*), *Salinicola* (*S. halophilus*), i *Modicisalibacter* (*M. tunisiensis*) [2]. Znane są także halofilne bakterie utleniające związki siarki np. *Thiohalospira* (*T. halophila*) czy *Thiohalobacter* (*T. thiocyanaticus*) [88]. Halofilne bakterie gramododatnie to np.: *Halobacillus* (*H. halophilus*), *Salinicoccus* (*S. albus*), *Marinococcus* (*M. halophilus*), *Bacillus* (*B. halodurans*), *Salimicrobium* (*S. halophilum*) oraz promieniowce: *Salinactinospora* (*S. gingdaonensis*), *Nocardioopsis* (*N. litoralis*), *Actinopolyspora* (*A. xinjiangensis*), *Haloglycoyces* (*H. albus*) [13]. Halofilami są także niektóre cyjanobakterie: *Aphanothece* (*A. halophytica*), *Nodularia* (*N. spumigena*) czy *Oscillatoria* (*O. salina*) [70].

Aby uniknąć lizy, powodowanej różnicą ciśnienia osmotycznego w komórce względem zewnętrznego otoczenia, halofile muszą utrzymywać równie wysokie wewnątrzkomórkowe stężenie soli. Jednym ze sposobów wyrównywania stężeń jest utrzymywanie wysokiego poziomu K^+ i Cl^- wewnątrz komórki. Mechanizm taki (określany często mianem „sól-wewnątrz”) zidentyfikowano u ekstremalnie halofilnych archeonów z rodziny *Halobacteriaceae* oraz halofilnych bakterii fermentujących. Stwierdzono także, że aby zachować aktywność w takich warunkach, wewnątrzkomórkowe enzymy i białka strukturalne są ujemnie naładowane i mają kwaśny charakter (wiązaną odpowiednich jonów do białka stabilizuje je). Kiedy stężenie soli ulega obniżeniu poniżej odpowiedniego poziomu ww. enzymy tych bakterii ulegają denaturacji i tracą swe właściwości. Drugim sposobem regulacji stężenia soli jest synteza lub pobieranie różnego rodzaju związków organicznych o charakterze cząsteczek osmoregulacyjnych (osmolitów). Ich obecność stwierdza się w komórkach halofilnych glonów (prolina, glicerol, sacharoza), bakterii tlenowych (ektoina, hydroksyektoina, glukozylglicerol, N-acetyloornityna, prolina), a także metanogennych archeonów (glicyna, betaina, β -aminokwasy,

β -glutamina, kwas glutaminowy, acetylo-lizyna). Stabilizują one enzymy, nie ingerując w procesy metabolizmu komórkowego [44, 60].

2.6. Piezofile

Termin „organizmy piezofilne” oznacza organizmy żyjące w środowiskach o wysokich wartościach ciśnienia hydrostatycznego. Początki badań nad piezofilami sięgają lat 50-tych XX wieku. Początkowo organizmy te określano mianem „barofile”, jednak znaczenie etymologiczne słowa „barofile” („baro” – waga) nakazało zmianę nomenklatury na „piezofile” („piezo” – ciśnienie). Podobnie jak we wcześniej omówionych grupach, tak i w tej zaznacza się zróżnicowanie co do zakresu preferowanej wartości ciśnienia. Typowe piezofile (obligatoryjne) żyją najczęściej w zakresie 10–50 MPa, ale niektóre organizmy uznawane są za piezofile ekstremalne, czyli takie, które rosną dobrze dopiero gdy ciśnienie hydrostatyczne osiąga wartość powyżej 50 MPa. Piezotolerancyjnymi nazywa się zaś te organizmy, których optimum wzrostu znajduje się przy wartości ciśnienia 0,1 MPa, ale mogą także rosnąć w warunkach 10–50 MPa [22, 43].

Najbardziej typowym środowiskiem, w którym powstają warunki umożliwiające rozwój piezofili są wody oceaniczne i morskie na znacznych głębokościach (wraz ze wzrostem głębokości o 10 metrów ciśnienie rośnie o 0,1 MPa). Za najbardziej głębokie miejsce na Ziemi uznaje się obecnie Rów Mariański – rów oceaniczny w zachodniej części Oceanu Spokojnego. Według pomiarów wykonanych przy pomocy specjalnie skonstruowanych robotów, głębokość w tym miejscu sięga około 10 900 metrów, co oznacza że woda wywiera tam ciśnienie około 110 MPa. W takich warunkach rozwijać się mogą jedynie piezofile ekstremalne. Należy pamiętać, że w zdecydowanej większości wody morskie mają bardzo niską temperaturę, tak więc przeważnie piezofile są jednocześnie psychrofitami. Przeważnie – bo w przedziwnym świecie morskich głębin są miejsca wyjątkowo gorące – to rejony ujść hydrotermalnych. Piezofile tam występujące przystosowane są do trwania w temp. nawet 120°C – są więc piezotermofilami. Biorąc pod uwagę działanie jeszcze innych czynników skrajnych (brak światła, oligotroficzny charakter wód, często wysokie stężenie metanu) piezofile z pewnością można potraktować jako poliekstremofile. Wspomniane wody oceaniczne nie są jedynym „wysokociśnieniowym” środowiskiem. Znaczne głębokości, a co za tym idzie znaczne wartości ciśnienia notowane są także np. w syberyjskim jeziorze Bajkał (nawet 1600 m), albo antarktycznym podlodowym jeziorze Wostok (ponad 3700 m pod lodem). Mimo, że niewiele wiadomo jeszcze o społeczności organizmów tam żyjących, można przypuszczać, że muszą także należeć do piezofili [21, 41].

Większość z hodowalnych piezofili należy do domeny Bacteria, (γ – proteobakterie) i są to przedstawiciele rodzajów: *Colwellia* (*C. hadaliensis*), *Moritella* (*M. yayanosii*), *Photobacterium* (*P. profundum*), *Psychromonas* (*P. hadalis*) i *Shewanella* (*S. violacea*). Wymienione drobnoustroje są jednocześnie psychrofilami. Znane są także termopiezofilne bakterie np. *Marinitoga piezophila* czy *Desulfovibrio hydrothermalis* (oba gatunki redukują siarczany), a także wyizolowane w ostatnim czasie: *Thiopfundum lithotrophica* i *Piezobacter thermophilus* (chemolitoautotrofy utleniające siarkę). Izolowano także piezofilne promieniowce: *Demacoccus abyssi*. Piezofilne archeony należą do *Euryarchaeota* i *Crenarchaeota* – w zdecydowanej większości są to hypertermopiezofile, a nawet hypertermohyperpiezofile. Przykładami piezofilnych archeonów są: *Thermococcus barophilus*, *Pyrococcus abyssi*, *Methanopyrus kandleri* [22, 86].

Mimo intensywnie prowadzonych badań, wciąż nie do końca udało się poznać i wyjaśnić mechanizmy przystosowania piezofili do ekstremalnych warunków życia. Najbardziej charakterystyczną cechą tych organizmów, mającą za zadanie utrzymanie aktywności komórki, wydaje się być obecność w błonach specyficznych kwasów tłuszczowych: nienasyconych, często rozgałęzionych, a także hydroksylowanych (stanowią one nawet 70% wszystkich kwasów tłuszczowych w komórce). Kwasy takie mają za zadanie utrzymać odpowiednią płynność błon a przez to ich funkcjonalność. W procesie adaptacji wskazuje się także na znaczenie zmian w ekspresji genów łańcucha oddechowego piezofili czy białek błonowych (ekspresja pewnych genów tylko w wysokich wartościach ciśnienia) [78].

3. Z ekstremofilami w przyszłość – biotechnologiczne możliwości wykorzystania

Znalezienie mikroorganizmów w środowiskach skrajnych zapoczątkowało szeroko zakrojony rozwój badań nad tą grupą drobnoustrojów. Zwłaszcza ostatnie 40 lat prac wzbogaciło naszą wiedzę o ekstremofilach, nie tylko w aspekcie poznawczym, ale także – a może nawet przede wszystkim – w aspekcie aplikacyjnym. W ciągu tych ostatnich kilku dekad zidentyfikowano i opisano wiele nowych gatunków ekstremofili [26, 32, 38, 50, 85]. Znajomość ich morfologii, fizjologii wzrostu oraz genetyki zapoczątkowała następnie nowy, trwający do dziś kierunek badań nad możliwością biotechnologicznego zastosowania produktów pochodzących z tych mikroorganizmów. Niektóre enzymy znalazły już w tej chwili szerokie zastosowanie, a wiele nowych preparatów poddawanych jest wciąż analizom z myślą zastosowania ich w najbliższej przyszłości [33, 37]. Nie można w tym miejscu nie wspomnieć o jeszcze jednej dziedzinie

zainteresowań ekstremofilami, mianowicie astrobiologii. Prowadzone przez astrobiologów prace mogą przynieść odpowiedź na pytania nie tylko dotyczące pochodzenia i ewolucji życia na Ziemi, ale też mogą pomóc w poszukiwaniach i przewidywaniu życia na innych planetach. Ekstremofile – uważane za najstarsze żyjące na świecie organizmy i warunki środowisk w jakich egzystują są tu niewątpliwie doskonałym modelem badań [29, 39, 68, 89].

W kręgu zainteresowań biotechnologów nieustannie znajdują się psychrofile. Działające w niskich temperaturach enzymy przede wszystkim mogą stać się dobrym narzędziem w redukcji zużycia energii, ale także co równie ważne, mogą ograniczyć zużycie toksycznych związków chemicznych. Możliwości ich zastosowania są różnorodne: produkcja detergentów (lipazy, proteazy, amylazy, celulazy), przemysł garbarski – usuwanie włosów i sierści (keratynazy, proteazy), przemysł spożywczy – ekstrakcja i klarowanie soków, poprawa walorów smakowych, uzyskiwanie produktów piekarniczych, (pektynazy, proteazy, glikozydazy). Proteazy mogą również znaleźć zastosowanie do czyszczenia szkieł kontaktowych, do produkcji karmy dla zwierząt, w browarnictwie i winiarstwie [14, 17, 30, 42]. Istnieją także doniesienia o możliwym użyciu samych psychrofili lub też wyizolowanych z nich enzymów do bioremediacji skażonych olejami, węglowodorami i innymi zanieczyszczeniami zimnych środowisk skrajnych [56].

Główne zainteresowanie termofilami skierowane jest na izolację enzymów produkowanych przez te drobnoustroje, mających obecnie szerokie zastosowanie w przemyśle, biologii molekularnej i innych dziedzinach. Enzymy termofili są interesujące, ze względu na oporność na wiele czynników, takich jak temperatura, pH, rozpuszczalniki, czynniki denaturujące, co pozwala na zastosowanie ich w wielu procesach przemysłowych, w których wymagane jest zastosowanie ekstremalnych warunków [84]. Początkiem stosowania enzymów termofili było użycie termostabilnej polimerazy *Taq* (z komórek bakterii z rodzaju *Thermus*), do reakcji łańcuchowej polimeryzacji (PCR). Pozwoliło to na opracowanie i udoskonalenie tej powszechnie dziś stosowanej metody [84, 90]. Obecnie stosowanymi enzymami termofili są także m.in. proteazy, hydrolazy, chitynazy, ksylanazy, lipazy i esterazy [48]. Proteazy znalazły zastosowanie w takich gałęziach przemysłu jak: farmaceutyczny, spożywczy, tekstylny, garbarstwo, produkcja detergentów. W przemyśle spożywczym służą do polepszania walorów organoleptycznych produktów oraz usuwania produktów ubocznych. Służą również do produkcji płynów do mycia naczyń i innych detergentów, w których zachowują aktywność podczas zmywania w wyższej temperaturze [84]. Ksylanazy służą do wybielania papieru, chitynazy do modyfikacji chityny, lipazy i esterazy do produkcji deter-

gentów i reakcji stereo-specyficznych, np. biosyntezy organicznej, itp. [48].

Rozważane są również inne sposoby zastosowania drobnoustrojów termofilnych i ich enzymów, np. zastosowanie keratynaz w rozkładzie i usuwaniu różnego rodzaju odpadów (z przemysłu mięsnego, piór z przemysłu drobiarskiego). Trwają również badania nad zastosowaniem termofilnych proteaz w dekontaminacji materiału zwierzęcego, skażonego prionami powodującymi encefalopatię gąbczastą krów (BSE) i chorobę Creutzfelda-Jacoba. Priony wykazują wysoką oporność na działanie proteaz w temperaturze pokojowej. Zastosowanie wyższej temperatury powoduje zwiększenie wrażliwości prionów, a metoda ta wymaga użycia termoopornych proteaz [84]. Termofile i ich enzymy mogą być zastosowane również do: usuwania toksycznych zanieczyszczeń jak np. fenol oraz w biorafinacji, czyli otrzymywaniu produktów, paliw i substancji chemicznych w procesie rozkładu biomasy organicznej. Często do procesów tego rodzaju wymagane jest użycie podwyższonej temperatury dla osiągnięcia lepszej wydajności lub ułatwienia procesu. Przykładami biorafinacji jest produkcja biowodoru i biopaliw oraz rozkład biomasy o dużej zawartości celulozy i hemiceluloz [25, 90]. Obiecującym źródłem enzymów do takich procesów są bakterie z rodzaju *Caldicellulosiruptor* [25].

Na uwagę zasługuje także biotechnologiczne znaczenie mikroorganizmów acidofilnych. Szczególnie istotna jest możliwość ich wykorzystania w bioługowaniu rud zawierających siarczki wielu metali. Jednocześnie prowadzone są także badania nad możliwością zastosowania drobnoustrojów zdolnych do redukcji utlenionych związków siarki (SO_4^{2-}) w bioremediacji kwaśnych wód kopalnianych i zbierających się w wyrobiskach pokopalnianych [13]. Ostatnie doniesienia mówią także o wysokiej wydajności procesu oczyszczania gazu z lotnych związków siarki przy udziale ekstremalnie acidofilnych mikroorganizmów [45].

Drobnoustroje acidofilne są także intensywnie badane w kontekście możliwości wykorzystania produkowanych przez nie enzymów. Zainteresowanie badaczy skupia się głównie na enzymach zewnątrzkomórkowych, które wykazują aktywność w niskim pH. Acidofilne enzymy wewnątrzkomórkowe nie wykazują przystosowań do takich warunków, co wynika z faktu, że aktywne są w pH zbliżonym do neutralnego [12, 30]. Enzymy uzyskiwane z hodowli acidofili mogą znaleźć zastosowanie w wielu dziedzinach przemysłu. Przykładem mogą być amylazy, glukoamylazy czy α -glukozydazy (izolowane odpowiednio z: *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Picrophilus torridus*, *Sulfolobus solfataricus*) stabilne i aktywne nie tylko w niskim pH, ale często także w podwyższonej temperaturze. Enzymy takie mogą być wykorzystywane w produkcji alkoholu, w przemyśle piekarniczym czy w produkcji syropów

zawierających fruktozę. Oprócz wymienionych enzymów biorących udział w rozkładzie skrobi, praktyczne zastosowanie mogą znaleźć także inne: celulazy (*Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Sulfolobus solfataricus*), ksylanazy (*Acidobacterium capsulatum*), a także enzymy proteolityczne (*Alicyclobacillus sendaiensis*). Kwasooporne celulazy i ksylanazy są enzymami poszukiwanymi w celu zastosowania ich w produkcji biopaliw (do degradacji biomasy) zaś proteazy znajdują zastosowanie np. w produkcji serów [12, 77].

Zewnątrzkomórkowe enzymy alkalifili dzięki stabilności w wysokim pH także stały się tematem intensywnych badań biotechnologów. Okazuje się, że ich różnorodność i wysoka aktywność w takich warunkach może pozwolić na ich wielorakie zastosowanie – szczególnie enzymów pochodzących z hodowli termoalkalifili. W praktyce zastosowanie znalazły np. jako dodatek do detergentów: lipazy, proteazy, amylazy czy celulazy, dzięki którym polepszany jest proces usuwania różnorodnych zanieczyszczeń podczas prania i zmywania w wysokich temperaturach. Proteazy stanowią także dodatek do roztworów czyszczących szkła kontaktowe, ale też w procesach związanych z produkcją serów i mięs. Niedawno wykazano ponadto, że alkaliczne proteazy mają zdolność rozkładu białek prionowych, co w przyszłości może pozwolić na zastosowanie proteaz pochodzących z alkalifili w terapii choroby prionowej. Celulazy stosowane są ponadto w końcowych etapach produkcji tkanin do usuwania różnego rodzaju grudek, które powodują wzrost niepożądaną szorstkość materiału. Wykazano także, że celulazy mogłyby również być wykorzystane w recyklingu papieru do usuwania tuszu czy atramentu. Pektynazы stosowane są w procesach związanych z produkcją papieru oraz obróbką włókien roślinnych dla przemysłu tekstylnego. Ich aktywność pozwala uzyskać np. papier o lepszych właściwościach. Podobne zastosowanie znalazły ksylanazy, które oprócz procesów wybielania w produkcji papieru stosuje się także jako wybielający dodatek do detergentów. Większość ze stosowanych enzymów pochodzi z hodowli różnych alkalifilnych szczepów rodzaju *Bacillus* [30, 34, 73]. Nie można także zapomnieć o komercyjnej hodowli alkalifilnych cyjanobakterii. Stosowane są one jako suplement diety dostarczający wielu cennych składników odżywczych. Najszerze zastosowanie znalazły tu drobnoustroje *Spirulina platensis* [73]. Alkalofile mogą stać się także przydatne z ekologicznego punktu widzenia. Liczne badania dowodzą, że z powodzeniem mogą być stosowane w biologicznych procesach neutralizacji silnie alkalicznych ścieków pochodzących z różnych gałęzi przemysłu (np. z produkcji barwników czy przemysłu tekstylnego używającego tych barwników), a także do rozkładu fenolu czy pirenu. Ostatnie doniesienia wskazują także na możliwość stosowania hodowli alkalifili do neutralizacji ścieków silnie zasadowych zawierających

duże ilości chloru [67]. Wykazano również, że niektóre alkalifilne bakterie, rosnące w postaci biofilmu, mogą być używane do polepszania jakości zaprawy murarskiej. Biofilm tych bakterii pokrywający mineralne cząsteczki zaprawy cementowej może pełnić rolę spoiwa, znacznie zwiększającego trwałość i wytrzymałość zaprawy murarskiej [62].

Szerokie zastosowanie znalazły wytwarzane między innymi przez halofile osmolity, zwłaszcza ektoina. Dzięki zdolności do stabilizacji białek i kwasów nukleinowych znana jest ona ze swego protekcyjnego działania. Wykorzystuje się ją w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym, a także kosmetycznym (np. w kremach nawilżających – chroni przed efektami promieniowania UV-A, przez co przeciwdziała starzeniu się skóry) [61]. Glony z gatunku *Dunalliella salina* stosowane są do uzyskiwania naturalnego β -karotenu, a ten służy do uzyskiwania różnego rodzaju suplementów diety, jako czynnik koloryzujący i antyoksydant w produktach kosmetycznych, spożywczych i farmaceutycznych [36]. Jednym z niewielu enzymów stosowanych komercyjnie, uzyskiwanym z halofili jest nukleaza H. Stosuje się ją do produkcji kwasu 5'-guanylowego, używanego jako składnik nadający zapach [61]. Niektóre z produktów halofili są wciąż intensywnie badane i najprawdopodobniej znajdą komercyjne zastosowanie w najbliższym czasie. Przykładem może być halorodopsyna. Jej fotochemiczna i termodynamiczna stabilność może pozwolić na wykorzystanie w dziedzinach takich jak: holografia, produkcja sztucznej siatkówki, uzyskiwanie przestrzennych modulatorów światła. Projektowane są także urządzenia, których działanie opiera się na wykorzystaniu halorodopsyny do uzyskiwaniu energii [72, 75]. Ponownie glony *Dunaliella salina* z wysoką wydajnością usuwają ze ścieków N i P, a także jony metali ciężkich, dzięki czemu mogłyby być stosowane w oczyszczaniu ścieków [36]. Lipidy pochodzące halofilnych archeonów są świetnym narzędziem do produkcji archeosomów (liposomów) – są wysoce stabilne i mają odpowiedni profil dystrybucji w tkankach. Liposomy takie uzyskano np. z komórek *Halobacterium cutirubrum* są odporne na działanie fosfolipaz i mogą być przechowywane nawet do 60 dni. Wskazuje się na możliwość użycia ich jako nośników niektórych leków, czy czynników obrazowania komórek nowotworowych, a nawet genów [75]. Przewiduje się także możliwość stosowania halofili w produkcji poli- β -hydroksyalkanów, wykorzystywanych do syntezy biodegradowalnego plastiku, w produkcji egzopolisachrydów, które mogłyby znaleźć zastosowanie jako immunomodulatory czy surfaktanty, a nawet jako źródło do produkcji biopaliwa [61, 65].

Mało liczne są przykłady praktycznego zastosowania piezofili. Wynika to przede wszystkim z trudności w hodowli tych mikroorganizmów. Trudno jest w praktyce odtworzyć warunki jakie panują w ich naturalnych

środowiskach życia. Nie chodzi tylko o zapewnienie odpowiednio wysokiego ciśnienia, ale często także o zastosowanie np. właściwej mieszanki gazów i przede wszystkim odpowiednio dobranych składników podłoża. Zaobserwowano, że podłoża stosowane do izolacji piezofili nie powinny być zbyt bogate, a wręcz powinny mieć oligotroficzny charakter, bo taki najczęściej mają wody morskie. Dodatkowo, uzyskiwanie enzymów czy innych produktów z komórek piezofili jest możliwe najczęściej po dekompresji co utrudnia ocenę ich właściwości w naturalnych procesach. W praktyce bardziej niż same piezofile wykorzystywana jest znajomość działania wysokiego ciśnienia na drobnoustroje. Najbardziej typowym tego przykładem jest usuwanie drobnoustrojów z produktów żywnościowych właśnie za pomocą wysokiego ciśnienia zamiast wysokiej temperatury (konserwowanych jest już tak ponad 250 produktów). Zaletą takiego procesu oprócz eliminacji patogenów jest zachowanie np. właściwości smakowych i zapachowych oraz niezmiennych właściwości witamin. Zaawansowane są także badania nad możliwością dezynfekcji wysokim ciśnieniem różnych biomateriałów (ściągien, chrząstek, kości) – biomateriały tak traktowane nie zmieniają swych biomechanicznych własności. Ogromne nadzieje niesie także możliwość zastosowania tak dezynfekowanych fragmentów kości do autoprzeszczepów, w miejsca gdzie kość została zmieniona przez komórki nowotworowe. Dodatkową korzyścią jest tu fakt, że w wysokim ciśnieniu zniszczeniu ulegają także komórki nowotworowe co zapobiega ich ewentualnemu przeniesieniu wraz z przeszczepem [23].

4. Podsumowanie

Scharakteryzowane powyżej grupy organizmów ekstremofilnych należą do najlepiej poznanych w tej kategorii, ale należy pamiętać, że nie są jedynymi. Badania prowadzone od kilku dziesięcioleci pozwoliły zrozumieć nam wiele mechanizmów rządzących światem środowisk ekstremalnych i ich mieszkańcami. Doprowadziły do opisanie i wykorzystania bardzo wielu drobnoustrojów, których istnienia nawet nie podejrzewaliśmy. Musimy pamiętać, że nadal nie wszystkie ekstremofile „pozwoliły” nam się poznać. Najlepiej świadczy o tym porównanie wyników badań z zakresu metagenomiki i tradycyjnych metod hodowlanych. Metagenomika dostarcza niezbitych dowodów, że w naturalnych środowiskach – także ekstremalnych – sąsiadują z nami być może tysiące organizmów, które pozostają dla nas anonimowe – bo jeszcze nie umiemy ich wyhodować. Czy taką umiejętność posiadziemy? Na pewno mamy na to szansę. Badania nad ekstremofilami prowadzone są przez uczonych z ośrodków na całym świecie i w wielu przypadkach są początkiem drogi do nowych, być może

zaskakujących odkryć, niosących możliwości wykorzystania przez człowieka w praktyce tego co w naturalny sposób trwa od wieków w środowiskach skrajnych.

Piśmiennictwo

1. Andrei A.S., Banciu H.L., Oren A.: Living with salt: metabolic and phylogenetic diversity of archaea inhabiting saline ecosystems. *FEMS Microbiol. Lett.* **330**, 1–9 (2012)
2. Argandoña M., Vargas C., Reina-Bueno M., Rodríguez-Moya J., Salvador M., Nieto J.J.: An extended suite of genetic tools for use in bacteria of the *Halomonadaceae*: an overview. *Methods Mol. Biol.* **824**, 167–201 (2012)
3. Baker-Austin C., Dopson M.: Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends Microbiol.* **15**, 165–171 (2007)
4. Bakermans C., Ayala-del-Río H.L., Ponder M.A., Vishnivetskaya T., Gilichinsky D., Thomashow M.F., Tiedje J.M.: *Psychrobacter cryohalolentis* sp. nov. and *Psychrobacter arcticus* sp. nov., isolated from Siberian permafrost. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 1285–1291 (2006)
5. Bathe S., Norris P.R.: Ferrous iron- and sulfur-induced genes in *Sulfolobus metallicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 2491–2497 (2007)
6. Błaszczak M.K.: Środowiska skrajne. W: Mikrobiologia środowisk. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2010, s. 280–285, 301–311
7. Bońko M.: Wielki słownik wyrazów obcych PWN. Wyd. Naukowe PWN. Warszawa 2005
8. Bowers K.J., Wiegel J.: Temperature and pH optima of extremely halophilic archaea: a mini-review. *Extremophiles*, **15**, 119–128 (2011)
9. Broderick N.A., Raffa K.A., Goodman R.M., Handelsman J.: Census of the Bacterial Community of the Gypsy Moth Larval Midgut by Using Culturing and Culture-Independent Methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 293–300 (2004)
10. Bryl K.: Visual and archaeal rhodopsins: similarities, differences and controversy. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **8**, 285–296 (2003)
11. Buchalo A.S., Nevo E., Wasser S.P., Oren A., Molitoris H.P.: Fungal life in the extremely hypersaline water of the Dead Sea: first records. *Proc. Royal. Soc. London-Biol. Sci.* **265**, 1461–1465 (1998)
12. van den Burg B.: Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 213–218 (2003)
13. Canganella F., Wiegel J.: Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond. *Naturwissenschaften*, **98**, 253–279 (2011)
14. Cavicchioli R., Siddiqui K.S., Andrews D., Sowers K.: Low-temperature extremophiles and their applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 253–261 (2002)
15. Ciranna A., Santala V., Karp M.: Biohydrogen production in alkalithermophilic conditions: *Thermobrachium celere* as a case study. *Bioresour. Technol.* **102**, 8714–8722 (2011)
16. Clum A., Lapidus A. i wsp.: Complete genome sequence of *Acidimicrobium ferrooxidans* type strain (ICP^T). *Stand. Genomic Sci.* **1**, 38–45 (2009)
17. Cristobal H.A., Lopez M.A., Kothe E., Abate C.M.: Diversity of protease-producing marine bacteria from sub-antarctic environments. *J. Basic Microbiol.* **51**, 590–600 (2011)
18. Deming J.W.: Psychrophiles and polar regions. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 301–309 (2002)
19. Deuch C.E.: Characterization of a novel salt-tolerant *Bacillus* sp. from the nasal cavities of desert iguanas. *FEMS Microbiol. Lett.* **121**, 55–60 (1994)

20. Engle M., Li Y., Woese C., Wiegel J.: Isolation and characterization of a novel alkalitolerant thermophile, *Anaerobranca horikoshii* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 454–61 (1995)
21. Fang J., Barcelona M.J., Abrajano T., Nogi Y., Kato C.: Isotopic composition of fatty acids of extremely piezophilic bacteria from the Mariana Trench at 11,000 m. *Mar. Chem.* **80**, 1–9 (2002)
22. Fang J., Zhang L., Bazylnski D.A.: Deep-sea piezosphere and piezophiles: geomicrobiology and biogeochemistry. *Trends Microbiol.* **18**, 413–422 (2010)
23. Follonier S., Panke S., Zinn M.: Pressure to kill or pressure to boost: a review on the various effects and applications of hydrostatic pressure in bacterial biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 1805–1815 (2012)
24. Foti M., Sorokin D.Y., Lomans B., Mussman M., Zacharova E.E., Pimenov N.V., Kuenen J.G., Muyzer G.: Diversity, activity, and abundance of sulfate-reducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes. *Extremophiles*, **12**, 133–145 (2008)
25. Frock A.D., Kelly R.M.: Extreme thermophiles: moving beyond single-enzyme biocatalysis. *COCHE* **1**, 1–10 (2012)
26. Fuchs T., Huber H., Teiner K., Burggraf S., Stetter K.O.: *Metallosphaera prunae*, sp. nov., a novel metal-mobilizing, thermoacidophilic archaeum, isolated from a uranium mine in Germany. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**, 560–566 (1996)
27. Gerasimenko L.M., Dubinin A.V., Zavarzin G.A.: Alkaliphilic cyanobacteria from soda lakes of Tuva and their ecophysiology. *Microbiology*, **65**, 736–740 (1996)
28. Gilbert J.A., Hill P.J., Dodd C.E., Laybourn-Parry J.: Demonstration of antifreeze protein activity in Antarctic lake bacteria. *Microbiology*, **150**, 171–180 (2004)
29. Gilichinsky D., Rivkina E., Shcherbakova V., Laurinavichuis K., Tiedje J.: Supercooled water brines within permafrost – an unknown ecological niche for microorganisms: a model for astrobiology. *Astrobiology*, **3**, 331–341 (2003)
30. Gomes J., Steiner W.: The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food Technol. Biotechnol.* **42**, 223–235 (2004)
31. Gunde-Cimerman N., Zalar P., de Hoog S., Plemenitas A.: Hypersaline waters in salterns – natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiol. Ecol.* **32**, 235–240 (2000)
32. Harrison A.P.: *Acidiphilium cryptum* gen. nov., sp. nov., heterotrophic bacterium from acidic mineral environments. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **31**, 327–332 (1981)
33. Hendry P.: Extremophiles: There's More to Life. *Environ. Chem.* **3**, 75–76 (2006)
34. Hirata Y., Ito H., Furuta T., Ikuta K., Sakudo A.: Degradation and destabilization of abnormal prion protein using alkaline detergents and proteases. *Int. J. Mol. Med.* **25**, 267–270 (2010)
35. Horikoshi K.: Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 735–750 (1999)
36. Hosseini Tafreshi A., Shariati M.: *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. *J. Appl. Microbiol.* **107**, 14–35 (2009)
37. Innis M.S., Myambo K.B., Gelfand D.H., Brown M.A.: DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. 1988. *Biotechnology*, **24**, 6–10 (1992)
38. Itoh T., Yoshikawa N., Takashina T.: *Thermogymnomonas acidicola* gen. nov., sp. nov., a novel thermoacidophilic, cell wall-less archaeon in the order Thermoplasmatales, isolated from a solfataric soil in Hakone, Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 2557–2561 (2007)
39. Javaux E.J.: Extreme life on Earth-past, present and possibly beyond. *Res. Microbiol.* **157**, 37–48 (2006)
40. Johnson D.B., Bacelar-Nicolau P., Okibe N., Thomas A., Hallberg K.B.: *Ferrimicrobium acidiphilum* gen. nov., sp. nov. and *Ferritrix thermotolerans* gen. nov., sp. nov.: heterotrophic, iron-oxidizing, extremely acidophilic actinobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 1082–1089 (2009)
41. Jones N.: Russians celebrate Vostok victory. *Nature*, **482**. doi: 10.1038/482287a. (2012)
42. Kasana R.C., Gulati A.: Cellulases from psychrophilic microorganisms: a review. *J. Basic Microbiol.* **51**, 572–579 (2011)
43. Kato C., Qureshi M.H.: Pressure response in deep-sea piezophilic bacteria. *J. Molec. Microbiol. Biotechnol.* **1**, 87–92 (1999)
44. Kivistö A.T., Karp M.T.: Halophilic anaerobic fermentative bacteria. *J. Biotechnol.* **152**, 114–124 (2011)
45. Kraakman N.J., Pol A., Smeulders M.J., Jetten M.S., Op Den Camp H.J.: Extremely acidophilic sulfur-oxidizing bacteria applied in biotechnological processes for gas purification. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* **47**, 964–969 (2012)
46. Krulwich T.A., Masahiro I., Gilmour R., Guffanti A.A.: Mechanisms of cytoplasmic pH regulation in alkaliphilic strains of *Bacillus*. *Extremophiles*, **1**, 163–169 (1997)
47. Krulwich T.A., Masahiro I., Guffanti A.A.: The Na⁺-dependence of alkaliphily in *Bacillus*. *Biochem. Biophys. Acta*, **1505**, 158–168 (2001)
48. Kumar L., Awasthi G., Singh B.: Extremophiles: A novel Source of Industrially Important Enzymes. *Biotechnology*, doi:10.3923/biotech.2011. (2011)
49. Kushner D.J.: Life in high salt and solute concentrations. W: *Microbial Life in Extreme Environments*. Red. Kushner D.J. Academic Press, London 1978, s. 317–368.
50. Kurosawa N., Itoh Y.H., Iwai T., Sugai A., Uda I., Kimura N., Horiuchi T., Itoh T.: *Sulfurisphaera ohwakuensis* gen. nov., sp. nov., a novel extremely thermophilic acidophile of the order *Sulfolobales*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 451–456 (1998)
51. Lentzen G., Schwarz T.: Extremolytes: Natural compounds from extremophiles for versatile applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 623–634 (2006)
52. Macalady J.L., Vestling M.M., Baumler D., Boekelheide N., Kaspar C.W., Banfield J.F.: Tetraether-linked membrane monolayers in *Ferroplasma* spp: a key to survival in acid. *Extremophiles*, **8**, 411–419 (2004)
53. Mesbah N.M., Wiegel J.: The Anaerobic Halophilic Alkalithermophiles. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1125**: 44 – 57 (2008)
54. Minic Z., Thongbam P.D.: The biological deep sea hydrothermal vent as a model to study carbon dioxide capturing enzymes. *Mar. Drugs*, **9**, 719–738 (2011)
55. Morita R.: Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **39**, 144–167 (1975)
56. Morozkina E.V., Slutskaya E.S., Fedorova T.V., Tugay T.I., Golubeva L.I., Koroleva O.V.: Extremophilic Microorganisms: Biochemical Adaptation and Biotechnological Application (Review). *Appl. Biochem. Microbiol.* **46**, 1–14 (2010)
57. Norris P.R., Clark D.A., Owen J.P., Waterhouse S.: Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus* sp. nov. and other moderately thermophilic mineral-sulfide-oxidizing bacteria. *Microbiology*, **142**, 775–783 (1996)
58. Oesterhelt C., Schmälzlin E., Schmitt J.M., Lokstein H.: Regulation of photosynthesis in the unicellular acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Plant J.* **51**, 500–511 (2007)
59. Ollivier B., Caumette P., Garcia J.L., Mah R.A.: Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiol. Rev.* **58**, 27–38 (1994)
60. Oren A.: Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Syst.* **4**, doi: 10.1186/1746-1448-4-2 (2008)

61. Oren A.: Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environ. Technol.* **31**, 825–834 (2010)
62. Park S.J., Chun W.Y., Kim W.J., Ghim S.Y.: Application of alkaliphilic biofilm-forming bacteria to improve compressive strength of cement-sand mortar. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 385–389 (2012)
63. Phadtare S.: Recent developments in bacterial cold-shock response. *Curr. Issues Mol. Biol.* **6**, 125–136 (2004)
64. Piette F., Struvay C., Feller G.: The protein folding challenge in psychrophiles: facts and current issues. *Environ. Microbiol.* **13**, 1924–1933 (2011)
65. Poli A., Di Donato P., Abbamondi G.R., Nicolaus B.: Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by archaea. *Archaea*, doi: 10.1155/2011, 693253
66. Pronk J.T., Meulenberg R., van den Berg D.J.C., Batenburg-van der Vegte W., Bos P., Kuenen J.G.: Mixotrophic and Autotrophic Growth of *Thiobacillus acidophilus* on Glucose and Thiosulfate. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 3395–3401 (1990)
67. Rakeshkumar M.J., Kalpana H.M., Jitendra K., Bhavanath J.: Biological neutralization of chlor-alkali industry wastewater. *Mar. Pollut. Bull.* **62**, 2377–2383 (2011)
68. Rampelotto P.H.: Resistance of Microorganisms to Extreme Environmental Conditions and Its Contribution to Astrobiology. *Sustainability*, **2**, 1602–1623 (2010)
69. Rodrigues D.F., Tiedje J.M.: Coping with our cold planet. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 1677–1686 (2008)
70. Roney H.C., Booth G.M., Cox P.A.: Competitive exclusion of Cyanobacterial species in the Great Salt Lake. *Extremophiles*, **13**, 355–361 (2009)
71. Russell N.J.: Psychrophilic bacteria – molecular adaptations of membrane lipids. *Comp. Biochem. Physiol. Physiol.* **118**, 489–493 (1997)
72. Saeedi P., Mohammadian M.J., Sebtahmadi S.S., Mehrabadi J.F., Behmanesh M., Mekhilef S.: Potential applications of bacteriorhodopsin mutants. *Bioengineered*, **3**, 1–3 (2012)
73. Sarethy I.P., Saxena Y., Kapoor A., Sharma M., Sharma S.K., Gupta V., Gupta S.: Alkaliphilic bacteria: applications in industrial biotechnology. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 769–790 (2011)
74. Satyanarayana T., Chandralata R., Shivaji S.: Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current Science*, **89**, 78–90 (2005)
75. Schiraldi C., Giuliano M., De Rosa M.: Perspectives on biotechnological applications of archaea. *Archaea*, **1**, 75–86 (2002)
76. Schleper C., Puehler G., Holz I., Gambacorta A., Janekovic D., Santarius U., Klenk H.P., Zillig W.: *Picrophilus* gen. nov., fam. nov.: a novel aerobic, heterotrophic, thermoacidophilic genus and family comprising Archaea capable of growth around pH 0. *J. Bacteriol.* **177**, 7050–7059 (1995)
77. Sharma A., Kawarabayasi Y., Satyanarayana T.: Acidophilic bacteria and archaea: acid stable biocatalysts and their potential applications. *Extremophiles*, **16**, 1–19 (2012)
78. Simonato F., Campanaro S., Lauro F.M., Vezzi A., D'Angelo M., Vitulo N., Valle G., Bartlett D.: Piezophilic adaptation: a genomic point of view. *J. Biotechnol.* **126**, 11–25 (2006)
79. Sorokin D.Y., Kuenen J.G.: Chemolithotrophic haloalkaliphiles from soda lakes. *FEMS Microbiol. Ecol.* **52**, 287–295 (2005)
80. Sorokin D.Y., Kuenen J.G., Muyzer G.: The microbial sulfur cycle at extremely haloalkaline conditions of soda lakes. *Front. Microbiol.* **2**, doi: 10.3389/fmicb.2011.00044
81. Sorokin D.Y., Tourova T.P., Abbas B., Suhacheva M.V., Muyzer G.: *Desulfonatronovibrio halophilus* sp. nov., a novel moderately halophilic sulfate-reducing bacterium from hypersaline chloride-sulfate lakes in Central Asia. *Extremophiles*, **16**, 411–417 (2012 a)
82. Sorokin D.Y., Tourova T.P., Panteleeva A.N., Muyzer G.: *Desulfonatronobacter acidivorans* gen. nov., sp. nov. and *Desulfobulbus alkaliphilus* sp. nov., haloalkaliphilic heterotrophic sulfate-reducing bacteria from soda lakes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**, 2107–2113 (2012b)
83. Suzuki I., Lee D., Mackay B., Harahuc L., Oh J.K.: Effect of various ions, pH, and osmotic pressure on oxidation of elemental sulfur by *Thiobacillus thiooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5163–5168 (1999)
84. Synowiecki J.: Some applications of thermophiles and their enzymes for protein processing. *Afr. J. Biotechnol.* **42**, 7020–7025 (2010)
85. Takai K., Moser D.P., Onstott T.C., Spoelstra N., Pfiffner S.M., Dohnalkova A., Fredrickson J.K.: *Alkaliphilus transvaalensis* gen. nov., sp. nov., an extremely alkaliphilic bacterium isolated from a deep South African gold mine. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 1245–1256 (2001)
86. Takai K., Miyazaki M., Hirayama H., Nakagawa S., Querellou J., Godfroy A.: Isolation and physiological characterization of two novel, piezophilic, thermophilic chemolithoautotrophs from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Environ. Microbiol.* **11**, 1983–1997 (2009)
87. Taylor T.J., Vaisman I.I.: Discrimination of thermophilic and mesophilic proteins. *BMC Structural Biology*, **10** (Suppl 1): S5, 1–10 (2010)
88. Tourova T.P., Kovaleva O.L., Sorokin D.Y., Muyzer G.: Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes as a functional marker for chemolithoautotrophic halophilic sulfur-oxidizing bacteria in hypersaline habitats. *Microbiology*, **156**, 2016–2025 (2010)
89. Trent J.D.: Ekstremophiles in Astrobiology: *Per Ardua ad Astra*. *ASGSB Bulletin*, **13**, 5–11 (2000)
90. Turner P., Mamo G., Nordberg Karlsson E.: Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microbial Cell Factories*, **6**, 9, 1–23 (2007)
91. Ventosa A., Nieto J.J., Oren A.: Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 504–544 (1998)
92. Wagner I.D., Wiegel J.: Diversity of Thermophilic Anaerobes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1125**, 1–43 (2008)
93. Wichlacz P.Z., Unz R.F., Langworthy T.A.: *Acidiphilium angustum* sp. nov., *Acidiphilium facilis* sp. nov., *Acidiphilium rubrum* sp. nov. Acidophilic heterotrophic bacteria isolated from acidic coal mine drainage. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**, 197–201 (1986)
94. Wisotzkey J.D., Jurtshuk P., Fox G.E., Deinhard G., Poralla K.: Comparative sequence analyses on the 16S ribosomal-RNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 263–269 (1992)
95. Yayanos A.A.: Microbiology to 10,500 meters in the deep sea. *Ann. Rev. Microbiol.* **49**, 777–805 (1995)
96. Zalar P., de Hoog S., Gunde-Cimerman N.: *Trimmatostroma salinum*, a new species from hypersaline water. *Stud. Mycol.* **43**, 57–62 (1999)
97. Zheng H., Wu H.: Gene-centric association analysis for the correlation between the guanine-cytosine content levels and temperature range conditions of prokaryotic species. *BMC Bioinformatics* **11** (suppl 11), S7, 1–10 (2010)

Mariola Mendrycka^{1*}, Katarzyna Mucha¹, Sylwester Stawarz¹

¹ Uniwersytet Technologiczno-Humanistyczny im. K. Pułaskiego w Radomiu, Wydział Materiałoznawstwa, Technologii i Wzornictwa, Katedra Technologii Materiałów Organicznych, Zakład Produktów Naftowych, ul. Chrobrego 27, 26-600 Radom

Wpłynęło w grudniu 2012 r.

1. Wprowadzenie. 2. Źródła i sposoby rozprzestrzeniania się zanieczyszczeń w glebie 3. Metody biodegradacji związków ropopochodnych 4. Mikroorganizmy genetycznie modyfikowane biorące udział w degradacji związków ropopochodnych 5. Mechanizmy biodegradacji węglowodorów ropopochodnych 5.1. Intradiolowe rozszczepienie pierścienia aromatycznego (typu „*orto*”) 5.2. Ekstradiolowe rozszczepienie pierścienia aromatycznego (typu „*meta*”)

Bioremediation of petroleum compounds and their biodegradation pathways

Abstract: In recent years, crude oil and its derivatives are one of the main sources of water pollution and land in Poland. Among the chemical compounds the most toxic and carcinogenic effects on living organisms have polycyclic aromatic hydrocarbons and compounds such as benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes (BTEX). Biotechnological methods, using hydrocarbon-degrading bacteria seem to be the most justified for environmental reasons and economic considerations. This technology is the introduction of suitable strains of bacteria and providing mineral and organic substances necessary for life to microorganisms exist and then a rapid multiplication of microorganisms in the soil. Great importance in removing xenobiotics from the environment gained in recent years by biological and biochemical methods. Development of science and a deeper understanding of biochemical mechanisms related to the disposal of organic waste by different microbes allows the use of specialized bacteria, fungi and plants to combat waste. Biodegradation pathways are constantly known. Particular attention is given to mixtures of compounds of microbial degradation of artificially produced by man, which naturally do not occur in nature. Progressive accumulation of toxic mixtures in the environment is harmful to biological systems. Study of degradation pathways of these compounds often leads to recognition of new enzyme reactions. Due to the large variety of degradative pathways, it seems an interesting presentation of known microbial degradation pathways of alkanes and the characteristics of their key enzymes. Understanding the mechanisms of decomposition of these compounds will enable a better use of microorganisms in the remediation of contaminated environments.

1. Introduction. 2. Sources and methods of the contaminants spread in soil. 3. Methods of petroleum compounds biodegradation. 4. Genetically modified micro-organisms involved in the degradation of petroleum compounds. 5. Mechanisms of biodegradation of petroleum hydrocarbons. 5.1. Intradiolic cleavage of the aromatic ring (such as “*ortho*”). 5.2. Extradiolic cleavage of the aromatic ring (such as “*meta*”)

Słowa kluczowe: bioremediacja, szlaki metaboliczne, związki ropopochodne

Key words: bioremediation, metabolic pathways, petroleum compounds

1. Wprowadzenie

Ropa naftowa jest mieszaniną węglowodorów o różnicowanych właściwościach fizycznych, chemicznych i biologicznych, zawierających niewielkie ilości (do 3%) związków organicznych tlenu (kwasy karboksylowe, fenole), siarki, azotu oraz metali ciężkich (do 1%) [26]. W skład ropy naftowej wchodzi następujące grupy węglowodorów [46]:

- alkany, parafiny – węglowodory łańcuchowe nasycone o łańcuchu prostym (n-parafiny) lub rozgałęzionym (izoparafiny),
- alkeny, olefiny – węglowodory łańcuchowe nienasycone,
- cykloalkany, cykloparafiny lub nafteny – węglowodory o budowie pierścieniowej,

- węglowodory aromatyczne, areny – jednopierścieniowe (JWA) – reprezentowane głównie przez grupę związków zwanych w skrócie BTEX: benzen, toluen, etylobenzen, ksyleny oraz wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA).

Węglowodory aromatyczne, będące składnikami ropy naftowej oraz obecne w środowisku, wywierają teratogenne, cytotoksyczne, immunotoksyczne, mutagenne i kancerogenne działanie na organizmy żywe, z uwagi na możliwość kumulowania się tych związków w roślinach i przedostawania się do kolejnych ogniw łańcucha pokarmowego [4–6, 14, 17–18, 62].

W ostatnich latach ropa naftowa i jej pochodne są jednym z głównych źródeł zanieczyszczeń wód i gruntów w Polsce [25]. Ciągłe postępująca industrializacja, jak i rozwój motoryzacji przyczyniają się do większego

* Autor korespondencyjny: Uniwersytet Technologiczno-Humanistyczny im. Kazimierza Pułaskiego w Radomiu, Wydział Materiałoznawstwa, Technologii i Wzornictwa, Katedra Technologii Materiałów Organicznych, Zakład Produktów Naftowych, ul. Chrobrego 27, 26-600 Radom; tel.: +48-48-361-75-82; fax.: +48-48-361-75-98; mariolamendrycka@poczta.onet.pl

zapotrzebowania na produkty naftowe. Ponadto wzrost wydobywania, przetwórstwa i zużycia ropy naftowej nieuchronnie pociąga za sobą zwiększenie przypadków zanieczyszczenia środowiska tymi związkami [42].

Składniki ropy naftowej w środowisku gruntowo-wodnym ulegają mikrobiologicznym i chemicznym przekształceniom a kierunki tych przemian uzależnione są od przebiegu takich procesów jak: utlenianie, odparowanie, emulsyfikacja, sedymentacja, dyspersja, adsorpcja oraz rozpuszczanie w wodach gruntowych i powierzchniowych [21].

Szybkość rozkładu ropopochodnych zanieczyszczeń, w istniejących układach środowiskowych, zależy nie tylko od stężenia związku, ale również od jego struktury chemicznej. Dane literaturowe dowodzą, że najłatwiej biodegradacji ulegają liniowe alkanany C_{10} - C_{25} , następnie węglowodory gazowe C_2 - C_4 , alkanany C_5 - C_9 , alkanany rozgałęzione do C_{12} , alkeny C_2 - C_{11} , rozgałęzione alkeny, cykloalkany, węglowodory monoaromatyczne oraz poliaromatyczne. W tej samej kolejności maleje również ilość izolowanych drobnoustrojów, które są zdolne do namnażania, w obecności wymienionych grup substratów [1, 30, 43].

Poza wymienionymi czynnikami środowiskowymi, które wpływają na szybkość rozkładu węglowodorów, bardzo ważny jest także dobór odpowiednich parametrów fizykochemicznych, takich jak: zawartość tlenu, temperatura, odczyn oraz obecność substancji pokarmowych i ksenobiotyków. Jednak za najważniejszy parametr w procesie biodegradacji uznaje się wskaźnik pH, który powinien mieścić się w przedziale pomiędzy 6,5 a 8 [32, 45]. Produkty ropopochodne obecne w glebie mogą obniżać jej pH, gdyż podczas degradacji węglowodorów powstają kwasy. Dlatego w celu podwyższenia jej odczynu zaleca się wapnowanie gleby [61]. Pierwiastki biogenne, takie jak: azot i fosfor, mają efektywny wpływ na proces bioremediacji, często jednak występują w glebie w ilościach ograniczających namnażanie się drobnoustrojów, dlatego konieczne jest wzbogacanie gleby tymi związkami. Stosunek C:N:P powinien wynosić 100:10:1. Należy jednak pamiętać, że substancje ropopochodne przyczyniają się do wzrostu stosunku węgla do azotu, co z kolei wpływa niekorzystnie na metabolizm mikroorganizmów. Natomiast, gdy rozkład węglowodorów ropopochodnych następuje w warunkach beztlenowych ważne jest wprowadzanie do gleby azotanów i siarczanów jako akceptorów elektronów [13, 58, 60, 66, 76, 83]. Kolejnym ważnym czynnikiem jest woda, która umożliwia rozpuszczanie węglowodorów i z tego względu zaleca się zraszanie gleby wodą lub wprowadzanie jej do gruntu. Produkty ropopochodne często powodują powstanie w glebie stref beztlenowych stąd korzystnie wpływa wprowadzanie w głąb gruntu tlenu bądź stosuje się oranie gleby.

Wszystkie te zabiegi przyczyniają się do wzrostu efektywności procesów bioremediacji [61]. Mimo to

ciągle poszukuje się nowych technik oczyszczania ścieków i unieszkodliwiania odpadów. W ciągu ostatnich 30 lat wzrosło zainteresowanie pracami badawczymi, prowadzonymi nad wykorzystaniem metod biotechnologicznych w biodegradacji wielu niepożądanych substancji organicznych [27]. W celu zwiększenia wydajności biologicznej oczyszczania ścieków, jak i skażonej gleby, podjęto próby wdrażania metod biooczyszczania *in situ*, połączonych ze szczyptywaniem paliwa [25]. Dużą popularnością cieszą się też techniki oparte na wprowadzaniu gotowych biopreparatów, zawierających wyizolowane odpowiednie szczepy bakteryjne [41, 56] bądź izolowaniu mikroflory autochtonicznej z oczyszczanego gruntu i zaadaptowywaniu ich do dużych stężeń substancji skażającej [24]. Ponadto w procesach bioremediacji stosowane są inne rozwiązania technologiczne oparte na fitoremediacji, kompostowaniu, uprawie gruntu (landfarming), remediacji w bioreaktorach oraz ryzoremediacji. Główne strategie intensyfikujące procesy bioremediacji opierają się na takich technikach jak: biostymulacja, wykorzystanie zjawisk kometabolizmu bakteryjnej chemotaksji, wspomaganie enzymami, wprowadzenie środków powierzchniowo-czynnych [48]. Efektywność usuwania szkodliwych zanieczyszczeń zwiększa się także poprzez zastosowanie ozonowania. Silne zdolności utleniające ozonu powodują całkowitą lub częściową eliminację niebezpiecznych i często niepodatnych na rozkład biologiczny substancji chemicznych. Często wstępne zabiegi polegające na utlenianiu zanieczyszczeń sprawiają, że są one bardziej przyswajalne dla drobnoustrojów, co czyni je bardziej podatnymi na dalszy mikrobiologiczny rozkład [29, 31, 49, 78].

Lepsze poznanie mechanizmów biodegradacji związków ropopochodnych w danych układach środowiskowych pozwoli na opracowanie bardziej skutecznych i bezpiecznych metod eliminacji tych skażeń.

2. Źródła i sposoby rozprzestrzeniania się zanieczyszczeń w glebie

Na ziemię opada większość wyemitowanych do powietrza WWA, stąd w glebie znajduje się aż 90% całkowitej ilości tych związków, które występują w środowisku [12, 72, 82].

Większość produktów ropy naftowej, które przedostają się do gruntu pochodzi z małych wycieków. Jednak skażenia znajdujące się w gruncie osiągają bardzo wysoki poziom, który często przekracza dopuszczalne normy. Ponadto związki organiczne, zawarte w paliwach i olejach, w których rozpuszczone są toksyczne dodatki uszlachetniające, chlorowcopochodne i wielopierścieniowe węglowodory, wykazują tendencję do migracji, zagrażając w ten sposób wodom gruntowym

i powierzchniowym. Niebezpieczne są zanieczyszczenia zbiorników wodnych substancjami ropopochodnymi z uwagi na tworzenie się błonki na powierzchni wody, która odcina dostęp tlenu i spowalnia procesy samooczyszczania. Zanieczyszczenie wody olejami jest łatwo wykrywalne na powierzchni wód i gruntu, ze względu na ich bardzo małą rozpuszczalność w wodzie. Oleje smarowe w kontakcie z wodą tworzą emulsje lub zawiesiny. Oleje doprowadzone do cieków wodnych mają tendencję do oblepiania roślin i opadania na dno. Powoduje to zwiększenie ilości osadów dennych i spowolnienie życia biologicznego w środowisku wodnym [70–71].

Źródła potencjalnych zanieczyszczeń związkami ropopochodnymi koncentrują się przede wszystkim wokół takich obiektów jak [11, 54, 64, 73]:

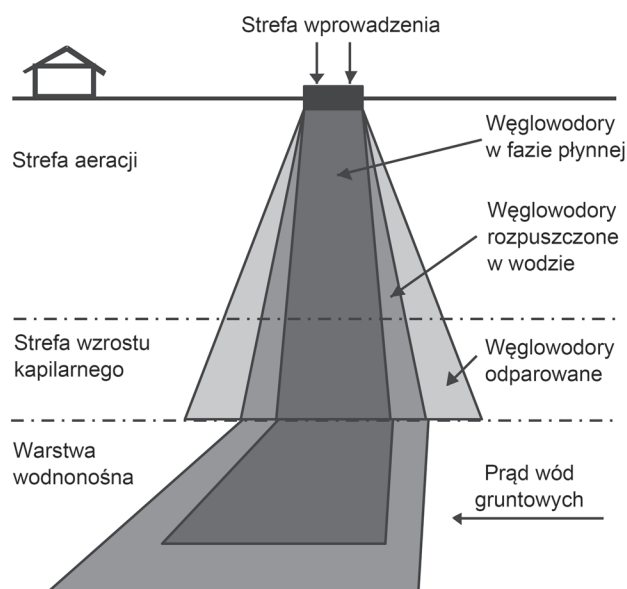
- stacje paliw (ponad 6 tys.), gdzie często dochodzi do pęknięcia zbiorników, nieszczelności rurociągów doprowadzających paliwo do dystrybutorów i niewłaściwa obsługa przy poborze paliwa
- rafinerie, przede wszystkim źle oczyszczone ścieki rafineryjno-paliwowe dostając się do wody mogą spowodować zanieczyszczenie związkami toksycznymi na większą skalę
- instalacje wydobywcze ropy naftowej;
- urządzenia poszukiwawcze (wiertnie lądowe, śródlądowe, morskie);
- bazy magazynowe, niesprawny system gromadzenia i zagospodarowania zużytych olejów i smarów, zaolejonych ziem, trocin itp.;
- bazy przeładunkowe, nieszczelne rurociągi przesyłowe, czasem celowo uszkodzone w wyniku działalności przestępczej;
- tereny przemysłowe i poprzemysłowe, erozja zbiorników, rozszczelnienia złącz, przypadkowe rozlania, przenikanie WWA ze ścieków przemysłowych, miejsc składowania odpadów odlewniczych i materiałów, które są stosowane w budownictwie;
- lotniska, bazy wojskowe;
- torowiska, bocznice kolejowe;
- pojazdy samochodowe, mikrowycieki paliw występujące podczas kolizji pojazdów, wymywanie WWA z powierzchni dróg, gdzie obecne są duże ilości związków pochodzące ze spalin samochodowych, ze ścierania opon gumowych przy hamowaniu oraz samego asfaltu, który bogaty jest w różnorakie węglowodory;
- urządzenia indywidualnego użytku domowego.

Wśród innych źródeł zanieczyszczeń można wymienić również ścieki bytowo-gospodarskie, gdzie w Polsce około 20% ścieków wykorzystuje się do nawożenia pól uprawnych [47].

Biorąc pod uwagę sposoby, jakimi WWA przedostaje się do gleby, szacuje się, że największe ilości tych związków mogą występować w ziemi pochodzącej ze źródeł bezpośredniego skażenia [22]. Potwierdzeniem tych przypuszczeń są dane porównujące zawartość WWA

w glebach pobranych z dala od potencjalnych źródeł zanieczyszczeń z glebą pochodzącą z dużych ośrodków przemysłowych. W glebach, które oddalone są znacznie od źródeł emisji, poziom najczęściej występujących szesnastu WWA wynosi zwykle od 1,5 do 5 mg/kg suchej masy, zaś stężenie benzo[a]pirenu od 0,001 do 0,01 mg/kg suchej masy [36, 64].

Skażenia w gruncie osiągają niekiedy bardzo wysoki poziom, przekraczający dopuszczalne normy. Często mogą one sięgać aż do 30 m głębokości, co stwierdzono na byłych terenach poradzieckich lotnisk wojskowych [61, 64]. Istniejące tam związki organiczne, takie jak paliwa i oleje, a także rozpuszczone w nich toksyczne uszlachetniacze oraz chlorowcopochodne i wielopierścieniowe węglowodory wykazują tendencję do migracji, przez co stwarzają zagrożenie dla wód gruntowych i powierzchniowych (rys. 1).



Rys. 1. Rozprzestrzenianie się związków ropopochodnych

W zależności od budowy geologicznej podłoża gruntowego oraz intensywności przestrzennego ruchu wód gruntowych, zanieczyszczenia te są rozprawdane, rozcieńczane i przekształcane w wyniku procesów chemicznych i biologicznych [16].

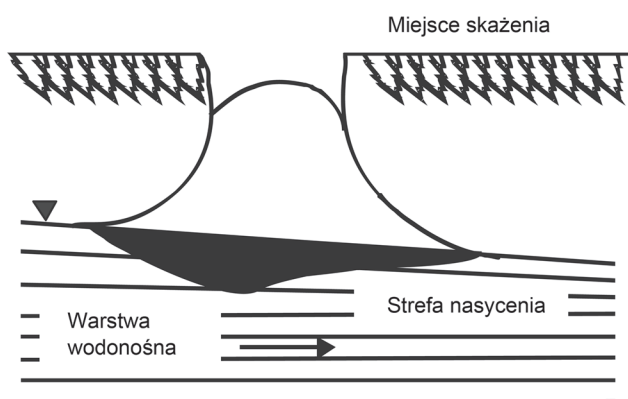
Podczas rozlewu paliwo wnika w grunt i jest rozprzestrzeniane w wyniku działania sił: ciężkości, kapilarnych oraz adsorpcyjnych [64]. Penetracja benzyny w gruncie jest znacznie szybsza niż wody, od 6 do 10 razy. Sposób przemieszczania się wielopierścieniowych węglodorów aromatycznych w glebie zależy od jej rodzaju, przepuszczalności oraz czynników klimatycznych, m.in. od: opadów deszczu, nasłonecznienia, wiatru, temperatury [22].

Szybkie wsiąkanie w głąb profilu glebowego rozlanych na powierzchnię substancji naftopochodnych zagraża zwłaszcza glebom piaszczystym (Tab. I) [50, 81].

Tabela I
Prędkość rozchodzenia się substancji ropopochodnych
w gruntach [m/dobę] [77–78]

Rodzaj gruntu	Etylina	Olej
Piasek gruby	164,16	220,96
Piasek gruby z domieszką drobnego	11,23	0,96
Piasek gruby zagliniony	0,82	0,60
Piasek średni	2,80	0,004
Piasek pylasty	0,008	0,08
Gлина	0,18	

Migracja tych zanieczyszczeń może zachodzić w pionie i/lub w poziomie. W gruncie dobrze przepuszczalnym penetracja zachodzi w pionie, a następnie, gdy osiągnie już poziom zwierciadła wód podziemnych dalej odbywa się w kierunku poziomym. Jest to bardzo niebezpieczne, gdyż zanieczyszczone wody są niekiedy rezerwuarem wody pitnej (rys. 2).



Rys. 2. Migracja produktów naftowych w środowisku wodno-gruntowym [16]

W gruncie produkty naftowe mogą występować w trzech fazach: gazowej (produkty lotne), ciekłej (produkty nie mieszające się z wodą lub rozpuszczone w wodzie) i „stałej” (produkty gazowe bądź ciekłe zaadsorbowane przez materiał skalny) [55].

Zanieczyszczenia naftowe mogą mieć też różną trwałość, która zależy nie tylko od właściwości gleby i warunków klimatycznych, ale również od stężenia zanieczyszczeń i ich składu. Badania Głazowskiej i Pikowskiego [28] wykazały, że przywrócenie pierwotnej żyzności gleb trwa niekiedy dość długo, czasami od 1 roku a nawet do 12 lat. W zależności od parametrów gleby i substancji ropopochodnych można opracować odpowiedni model ułatwiający pracę nad walką z substancjami ropopochodnymi występującymi w gruncie.

Wojewódzki Inspektorat Ochrony Środowiska w Białymstoku opracował modele oceny zanieczyszczeń środowiska substancjami ropopochodnymi [78]:

- modele przepływu i transportu zanieczyszczeń z gruntu do wód podziemnych,

- modele emisji zanieczyszczeń gazowych z gruntu do powietrza,
- procedur analizy i oceny ryzyka zdrowotnego,
- modele rozprzestrzeniania się zanieczyszczeń, bilansowania ilości zanieczyszczeń w gruntach wraz z analizą niepewności i błędów,
- analiz geostatystycznych dla potrzeb kartowania i modelowania zanieczyszczeń w środowisku,
- systemu identyfikacji i inwentaryzacji terenów zdegradowanych.

3. Metody biodegradacji związków ropopochodnych

Bioremediacja to proces usuwania zanieczyszczeń (min. substancji ropopochodnych) z gleby i wód podziemnych za pomocą żywych prowadzące zazwyczaj do transformacji różnego rodzaju zanieczyszczeń w formy mniej szkodliwe. W bioremediacji wykorzystywane są naturalne zdolności mikroorganizmów do rozkładu węglowodorów ropy naftowej. Proces ten może być prowadzony z udziałem mikroorganizmów w warunkach [23, 59, 75]:

- **tlenowych** – biodegradacja odbywa się w obecności tlenu z udziałem m. in.: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Rhodococcus* i *Mycobacterium*;
- **beztlenowych** – biodegradacja bez dostępu tlenu, obecnie istnieje duże zainteresowanie mikroorganizmami beztlenowymi wykorzystywanymi w procesie bioremediacji PCBs w osadach rzecznych, w dechloracji trichloroetyleny (TCE) czy chloroformu.

Ponadto, bioremediacja może być prowadzona z udziałem:

- **grzybów ligninolitycznych** – *Phanaerochaete chrysosporium*, mikroorganizmy te są zdolne do degradacji bardzo trwałych związków chemicznych;
- **metylotrofów** – tlenowych bakterii, degradujących metan, wykorzystując związek ten jako źródło węgla i energii. Enzymem inicjującym proces degradacji metanu jest monooksygenaza metanowa, która również ma szerokie zastosowanie w degradacji wielu związków nieorganicznych.

W Tabeli II i III zestawiono przykłady wykorzystanych technologii bioremediacji w procesie degradacji wielu substancji chemicznych, będących składnikami m.in. związków ropopochodnych.

Zdolność drobnoustrojów do degradacji kształtowała się na przestrzeni kilku lat, i jest wynikiem adaptacji mikroorganizmów do warunków panujących w zanieczyszczonym środowisku na skutek szerokiego wykorzystania produktów petrochemicznych w wielu gałęziach przemysłu [7,34]. W rurociągach gromadzą się liczne gatunki głównie bakterii, dla których węglowodory są głównym źródłem węgla. Mikroflora ta najczęściej rozwija się na granicy faz: wodnej i olejowej. Rozwojowi

Tabela II

Rodzaje biodegradacji wybranych związków chemicznych [39]

Związki chemiczne	Przykłady	Przykłady
Węglowodory aromatyczne	benzen, toluen	tlenowa, beztlenowa
Ketony i estry	aceton	tlenowa, beztlenowa
Węglowodory ropy naftowej	paliwa kopalne	tlenowa
Rozpuszczalniki chloropochodne	trichloroetylen, chloroetylen	tlenowa, beztlenowa
Węglowodory poliaromatyczne	antracen, benzo(a) piren, krezol	tlenowa
PCBs	1,2,3-trichloro-4-(2,3,4-trichlorofenylo)benzen	tlenowa

Tabela III

Bioremediacja gleby zanieczyszczonej związkami ropopochodnymi [23, 37, 75]

Frakcja olejowa	Zastosowana technologia	Wykonanie bioremediacji	Piśmien- nictwo
Surowa frakcja węglowodorów ropy naftowej	Bakteryjna degradacja w warunkach laboratoryjnych – testy z udziałem szczepów: <i>Bacillus subtilis</i> DM-04, <i>Pseudomonas aureginosa</i> oraz szczep NM	Bioagumentacja węglowodorów ropy naftowej z udziałem szczepów: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> M i NM oraz <i>B. subtilis</i> . Widoczna znaczna redukcja węglowodorów	[23]
Gleba zanieczyszczona paliwem	3 etapy eliminacji zanieczyszczeń: – wykorzystanie surfaktantów, – traktowanie odczynnikami Fentona, – przeprowadzenie właściwej biodegradacji	Zastosowanie Simple Green™ (SG), utlenianie (6% H ₂ O ₂) – 15% chemiczna degradacja węglowodorów oraz 80% biodegradacja	[75]
Gleba zanieczyszczona olejem napędowym	Degradacja w warunkach laboratoryjnych z udziałem szczepu <i>Candida catenulata</i> CM1	Po 13 dniach kompostowania (prowadzonego w bioreaktorze) – 84% paliwa ulega degradacji	[37]

tych drobnoustrojów towarzyszy również dostęp tlenu. W środowisku glebowym natomiast mamy do czynienia z mikroflorą charakterystyczną dla gruntów. Mikroorganizmy wykształciły odpowiednie systemy enzymatyczne by likwidować substancje toksyczne zagrażające ekosystemowi glebowemu. W procesach bioremediacji terenów zanieczyszczonych duże znaczenie mają enzymy oraz nanotechnologie [39].

W technologiach bioremediacji główną rolę odgrywają peroksydazy, które mogą transformować takie związki jak: policykliczne hydrowęglowodory (PAH) s, PCBs, związki fenolowe, (2,4,6-trinitrotoluen) TNT, barwniki, a także wiele innych trwałych związków aromatycznych [33].

Charakterystyczne jest to, że z gleby można izolować mikroorganizmy wyspecjalizowane w degradacji określonych ksenobiotyków. W procesach bioremediacji wykorzystuje się zarówno bakterie, i grzyby [38, 51, 57]. Mikroorganizmy te występują w wodach słodkich, morskich, o różnych temperaturach i na różnej głębokości. Ekosystemy wodne obfite są w bakterie i drożdże, natomiast w gruntach obserwuje się zwiększony udział grzybów i promieniowców [77]. Mikroorganizmy, które wykorzystują jako jedyne źródło węgla węglowodory jest niewielki procent. Do grupy mikroorganizmów wykazujących zdolność do degradacji składników ropy naftowej lub wybranych jej frakcji należą m.in. bakterie: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Alcalige-*

nes, *Arthrobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, drożdże: *Candida*, *Debaromyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Sporobolomyces*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, grzyby: *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mortierella*, *Mucor*, *Penicillium*, *Sporotrichum*, *Varicospora*. Z doniesień literaturowych wynika, że żaden z wymienionych drobnoustrojów nie jest zdolny do biodegradacji węglowodorów wszystkich grup, mogą jedynie przyswajać wybrane rodzaje związków, o określonych strukturach chemicznych [3, 52, 68].

Warunkiem skutecznej bioremediacji jest wybór odpowiednich mikroorganizmów. Wiedza na temat aktywności degradacyjnej bakterii wpływających na kontrolę procesu jest istotna ze względu na określenie właściwej strategii remediacji oraz kontrolę postępów i skuteczności bioremediacji [2, 10, 15, 20, 51, 52].

4. Mikroorganizmy genetycznie modyfikowane biorące udział w degradacji związków ropopochodnych

Drobnoustroje odgrywają dużą rolę w utylizacji związków ropopochodnych, jednakże szybkość tych procesów jest niewystarczająca w stosunku do potrzeb. W literaturze znajduje się wiele informacji na temat

Tabela IV

Degradacja związków ropopochodnych przez mikroorganizmy genetycznie modyfikowane [3, 67, 69, 77, 84]

Związki	Enzymy	Geny	Szczep	Piśmiennictwo
Toluen, TCE	4-monooksygenaza toluenowa	TomA	<i>Burkholderia cepacia</i> G4	[67]
Toluen, TCE	dioksygenaza toluenowa	TodC1C2BA	<i>Pseudomonas putida</i> F1	[84]
Toluen, TCE	2-monooksygenaza toluenowa	tmoABCDE	<i>Pseudomonas mendocina</i> KR1	[77]
BTEX (benzen, toluen, etylenobenzen, ksylen)	2,3-dioksygenaza katecholowa	xylE	<i>Pseudomonas putida</i> mt-2	[3]
Naftalen	dioksygenaza naftalenowa	nahAcd	<i>Pseudomonas putida</i> G7	[73]

degradacji toksycznych związków, bardzo trudno i wolno degradowanych, przez mikroorganizmy [1, 4, 14, 18, 30, 41, 45–46, 60–62, 76,]. Wyizolowane ze środowisk naturalnych lub pochodzące z kolekcji mikroorganizmy charakteryzują się wysoką aktywnością metaboliczną i innymi cechami technologicznymi często niewystarczającymi do zastosowania w procesie produkcyjnym. O efektywności procesu przemysłowego w równej mierze z technologią decyduje również doskonalenie cech drobnoustrojów przemysłowych [9, 44]. Jednym ze sposobów doskonalenia takich mikroorganizmów jest mutagenеза i selekcja mutantów o cechach korzystnych dla danego procesu biotechnologicznego [19].

Niezmierne istotna w procesie bioremediacji jest zdolność szczepu do degradacji wielu trudno degradowanych związków, ale nie zawsze mikroorganizmy wyizolowane ze środowisk naturalnych posiadają właściwy potencjał i właściwości genetyczne umożliwiające skuteczną biodegradację trwałych zanieczyszczeń. Dlatego wiele badań laboratoryjnych prowadzonych w wielu ośrodkach naukowych na świecie skoncentrowanych jest na prowadzeniu modyfikacji genetycznej tych szczepów pod kątem skutecznej biodegradacji ksenobiotyków. Obecnie największe znaczenie odgrywa tzw. „diagnostyka molekularna” [40, 64].

Diagnostyka molekularna szczepów wykorzystywanych w procesie bioremediacji dotyczy analizy wyizolowanego z komórek mikroorganizmów DNA oraz poznania aparatu genetycznego umożliwiającego ocenę zdolności szczepów do degradacji ksenobiotyków.

W literaturze na temat mechanizmów dotyczących degradacji związków ropopochodnych wiadomo, że u bakterii: *Burkholderia cepacia* G4, *Pseudomonas putida* F1, *Pseudomonas mendocina* KR1 istnieją geny xylE kodujące białka odpowiedzialne za degradację grupy związków naftalenu czy niektórych chloropochodnych (TCE). Geny te zostały sklonowane i zlokalizowane w chromosomalnym DNA tych bakterii i nazwane TomA dla *Burkholderia cepacia* G4 [67] TodC1C2BA dla *Pseudomonas putida* F1 [84] tmoABCDE dla *Pseudomonas mendocina* KR1 [77]. Bakterie *Pseudomonas putida* mt-2 posiadają geny xylE kodujące białka odpowiedzialne za degradację grupy związków

BTEX [44]. Natomiast naftalen jest degradowany przez dioksygenazę naftalenową szczepu *Pseudomonas putida* G7, gen kodujący białka odpowiedzialne za tę transformację to nahAcd [57]. W tabeli 3 zestawiono związki występujące w ropie naftowej, które są degradowane przez mikroorganizmy genetycznie modyfikowane.

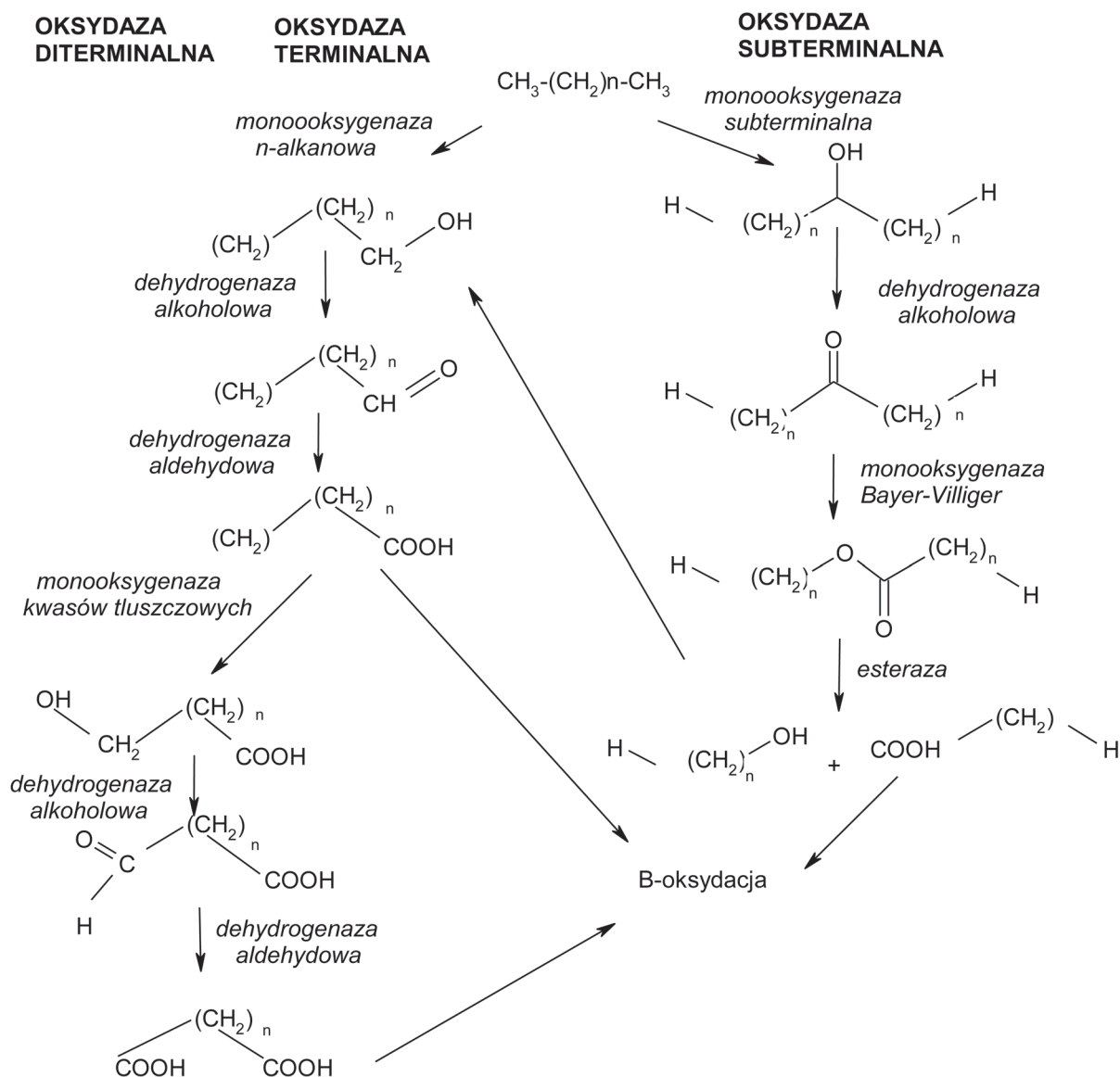
5. Mechanizmy biodegradacji węglowodorów ropopochodnych

Ropa naftowa to wysoce złożona mieszanina wielu tysięcy węglowodorów, które można sklasyfikować w trzech grupach: węglowodory alifatyczne, aromatyczne i związki polarne. Wśród węglowodorów alifatycznych wyróżnia się węglowodory prostolącuchowe, rozgałęzione oraz związki cykliczne. Węglowodory aromatyczne występują w formie związków jednopięścieniowych (np. benzen, toluen) oraz związków poliaromatycznych, np. naftalen, fenantren czy piren [53].

Biodegradacja alkanów prostolącuchowych może przebiegać w wyniku oksydacji:

- terminalnej,
- subterminalnej,
- diterminalnej.

Podczas oksydacji terminalnej dochodzi do insercji aktywnego tlenu do wolnego końca łańcucha alkilowego z wytworzeniem alkoholu pierwszorzędowego. Natomiast podczas oksydacji subterminalnej utlenieniu ulega wewnętrzna grupa metylenowa, w wyniku czego powstaje alkohol drugorzędowy [53, 30, 62, 65]. W obu szlakach działa dehydrogenaza alkoholowa, która utlenia alkohole pierwszorzędowe do aldehydów, zaś związki drugorzędowe transformowane są do ketonów. Kolejną reakcję, podczas oksydacji terminalnej, katalizuje dehydrogenaza aldehydowa, która utlenia grupę aldehydową do karboksylowej. W oksydacji subterminalnej działa monooksygenaza Baeyer-Villiger, która przekształca ketony do estrów, włączając atom tlenu do łańcucha węglowego. Estrы ulegają hydrolizie pod wpływem esteraż [8,35]. Produktami tego rozszczepienia są kwasy karboksylowe (włączane w centralny metabolizm) oraz alkohol, który na drodze oksydacji terminal-



Rys. 3. Szlaki tlenowej biodegradacji alkanów prostołańcuchowych [30]

nej zostaje przekształcony do kwasu karboksylowego. Trzecim szlakiem degradacji jest oksydacja diterminalna, inaczej β -oksydacja, czyli oksydacja obu końców łańcucha węglowego. W procesie tym, po utlenieniu jednej z końcowych grup alkanu włącza się mono-oksigenaza kwasów tłuszczowych, utleniająca końcowy węgiel po przeciwnej stronie. Następnie, w wyniku działania dehydrogenaz alkoholowej i aldehydowej, powstaje kwas dikarboksylowy. Kwas tłuszczowy powstałe w każdym z opisanych szlaków podlegają aktywacji z udziałem syntetazy acylo-CoA i w tej postaci wchodzi do szlaku β -oksydacji, który generuje cząsteczki acetylo-CoA (rys. 3) [54, 77].

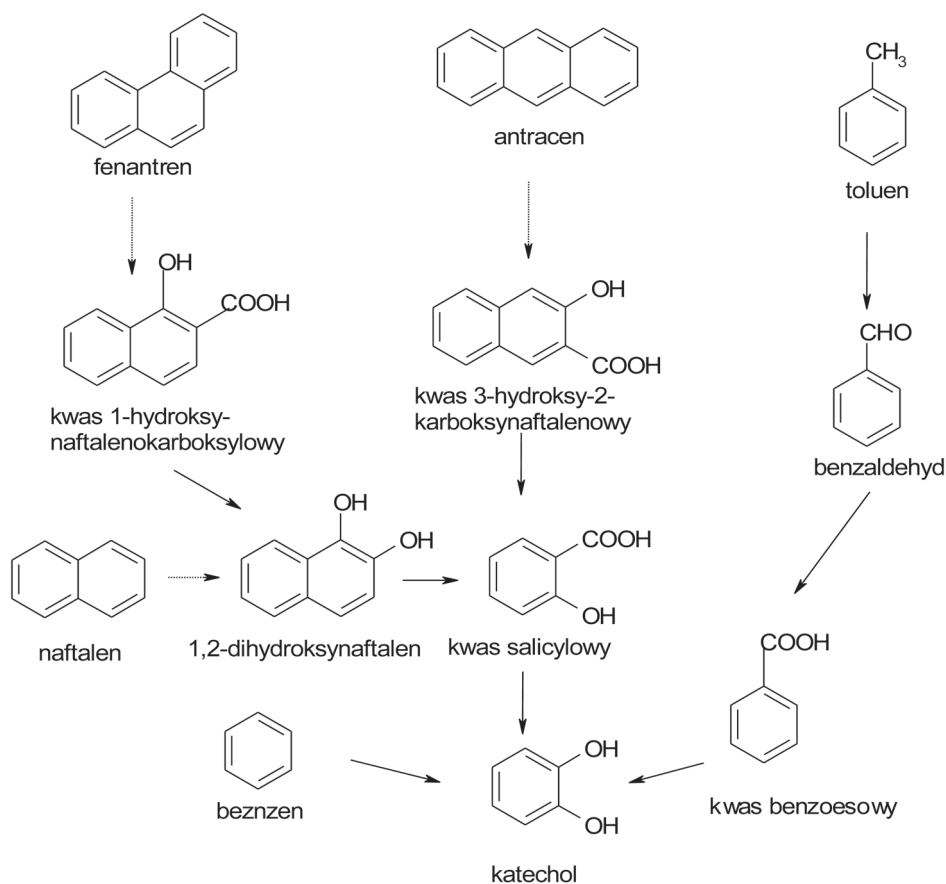
Większość wyizolowanych mikroorganizmów degradujących węglowodory cykliczne posiada enzymy utleniające związki zawierające od 5 do 7 atomów węgla w pierścieniu. Na rysunku 4 przedstawiono szlak biodegradacji cykloheksanu występujący u *Acinetobacter*, *Bre-*

vibacterium i *Arthrobacter* [1,72]. Biodegradacja cyklo-alkanów u tych mikroorganizmów przebiega poprzez: cykloheksanol, cykloheksanon, kaprolakton, kwas 6-hydroksyheksanowy, kwas 6-okso-heksanowy oraz kwasu heksanodiowego [3].

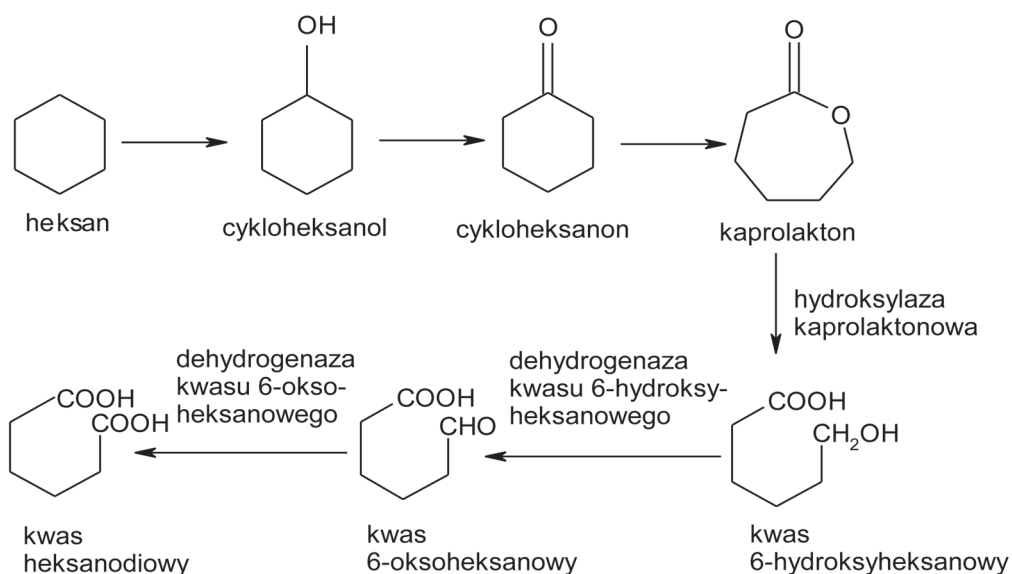
Większość węglowodorów ropopochodnych należy do związków aromatycznych ulegających biodegradacji do katecholu i kwasu protokatechowego. Oba te związki posiadają dwa typy szlaków biodegradacji:

- 1) szlak intradiolowy – rozszczepienie pierścienia między dwoma sąsiadującymi atomami węgla, co prowadzi do powstania kwasów dikarboksylowych;
- 2) szlak ekstradiolowy – rozszczepienie pierścienia między hydroksylowym i niehydroksylowym atomem węgla.

Związki takie jak: benzen, toluen, fenantren i antracen w pierwszej fazie procesu biodegradacji są przekształcane do katecholu (rys. 5) [65].



Rys. 4. Szlak biodegradacji cykloheksanu

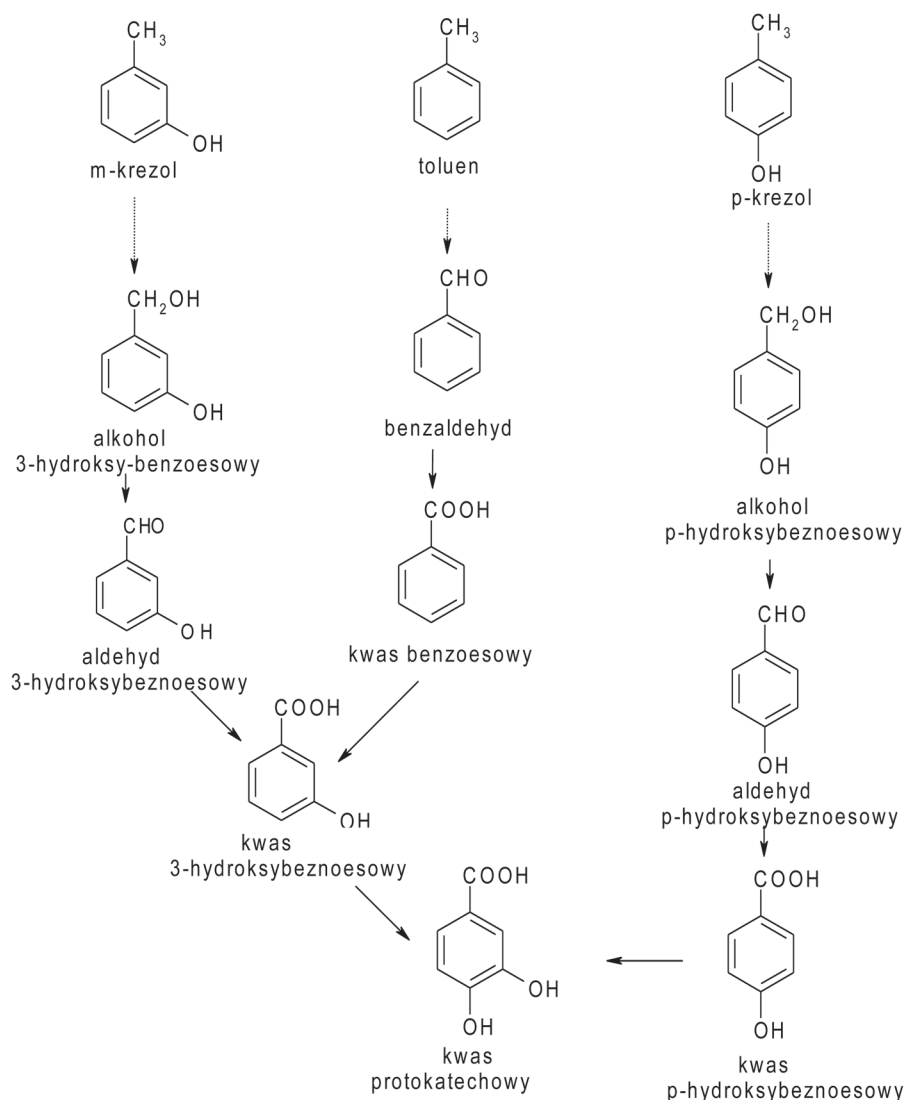


Rys. 5. Degradacja związków aromatycznych do katecholu

Do kwasu protokatechowego są przekształcane pierścienie aromatyczne podwójnie podstawione w pozycjach 1,2-, 1,3- i 1,4- np.: w *m*-krezolu, *p*-krezolu, jak również pierścienie podstawione wielokrotnie. We wszystkich przypadkach do pierścienia włączają się grupy hydroksylowe (rys. 6) [69].

Podsumowanie

W procesie bioremediacji terenów skażonych związkami ropopochodnymi duże znaczenie odgrywają mikroorganizmy jednak z naukowego punktu widzenia ważnym jest poznanie szlaków biodegradacji tych



Rys. 6. Degradacja związków aromatycznych do kwasu protokatechowego

związków. Nie mniej istotna pozostaje również ocena czy powstałe w wyniku rozkładu metabolity pośrednie nie stanowią większego niż substancje wyjściowe zagrożenia dla środowiska przyrodniczego. Z prowadzonych badań dotyczących biodegradacji związków toksycznych, wynika, że związki powstałe w procesie degradacji są bardziej toksyczne niż substraty, z których powstały. Ze względów bezpieczeństwa organizmów żywych, procesy te powinny być bardziej kontrolowane i badane. Postępujący stan zanieczyszczenia środowiska, spowodowany niezwykle intensywnym rozwojem technologii, sprawia, że większość prowadzonych obecnie prac badawczych skupiona jest na znalezieniu skutecznych i bezpiecznych metod eliminacji toksycznych dla środowiska związków. Jednym z głównych celów badań wielu zespołów naukowych na świecie jest poznanie mechanizmów degradacji związków ropopochodnych. Zachorowalność na różne nowotwory ciągle rośnie, jedną z przyczyn takiego stanu jest wciąż postępujące zanieczyszczenie środowiska. Dlatego w prezentowanej pracy przeglądowej celowym stało

się poświęcenie uwagi problemom rozprzestrzeniania się substancji ropopochodnych, omówieniem mechanizmów ich biodegradacji oraz charakterystyką mikroorganizmów biorących w nich udział.

Piśmiennictwo

1. Abed R.M.M., Safi N.M.D., Köster J., de Beer D., El-Nahhal Y., Rullkötter J., Garcia-Pichel F.: Microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds. *Appl. Environment. Microbiology*, **68**, 1674–1683 (2002)
2. Aichberger H., Hasinger M., Braun R., Loibner A.P.: Potential of preliminary test methods to predict biodegradation performance of petroleum hydrocarbons in soil. *Biodegradation*, **16**, 115–125 (2005)
3. Assinder S.J., Williams P.A.: The TOL plasmids: determinants of the catabolism of toluene and the xylenes. *Adv. Microb. Physiol.* **31**, 1–69 (1990)
4. Baek K.H., Yoon B.D., Oh H.M., Kim H.S., Lee I.S.: Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by *Nocardia* sp. H17-1, *Geomicrobiology J.* **23**, 253–259 (2006)

5. Bajaj M., Gallert C., Winter J.: Treatment of phenolic wastewater in an anaerobic fixed bed reactor (AFBR) – Recovery after shock loading. *J. Hazard. Mater.* **162**, 1330–1339 (2009)
6. Barański A., Gworek B.: Ocena ryzyka zdrowotnego i środowiskowego pochodzącego od gruntów zanieczyszczonych produktami naftowymi. Monografia. Instytut Ochrony Środowiska w Warszawie, 2004
7. Baxter J., Cummings S.P.: The current and future applications of microorganism in the bioremediation of cyanide contamination. *Antonie van Leeuwenhoek*, **90**, 1–17 (2006)
8. Beam M.P., Bosserman M.A., Noinaj N., Wehenkel M., Rohr J.: Crystal structure of Baeyer-Villiger monooxygenase MtmOIV, the key enzyme of the mithramycin biosynthetic pathway. *Biochemistry*, **48**, 4476–4487 (2009)
9. Bednarski W., Fiedurek J.: Podstawy biotechnologii przemysłowej, WNT, Warszawa, 37–76, 2007
10. Bento F.M., Camargo F.A.O., Okeke B.: Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresour. Technology*, **96**, 1049–1055 (2005)
11. Biedrowski Z., Troć M.: Zanieczyszczenie gruntów i wód gruntowych substancjami ropopochodnymi na wybranych stacjach paliw CPN w Wielkopolsce. W: Współczesne Problemy Hydrogeologii. Górski J., Liszkowska E. [red.]. Tom VIII, 261–264, Wrocław 1997
12. Bilek M.: Zanieczyszczenie środowiska naturalnego przez WWA. *Biuletyn Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Krakowie*, **6** (2004).
13. Cardinali A., Otto S., Vischetti C., Brown C., Zanin G.: Effect of pesticide inoculation, duration of composting, and degradation time on the content of compost fatty acids, quantified using two methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **76** (19), 6600–6606 (2010)
14. Carmona M., Zamarró M.T., Blazquea B., Durante-Rodriguez G., Juárez J.F., Valderrama J.A., Barragan M.J.L., Garcia J.L., Diaz E.: Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**, 71–133 (2009)
15. Cerniglia C.E.: Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **19**, 324–333 (1997)
16. Cęckiewicz S.: Zanieczyszczenie środowiska produktami i odpadami naftowymi. *Biuletyn ITN*, **3/96**, 27 (1996)
17. Chang B.V., Lu Z.J., Yuan S.Y.: Anaerobic degradation of nonyl-phenol in subtropical mangrove sediments. *J. Hazard. Mater.* **165**, 162–167 (2009)
18. Chen K.F., Kao C.H.M., Chen C.H.W., Surampalli R.Y., Lee M.S.: Control of petroleum-hydrocarbon contaminated groundwater by intrinsic and enhanced bioremediation. *J. Environ. Sci.* **22**, 846–871 (2010)
19. Chmiel A. Biotechnologia, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 231–259, 1998
20. Çinar Ö.: Biodegradation of central intermediate compounds produced from biodegradation of aromatic compounds. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **26**, 341–345 (2004)
21. Czechowski F., Kołwzan B.: Biodegradacja ropy naftowej z otworu Radoszyn – 1 przez mikroorganizmy glebowe. *Ekotoksykologia w Ochronie Środowiska*. 69–74 (2008)
22. Czop M., Wandrasz J.W.: Procesy ruchu wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w glebach. Bioakumulacja. Monografia: *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych*. Wyd. IOŚ, Warszawa, **31**, 144–148 (2007)
23. Das K., Mukherjee A. K.: Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresour. Technol.* **98**, 1339–1345 (2007)
24. Fabiszewska T., Fabiszewska-Bajer J.: Biotetoksykacja gruntów skażonych substancjami ropopochodnymi. *Fizykochemiczne Problemy Mineralurgii*, **27**, 219 (1993)
25. Fabiszewska T., Fabiszewska-Bajer J.: Mikrobiologiczne oczyszczanie gruntu metodą „in situ”. *Forum Chemiczne*, **97**, 71 (1997)
26. Falatko D.M., Novak J.T.: Effects of biologically produced surfactants on the mobility and biodegradation of petroleum hydrocarbons. *Water Environment Research*, **64**, 163–169 (1992)
27. Farbiszewska T., Sudoł T., Fabiszewska-Bajer J., Sowa J., Marcjasz I.: Porównanie metody biosanacji gleby z oleju napędowego z innymi metodami. *Fizykochemiczne Problemy Mineralurgii*, **32**, 157–163 (1998)
28. Głazowska M.A., Pikowskij J.I.: Kompleksnyj eksperyment po izuczeniju faktorow samooczyszczeniya i rekultiwacii zagraznionnykh nieftiju poczw w rozlicznykh prirodnykh zonach, Trudy III Wsesojuznogo Sowiewieszczaniya Migracija zagrazniajuszczich wieszczestw w poczwach i sopriedielnykh sriedach, Leningrad, *Gidrometeoizdat*, 185–191 (1985)
29. Goi A., Trapido M., Kukik N., Palmroth M.R.T., Tuhkanen T.: Ozonization and Fenton treatment for remediation of diesel fuel contaminated soil. *Ozone – Sci. Eng.* **28**, 37–46 (2006)
30. Guzik U., Wojcieszynska D., Krysiak M.: Mikrobiologiczny rozkład alkanów ropopochodnych. *Nafta-Gaz*, **56**, 1019–1027 (2010)
31. Haapea P., Tuhkanen T.: Integrated treatment of PAH contaminated soil by soil washing, ozonation and biological treatment. *J. Hazard. Mater.* **136**, 244–250 (2006)
32. Harrisom, Roy M. El Medio Ambiente: Introducción a la química medioambiental y a la contaminación. Zaragoza, España. Editorial ACRIBIA S.A. p. 214 (2003)
33. Husain S., Siddique M., Sleem M.: Bioremediation and phytoremediation of pesticides: recent advances. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **39**, 843–907 (2009)
34. Iranzo M., Sainz-Pardo I., Boluda R., Sánchez J., Mormeneo S.: The use of microorganisms in environmental remediation. *Ann. Microbiol.* **51**, 135–143 (2001)
35. Iwaki H., Wang S., Grosse S., Bergeron H., Nagahashi A., Lertvorachon J., Yang J., Konishi Y., Hasegawa Y., Lau P.C.K.: *Pseudomonas cyclopentadecanone* monooxygenase displaying an uncommon spectrum of Baeyer-Villiger oxidations of cyclic ketones. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2707–2720 (2006)
36. Jacobs M.A., Waldron D.F. M.: Approaches to sheltered-water oil spills. *Sea Techn.* **36** (10), 34–38 (1996)
37. Joo H.S., Ndegwa P.M., Shoda M., Phae C.G.: Bioremediation of oil-contaminated soil using *Candida catenulate* and food waste. *Environ. Pollut.* **156**, 245–254 (2008)
38. Juhasz A.L., Naidu R.: Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *Int. Biodeter. Biodegr.* **45**, 57–88 (2000).
39. Juwarkar A., Singh S., Mudhoo A.: A comprehensive overview of elements in bioremediation, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **9**, 215–288 (2010)
40. Katsoyiannis A., Terzi E., Cai Q.Y. On the use of PAH molecular diagnostic ratios in sewage sludge for the understanding of the PAH sources. Is this use appropriate? *Chemosphere*, **69**, 1337–1339 (2007)
41. Kiepuski J.: Efekty zastosowania kultur bakteryjnych do rozkładu ropopochodnych w istniejących układach środowiskowych. *Inżynieria Ekologiczna Nr 2. Technologie odolewania gruntów, odpadów, ścieków*. Materiały konferencji naukowo-technicznej. Wysowa Zdrój 20–22 wrzesień 2000, 97–101
42. Klimiuk E., Lebkowska M.: Biotechnologia w ochronie środowiska. Państwowe Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003
43. Koma D., Hasumi F., Yamamoto E., Ohta T., Chung S.-Y., Kubo M.: Biodegradation of long-chain n-paraffins from waste

- oil of car engine by *Acinetobacter* sp. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **91**, 94–96 (2001)
44. Kononowicz K.A., Bielecki S., Chmiel A., Podstawy biotechnologii. Wyd. Naukowe PWN SA, Warszawa, s. 197–209, 2011
 45. Kopytko M., Ibarra Mojica D.M.: Możliwość biodegradacji węglowodorów ropopochodnych w glebach zanieczyszczonych przez przemysł naftowy. *Inżynieria Mineralna*, **7–12**, 31–48 (2009)
 46. Korzeniowska-Rejmer E.: Wpływ zanieczyszczeń ropopochodnych na charakterystykę geotechniczną gruntów stanowiących podłoże budowlane. *Inżynieria Morska i Geotechnika*, **2**, (2001)
 47. Kowalik P.: "Ochrona środowiska glebowego", PWN, W-wa, 2001
 48. Krasowiak K., Śmigielski K., Kwapisz E., Marchut O.: Remediacja gleby zanieczyszczonej węglowodorami naftowymi. *Scientific Bulletin of the Technical University of Lodz. Ford Chemistry and Biotechnology*, **72 (1029)**, 89–97 (2008)
 49. Kulik N., Goi A., Trapido M., Tuhkanen T.: Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by combined chemical pre-oxidation and bioremediation in creosote contaminated soil. *J. Environ. Manage.*, **78**, 382–391 (2006)
 50. Kurek E., Król M.J., Zielewicz-Dukowska J., Perzyński A.: Rozkład produktów naftowych zanieczyszczających glebę przez bakterie wykorzystujące azot atmosferyczny. *Ekologia w przemyśle rafineryjnym* 2001, Konferencja Naukowo-Techniczna Kielce 10-12.10.2001
 51. Kwapisz E., Patek M., Polak J., Piotrowicz-Wasiak M., Galas E.: *Zesz. Nauk. Politech. Śląsk*, **45**, 285–292 (2000)
 52. Kwapisz E., Polak J., Wojdowska W., Wasiak M., Bielecki S.: Charakterystyka szczepu *Gordonia alkanivorans* S7 degradującego węglowodory oleju napędowego w obecności azotanów. *Ochrona przed korozją*, **9S/A**, 47–49 (2006)
 53. Kwapisz E.: Szlaki tlenowej biodegradacji węglowodorów ropy naftowej. *Biotechnologia*, **73**, 166–188 (2006)
 54. Lattuat A., Metzger P., Acquaviva M., Bertrand J.C., Largeau C.: n-Alkane degradation by *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* strain SP 17: long chain β -hydroxy acids as indicator of bacterial activity. *Organic Geochemistry*, **33**, 37–45 (2002)
 55. Lyman W.J., Noonan D.C.: Cleanup of petroleum contaminated soils at underground storage tanks, NDC, Park Ride, (NJ), 1990
 56. Malicka M.: Biotechnologiczne metody oczyszczania gleb skażonych związkami ropopochodnymi i innymi toksycznymi związkami organicznymi. *Gaz, Woda i Technika Sanitarna*, **2**, 4 (1994)
 57. Małachowska-Jutcz A., Mrozowska J., Kozielska M., Miksch K.: *Biotechnologia*, **1(36)**, 79–91 (1997)
 58. Manuel Carmona M., Zamarro M.T., Blázquez B., Durante-Rodríguez G., Juárez J. F., Valderrama J. A., Barragán M. J. L., García J. L., Díaz E.: Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. *Microbiol Mol Biol Rev.*, **73(1)**, 71–133 (2009)
 59. Margesin R., Hammerle M., Tschernko D.: Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time. *Microb. Ecol.*, **53**, 259–69 (2007)
 60. Margesin R., Schinner F.: Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an Alpine Glacier Skiing Area. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 3127–3133 (2001)
 61. Nowak J.: Bioremediacja gleb z ropy i jej produktów. *Biotechnologia*, **1 (80)**, 97–108 (2008)
 62. Okoh A.I.: Biodegradation alternative in the clean up of petroleum hydrocarbon pollutants. *Biotechnology and Molecular Biology Review.*, **1**, 38–50 (2006)
 63. Pastewski S., Czachorowski P., Mędrzycka K.: Usuwanie hydrofobowych zanieczyszczeń ropopochodnych z gleby metodą odmywania za pomocą roztworów związków powierzchniowo czynnych. Polska Inżynieria Środowiska pięć lat po wstąpieniu do Unii Europejskiej, red. J. Ozonek, M. Pawłowska. Lublin, Monografie Polskiej Akademii Nauk Komitet Inżynierii Środowiska. T. 1, **58**, 183–189 (2009)
 64. Ritalahti K.M., Löffler F.E., Rasch E.E., Koenigsberg S.: Bioaugmentation for chlorinated ethene detoxification: bioaugmentation and molecular diagnostics in the bioremediation of chlorinated ethene-contaminated sites. *Ind Biotechnol.*, **1**, 114–118 (2005)
 65. Rojo F.: Degradation of alkanes by bacteria. *Environ. Microbiol.*, **11**, 2477–2490, (2009)
 66. Semple K.T., Reid B.J., Fermor T.R.: Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environ. Poll.*, **112**, 269–283 (2001)
 67. Shield M.S., Montgomery S.O., Cuskey S.M., Chapman P.J., Pritchard P.H.: Novel pathway of toluene catabolism in the trichloroethylene – degrading bacterium 04. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1624–1629 (1989)
 68. Simon M.J., Osslund T.D., Saunders R., Esley B., Suggs S., Harcourt A., Suen W.C., Cruden D.L., Gibson D.T., Zylstra G.J.: Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonasputida* strains G7 and NCIB 9816-4. *Gene*, **127**, 31–37 (1993)
 69. Smits T.H.M., Balada S.B., Witholt B., van Beilen J.B. *Functional analysis of alkane hydroxylases from gram-negative and gram-positive bacteria. J. Bacteriol.*, **184**, 1733–1742, 2002
 70. Steliga T.: Gospodarka wodami i ściekami kopalnianymi podczas eksploatacji ropy naftowej i gazu ziemnego. WUG „Bezpieczeństwo pracy i ochrona środowiska w górnictwie”, **3**, 29–31 (1997)
 71. Steliga T.: Sposoby oczyszczania ścieków i wód złożowych w kopalniach ropy naftowej i gazu ziemnego. *Inżynieria Ekologiczna Nr 2. Technologie odolewania gruntów, odpadów, ścieków*. Materiały konferencji naukowo-technicznej. Wysowa Zdrój 20–22 wrzesień 2000, 14–22
 72. Szczepocka A., Prędecka A., Pawlak A., Dmochowski D.: Wpływ infrastruktury drogowej na zanieczyszczenie gleb WWA i substancjami ropopochodnymi na przykładzie giełdy samochodowej w Słomczynie. Bioakumulacja. Monografia: *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych*. Wyd. IOŚ, Warszawa, **31**, 149–153 (2007)
 73. Sztompka E.: Biodegradation of engine oil in soil. *Acta Microbiol. Pol.*, **48**, 185–196 (1999)
 74. Throne-Holst M., Wentzel A., Ellingsen T.E., Kotlar H.-K., Zotchev S.B.: Identification of novel genes involved in longchain n-alkane degradation by *Acinetobacter* sp. Strain DSM 17874. *Appl. Environment. Microbiol.*, **73**, 3327–3332 (2007)
 75. Tsai T.T., Kao C. M., Yeh T.Y. Liang S.H., Chien H.Y.: Remediation of fuel oil-contaminated soils by a three-stage treatment system. *Environ. Eng. Sci.*, **26**, 1779–1485 (2009)
 76. Vidali M.: Bioremediation. An overview. *Pure Appl. Chem.*, **73**, 1163–1172 (2001)
 77. Warhurst A. M., Fewson C. A.: Metabolism of styrene by *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **14**, 29–73 (1994)
 78. Wojewódzki Inspektorat Ochrony Środowiska w Białymstoku: „Współczesne metody lokalizacji i oceny zanieczyszczeń środowiska substancjami ropopochodnymi”, Seminarium Ratownicze, Adamowo (2006)
 79. Yen K.M., Karl M.R., Blatt L.M., Simon M.J., Winter R.B., Fausset P.R., Lu H.S., Harcourt A.A., Chen K.K.: Cloning and characterization of *Pseudomonas mendocina* KRI gene cluster encoding touene -4- monooxygenase. *J. Bacteriol.*, **173**, 5315–5327 (1991)

80. Yu D.Y., Nangoo K., Wookeun B., Banks M.K.: Characteristics in oxidative degradation by ozone for saturated hydrocarbons in soil contaminated with diesel fuel. *Chemosphere*, **66**, 799–807 (2007)
81. Zadroga B., Oleńczuk-Neyman K.: Ochrona i rekultywacja podłoża gruntowego. Wyd. Politechniki Gdańskiej, Gdańsk (2001)
82. Zamorska J., Papciak D.: Usuwanie związków ropopochodnych z gruntu – mikroorganizmy i warunki prowadzenia procesu. *Zeszyty Naukowe Politechniki Rzeszowskiej. Budownictwo i Inżynieria Środowiska* z. 38, **218**, 159–169 (2004)
83. Zhang C., Bennett G.N.: Biodegradation of xenobiotics by anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **67**, 600–618 (2005)
84. Zylstra G.J., Gibson D.T.: Toluene degradation by *Pseudomonas putida* FI, nucleotide sequence of the tod CICBADE genes and their expression in *E. coli*. *J. Biol. Chem.* **264**, 149400–149446 (1989)

METODY FLUORESCENCYJNEGO BARWIENIA KOMÓREK W BADANIACH STANU FIZJOLOGICZNEGO BAKTERII

Magdalena Olszewska^{1*}, Łucja Łaniewska-Trokenheim¹

¹ Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Wydział Nauki o Żywności, UWM w Olsztynie,
Pl. Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn

Wpłynęło w lipcu 2012 r.

1. Wstęp. 2. Mikroskopia epifluorescencyjna. 3. Cytometria przepływowa. 4. Barwniki fluorescencyjne. 5. Hybrydyzacja DNA, RNA. 6. Zastosowanie metod fluorescencyjnego barwienia komórek. 7. Podsumowanie

Fluorescence-based methods of cell staining in physiological state studies of bacteria

Abstract: Despite the fact that traditional, standardized methods give satisfactory results, in fact, they are nonautomated methods, which are characterized by a long period of time in obtaining results. Progress in microbiological analysis thus requires improvements towards the instrumental and molecular methods. Fluorescence techniques are a combination of both these directions, offering an interesting alternative to the conventional, culturing methods. The article discusses the benefits and limitations of the use of fluorescence-based staining methods. The potential use in diverse microbiological directions was described.

1. Introduction. 2. Epifluorescence microscopy. 3. Flow cytometry. 4. Fluorescent dyes. 5. Hybridization DNA, RNA. 6. Application of fluorescence-based methods of cell staining. 7. Summary

Słowa kluczowe: cytometria przepływowa, mikroskopia epifluorescencyjna, techniki fluorescencyjnego barwienia komórek

Key words: flow cytometry, epifluorescence microscopy, fluorescence-based methods of cell staining

1. Wstęp

Rozwój metod analitycznych wiąże się z wdrożeniem nowocześniejszych rozwiązań, dzięki którym czas oczekiwania na wynik jest krótszy, a wynik bardziej wiarygodny. Wiele z dostępnych dzisiaj rozwiązań wyznacza kierunki, którymi podąża także analityka mikrobiologiczna. Na specjalne zainteresowanie zasługują metody, pozwalające na otrzymanie rzetelnych wyników w czasie zbliżonym do rzeczywistego [2, 12]. Innymi ważnymi kryteriami, które powinny być spełnione podczas postępowania analitycznego, to: powtarzalność wyników, łatwość optymalizacji procedury, wysoka wartość diagnostyczna, np. jednoczesna analiza wielu parametrów komórkowych oraz łatwość i szybkość wykonania. Potrzeba usprawnienia i przyspieszenia postępowania analitycznego wymusza wprowadzenie aparatury i technik komputerowych [6, 40]. Na rynku dostępne są urządzenia do bezpośredniego liczenia komórek bakteryjnych, spełniające ww. kryteria. Przykładem takich rozwiązań są mikroskop epifluorescencyjny oraz cytometr przepływowy, których zasada działania oparta jest na detekcji sygnału fluorescencyjnego. Odkrycie szeregu barwników fluorescencyjnych, tzw. fluorochromów (*flu-*

orochromes) umożliwiło dokładniejszą analizę bakterii na poziomie strukturalnym i funkcjonalnym. Większość tego rodzaju badań polega na znakowaniu komórek wybranym fluorochromem i przeprowadzeniu analizy mikroskopowej lub cytometrycznej.

2. Mikroskopia epifluorescencyjna

Analiza mikroskopowa przeprowadzona po zastosowaniu metody bezpośredniej epifluorescencji – DEFT (*direct epifluorescent filter technique*), umożliwia szybką detekcję i oznaczenie liczby komórek bakteryjnych [38]. Zasada DEFT polega na wykonaniu oznaczenia poprzez filtrację odpowiednio przygotowanej próbki komórek zabarwionych odpowiednim fluorochromem. Komórki można barwić przed filtracją, poprzez dodanie barwnika do zawiesiny komórek lub bezpośrednio po osadzeniu komórek na filtrze [13]. Modyfikacją tej procedury jest zastosowanie specjalistycznych szkiełek ze studzienkami, np. szkiełek HTC[®], na powierzchni których, po naniesieniu i odparowaniu próbki, dochodzi do osadzenia komórek [4]. Fluorescencyjna analiza preparatów mikroskopowych odbywa się w systemie

* Autor korespondencyjny: Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Wydział Nauki o Żywności, UWM w Olsztynie, Pl. Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn; tel.: +48 89 5233736; fax: +48 89 5234516; e-mail: magdalena.olszewska@uwm.edu.pl

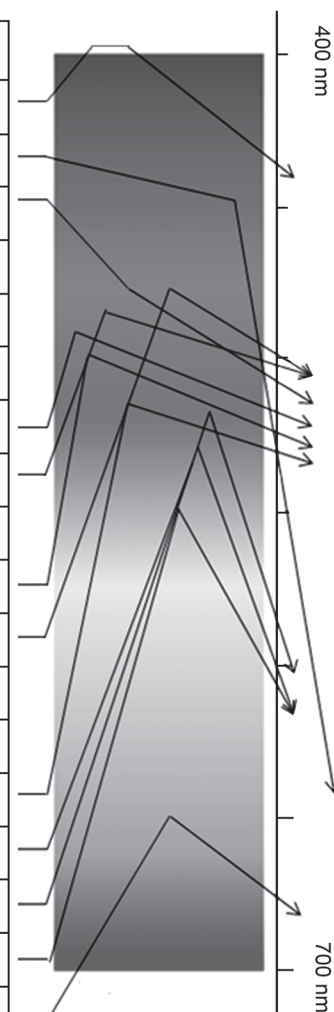
epiluminacji, w którym wiązka wzbudzająca, przechodząc przez obiektyw, kierowana jest na preparat z góry, ulega rozproszeniu, a emitowane przez preparat światło przechodzi z powrotem przez obiektyw. Źródłem światła jest specjalna lampa, rtęciowa lub ksenonowa. Lampa ksenonowa zapewnia ciągle widmo światła, rtęciowa natomiast poszczególne linie widma. Lampa ksenonowa zalecane jest w momencie, gdy spektrum absorpcji wybieranych do oznaczeń barwników nie odpowiada zakresowi światła żarnika rtęciowego [18]. Umieszczony na drodze wiązki pierwotnej filtr przepuszcza światła odpowiadające wzbudzeniu fluorescencji w badanym preparacie. Barwiony fluorochromem preparat selektywnie absorbuje światło i emituje, według zasady Stokesa, fotony o niższej energii ale wyższej długości fali, co przekłada się na różnice między profilem wzbudzenia i emisji barwnika. Zwierciadło dichroiczne, umieszczone na drodze ścieżki wzbudzenia i emisji, pozwala uzyskać efekt odbicia i skierowania fali wzbudzającej, o krótszej długości, do obiektywu oraz przepuszczenia fali emitującej, o większej długości, do okularu. Obser-

wowana barwa fluorescencji jest dopełnieniem do światła zaabsorbowanego i zależy od właściwości fluorochromu [25]. Wybór fluorochromu zależy natomiast od parametru komórkowego, jaki chcemy zbadać oraz długości i intensywności wzbudzenia lampy dostępnej w mikroskopie. Emitowane jest światło widzialne lub podczerwone. Powszechnie stosowane barwniki emitują światło zielone wzbudzone światłem niebieskim (np. iyotioczjanian fluoresceinz – FITC, fluorescein isothiocyanate), czerwone wzbudzone światłem pomarańczowym (np. cyjanina 5 – Cy5, *cyanine 5*), niebieskie wzbudzone UV poniżej 400 nm (np. 4,6-diamidino-2-fenylindol – DAPI, *4,6-diamidino-2-phenyl-indol*) (Tab. I). Dużym ułatwieniem w wyborze barwników fluorescencyjnych jest tzw. Fluorescence SpectraViewer, dostępny na stronie internetowej Life Technologies, będący obszernym zestawieniem fluorochromów wraz z ich specyfikacjami. Wyposażenie mikroskopu w kamerę cyfrową i program komputerowy pozwala rejestrować fluoryzujące komórki, przeprowadzić analizę ilościową i ocenić morfologię komórek.

Tabela I

Charakterystyka barwników fluorescencyjnych użytecznych w badaniach stanu fizjologicznego komórek [18, 34]

Kryterium	Fluorochrom	Wzbudzenie (nm)	Emisja (nm)	Wielkość (Da)
Interkalator DNA	DAPI	340	488	350
Aktywność dehydrogenaz	CTC	450	580–660	332
Aktywność esteraz	FDA	473	514	416
	BCECF-AM	482	520	615
	Chem-Chrome	488	520	–
	CFDA	492	517	460
	Kalceina-AM	494	517	995
Elektrochemiczny potencjał membrany	DiOC ₆ (3)	484	501	573
	DiBAC ₄ (3)	493	516	517
	Rh123	507	529	381
Integralność membran	SYTO9	–	–	~10
	SYTO13	488	509	~400
	SytoxGreen	502	523	600
	TOTO-1	514	533	1302,78
	PI	535	617	668
Aktywny transport	EB	518	605	394
Znaczniki DNA i białek	Cy3	512–552	565–615	766
	Cy5	625–650	670	792



3. Cytometria przepływowa

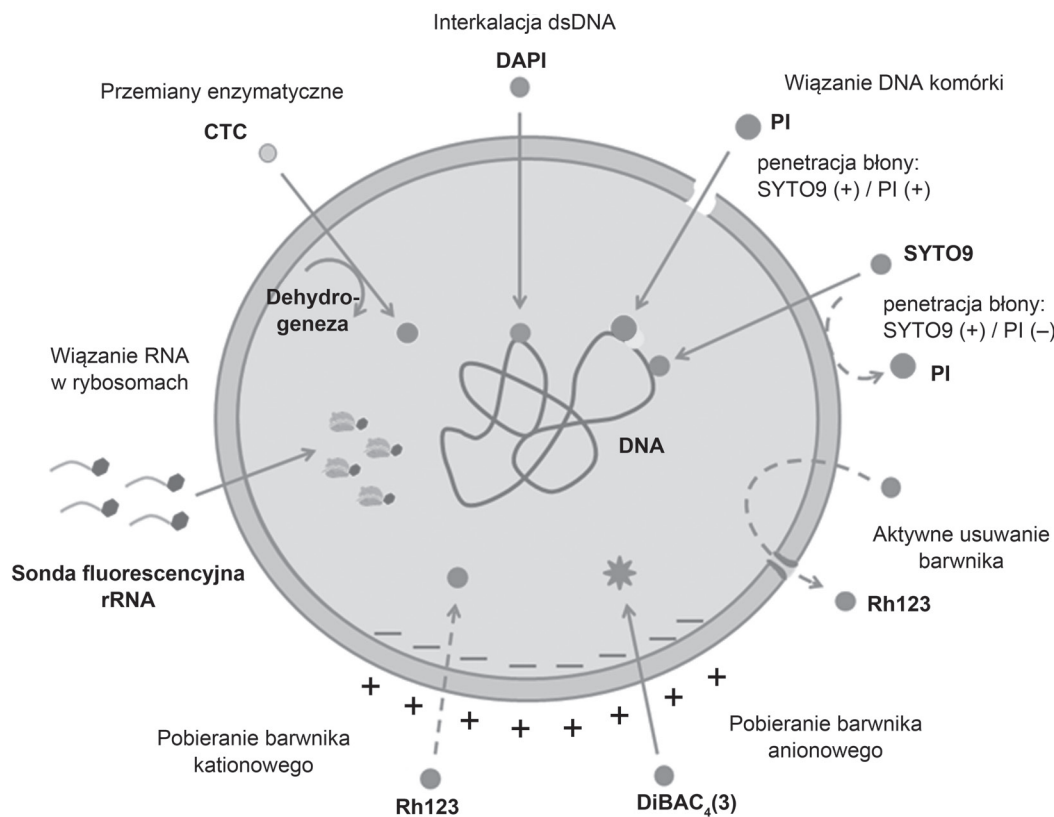
Cytometria przepływowa pozwala na oznaczenie liczby komórek bakteryjnych bezpośrednio w próbce, po połączeniu jej z odpowiednim barwnikiem. Bakterie wychwytyją barwnik, np. prefluorochrom, który pod wpływem enzymów wewnątrzkomórkowych ulega rozszczepieniu, uwalniając cząsteczki zdolne do fluorescencji [13]. Mogą to być także inne fluorochromy, np. barwniki nukleinowe, łączące się z DNA komórki (często stosowany w oznaczeniach cytometrycznych barwnik cyjaninowy – SYBR Green I, *N,N'*-dimethyl-*N*-[4-[(*E*)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2-ylidene)methyl]-1-phenylquinolin-1-ium-2-yl]-*N*-propylpropane-1,3-diamine). W zależności od zastosowanej procedury barwienia istotne jest odpowiednie postępowanie w celu jej zoptymalizowania. Źródłem światła w cytometrze jest laser emitujący światło o określonej długości. Cytometria przepływowa pozwala na wieloparametrową analizę poszczególnych komórek, które znajdują się w strumieniu cieczy pompowanej pod niewielkim ciśnieniem do strefy pomiaru. Komórki przepływają pojedynczo przez promień lasera i powodują rozproszenie światła, a detektory rejestrują rozproszenie na komórcie oraz wysyłane przez wzbudzony fluorochrom. Do tego celu służą odpowiednie detektory: detektor przedni – FSC (*forward scatter channel*), do detekcji rozproszenia zgodnie z kierunkiem wiązki, detektor boczny – SSC (*side scatter channel*), do detekcji rozproszenia pod kątem prostym oraz detektory fluorescencji, tzw. kanały FL (*fluorescence channels*), do detekcji światła emitowanego o różnej długości fali, w zależności od użytego fluorochromu. Kanały FL pozwalają na pomiar intensywności fluorescencji wyznakowanych komórek, w zależności od ilości związanych cząsteczek barwnika. Ostatecznie sygnały rejestrowane przez detektory przetwarzane są na sygnał elektroniczny, przesyłany do komputera [32]. Analiza cytometryczna dostarczyć może informacji o strukturalnych i funkcjonalnych parametrach komórek, tj. wielkość, kształt, ziarnistość, a także integralność błon cytoplazmatycznych, aktywność enzymów i in., zależnie od stosowanego w oznaczeniach fluorochromu oraz wyposażenia instrumentu w odpowiednie lasery i detektory FL. Możliwy jest podział komórek na subpopulacje, np. komórki żywe/aktywne, komórki martwe oraz odróżnienie ich od autofluoryzujących cząstek materii [6, 40]. Zaletą tej techniki jest z pewnością szybki i zautomatyzowany pomiar pojedynczych komórek w populacji. Próg detekcji w cytometrii wynosi około 10^2 komórek/ml, czyli jest przynajmniej 10 razy niższy niż w mikroskopii fluorescencyjnej [18]. Pamiętać jednak należy, że cytometr jest „ślepy”, co oznacza, że dostarcza wyników w postaci liczb, zatem ich interpretacja zależy od pewnego doświadczenia oraz odpowiednio zaplanowanego eksperymentu. Często też, wyniki analizy cytometrycz-

nej dobrze jest uzupełnić wynikami innych metod, np. mikroskopii. Zarówno cytometria jak i mikroskopia, łącząc zastosowanie fluorescencji, wzajemnie się uzupełniają i po oba narzędzia diagnozy sięgają coraz częściej.

Metody barwienia komórek na bazie fluorescencji, w połączeniu z analizą mikroskopową lub cytometryczną, pozwalają na wiarygodne określenie przeżywalności komórek, niezależnie od stanu fizjologicznego i zdolności namnażania. Metody te służą ocenie anatomicznych i fizjologicznych parametrów komórek. Sondowane są te właściwości, które pozwalają stwierdzać o utrzymaniu lub utracie spójności struktur komórkowych, przemian energetycznych, zdolności biosyntetycznych [5, 18] (rys. 1).

4. Barwniki fluorescencyjne

Wiedza z zakresu budowy i funkcji komórki pozwoliła opracować różne fluorochromy jako wyznaczniki żywotności komórek bakteryjnych (rys. 1). Informacji na temat żywotności bakterii mogą dostarczyć znaczniki potencjału membranowego – MP (*membrane potential*). Komórka utrzymuje swój elektrochemiczny potencjał błony cytoplazmatycznej poprzez selektywną przepuszczalność jonów oraz aktywność respiracyjną lub hydrolityczną ATP. Komórka usuwa jony H^+ , co skutkuje tym, że wewnętrzna strona błony przyjmuje ładunek ujemny a zewnętrzna dodatni. Funkcje komórki, tj. synteza ATP, transport aktywny substancji oraz ruchliwość komórki są zależne od utrzymania potencjału membranowego, więc znajduje on uzasadnienie w fluorescencyjnej detekcji żywotności bakterii, np. w badaniach uszkodzeń błony pod wpływem różnych substancji bakteriostatycznych [20]. Barwniki MP, w zależności od posiadanego ładunku, dodatniego lub ujemnego, mogą kumulować się odpowiednio w polaryzowanych lub zdepolaryzowanych komórkach. Przykładami barwników kationowych są: rodamina (Rh 23 – *rhodamine* 123) czy karbocyjaniny, np. 3,3'-heksylokarbocyjanian jodowy – $DIOC_6(3)$ (3,3'-*dihexyloxycarbocyanine iodide*), a barwników anionowych: bis(1,3-kwas dibutylobarbiturowy) trimetylo oxonol – $DiBAC_4(3)$ (*bis*-(1,3-dibutylobarbituric acid) *trimethionine oxonol*), inaczej BOX [18, 30]. Przydatność tych barwników jest różnie oceniana i zależy od skuteczności wstępnej obróbki badanej próbki. Rodzaj zastosowanej permeabilizacji, czyli procedury ułatwiającej wniknięcie barwnika do komórki, jest najważniejszym etapem. Co więcej, w wielu przypadkach wymagane jest kilkukrotne płukania próbki z nadmiaru barwnika w celu zapobiegania fałszywie dodatnim wynikom. Z drugiej strony, taka procedura może wiązać się z odbarwianiem komórek i wpływać na wiarygodność analizy. Ze względu na efektywność barwników anionowych w barwieniu różnych



Rys. 1. Przykłady fluorochromów do wyznaczania stanu fizjologicznego komórek (za zgodą © Elsevier Masson SAS [18])

komórek, od bakterii Gram-dodatnich po Gram-ujemne, te wykazują większy potencjał aplikacyjny w badaniach mikrobiologicznych. Jednak ocena ta nie uwzględnia różnorodnych interakcji, jakie mogą zachodzić między znacznikami o określonym ładunku a składnikami występującymi w badanej próbce [18].

Innym rozwiązaniem jest zastosowanie prekursorów fluorogenicznych, czyli prefluorochromów, będących wskaźnikami aktywności enzymatycznej komórek. Prefluorochrom w formie utlenionej nie fluoryzuje, natomiast po wnikięciu do wnętrza komórki redukowany jest w barwny związek emitując światło fluorescencji (rys. 1) [5]. Najczęściej stosuje się prefluorochromy, które służą badaniu aktywności dehydrogenaz i esteraz. Detekcja aktywności dehydrogenaz możliwa jest poprzez zastosowanie substratu, chlorku 5-cyano-2,3-ditolylo tetrazoliowego – CTC (5-cyano-2,3-ditolylo tetrazolium chloride), który ulega redukcji do nierozpuszczalnego, fluoryzującego na czerwono formazanu. Pozwala to, w tlenowych i beztlenowych warunkach, na ilościową ocenę metabolicznie aktywnych komórek [3, 26, 30]. CTC stosowany jest w badaniach mikrobiocenozy wodnych i lądowych tj. wody pitne, jeziorne, morskie, a także gleby powierzchniowe, osady i biofilmy [18]. Wzmocnienie sygnału fluorescencyjnego w komórkach barwionych CTC można osiągnąć poprzez utrwalanie prób formaldehydem, paraformaldehydem lub stosowanie substratów: glukozy, bursztynianu [5]. Mimo

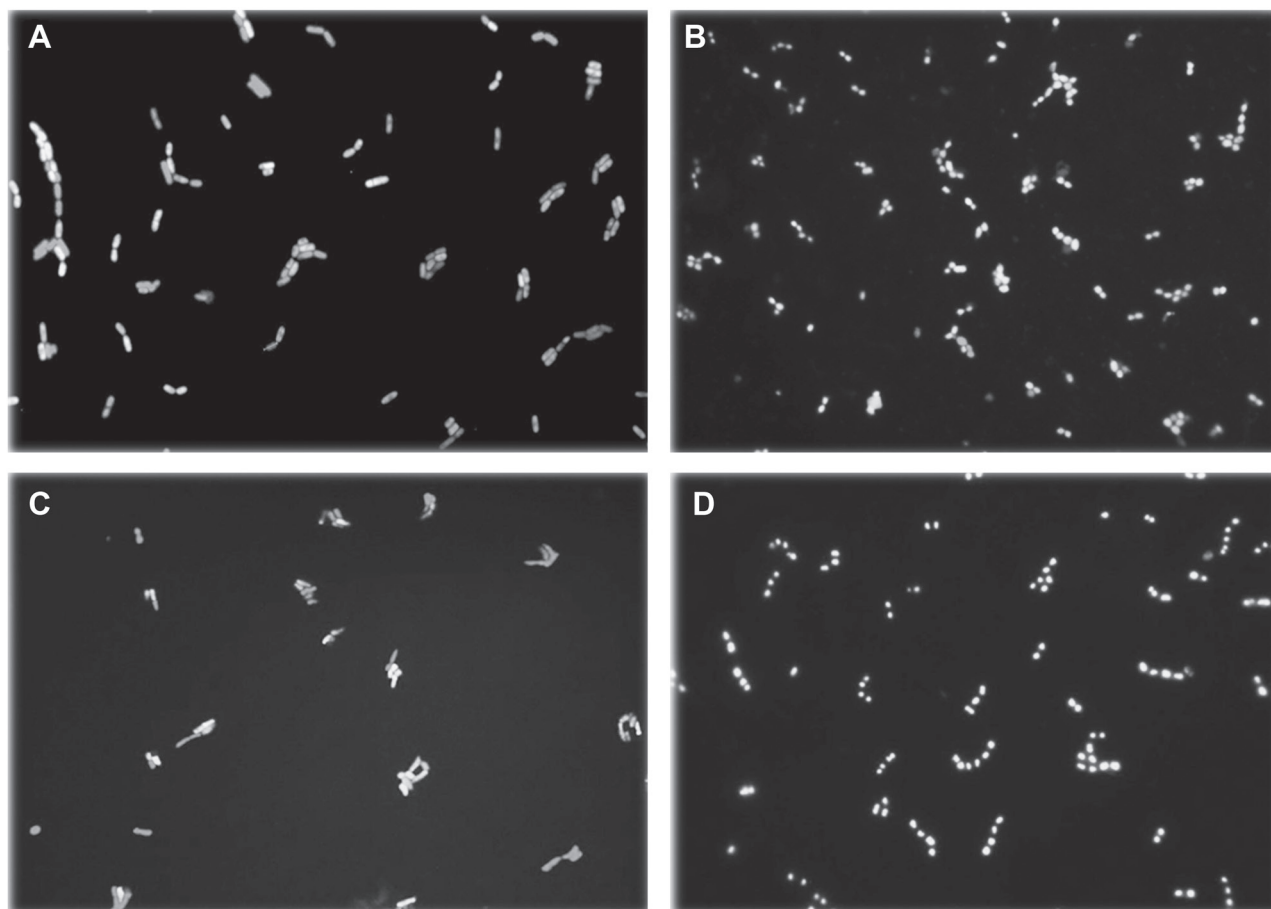
to, częstość stosowania CTC zmniejsza się z powodu toksyczności tego prefluorochromu oraz tworzenia zewnątrzkomórkowych depozytów formazanu i tym samym trudności w określeniu rzeczywistej liczby aktywnych komórek [18]. Identyfikacja aktywności esterolitycznej natomiast, polega na przeniknięciu przez błonę cytoplazmatyczną dwuocianu fluoresceiny – FDA (fluorescein diacetate), hydrolizie grupy dwuocianowej i powstaniu fluoresceiny, która gromadząc się we wnętrzu komórki ze spójną błoną cytoplazmatyczną emituje zieloną fluorescencję. Reakcję tą katalizuje wewnątrzkomórkowa esteraza, a rezultatem jest detekcja komórek wykazujących aktywność przemian metabolicznych [26, 30]. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że w przypadku barwienia niektórych komórek zastosowanie fluoresceiny może być mniej efektywne, ze względu na zjawisko wycieku fluorochromu do macierzy zewnątrzkomórkowej [10, 27]. Problem utrzymania barwnika można zmniejszyć stosując dwuocian karboksylfluoresceiny – CFDA (carboxyfluorescein diacetate) redukowany do karboksylfluoresceiny – CF (carboxyfluorescein) o charakterze hydrofilowym, która ze względu na ujemny ładunek efektywniej barwi komórki o fizjologicznym pH cytoplazmy [18, 33]. Podobny efekt można osiągnąć przy zastosowaniu estru kalceiny – kalceina-AM (calcein acetoxymethyl ester) i estru 2'7'-bis-(2-karboksyetylo)5,6-acetylometylo karboksylfluoresceiny – BCECF-

-AM (2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein acetoxy metyl ester) [17]. Uniknięcie trudności związanych ze słabą retencją barwnika i jego wyciekaniem można także osiągnąć używając rozwiązań typu ChemChrome B® i ChemChrome V®, czyli fluorogenicznych estrów, pochodnych fluoresceiny, przekształczanych przez esterazy do świecących produktów w reakcji odbywającej się w środowisku stosownego buforu. Zwłaszcza ChemChrome V6® przypisuje się znaczną skuteczność w barwieniu komórek różnych gatunków bakterii [18]. Z drugiej strony, aktywny proces usuwania substancji fluorescencyjnej z komórki może posłużyć jako istotny wskaźnik żywotności komórek. Kumulacja barwnika, a następnie jego usuwanie przez pompy protonowe, obserwowane dla Rh123, FDA, CFDA czy bromku etydyny – EB (*ethidium bromide*) bez hamowania tego procesu, świadczy o zachodzących procesach hydrolizy ATP i wskazuje na określoną aktywność komórkową [10, 18].

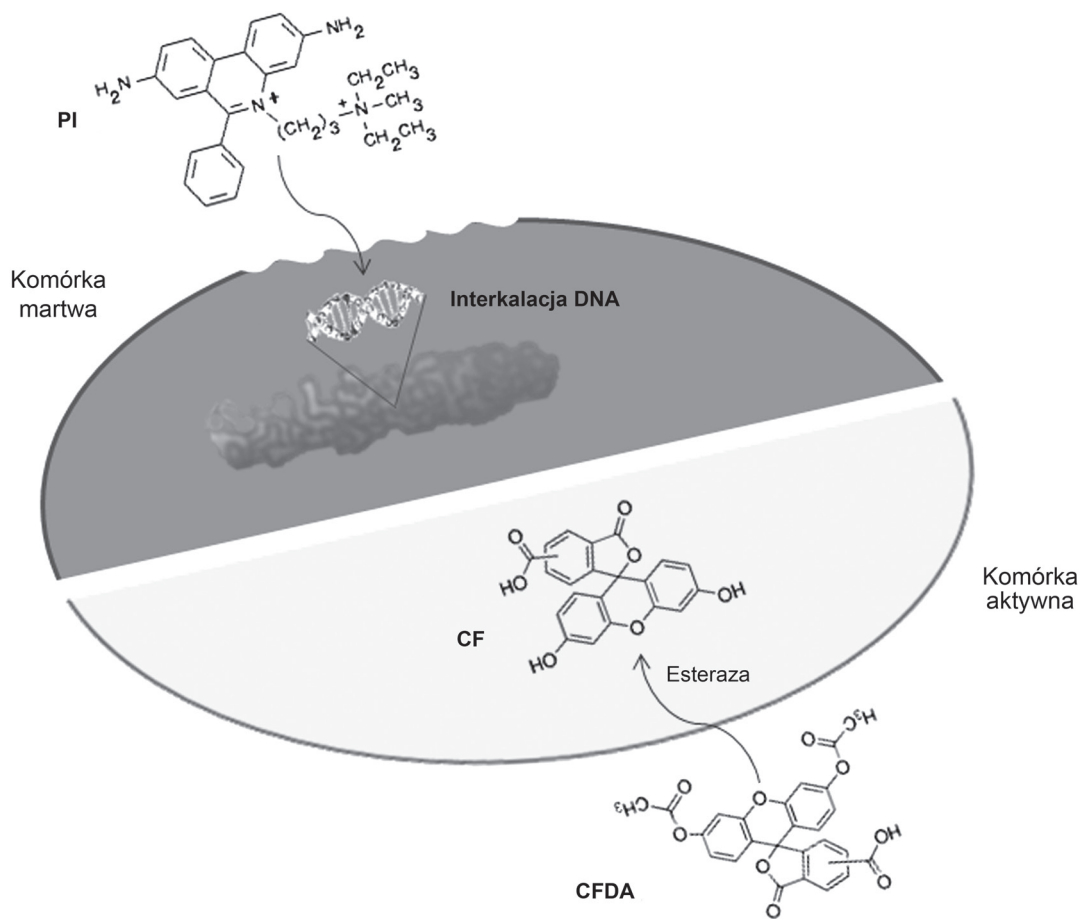
Głębsze poznawanie poziomu zmian żywotności komórek w populacji możliwe jest dzięki zastosowaniu zestawów fluorochromów, umożliwiających zróżnicowanie populacji na komórki żywe/aktywne i komórki martwe (rys. 2). Przykładem takiego zestawu jest LIVE/

DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit, zawierający dwa barwniki – SYTO®9 i jodek propidyny – PI (*propidium iodide*). SYTO®9, ze względu na niską masę cząsteczkową, penetruje żywe oraz martwe komórki, natomiast PI przenika tylko przez te z uszkodzoną błoną, co w efekcie objawia się zieloną fluorescencją komórek żywych a czerwoną martwych (Tab. I) (rys. 2B) [21, 26, 30]. Stosowanie takiego zestawu, umożliwia dwuparametrową analizę badanych próbek przy odpowiednich filtrach/detektorach, w które wyposażony jest mikroskop epifluorescencyjny/cytometr przepływowy. Oba fluorochromy są przykładami barwników nukleinowych, czyli wiążących się z DNA komórki (rys. 1). Duża koncentracja DNA w komórce oraz wzmocnienie fluorescencji, następujące po jego interkalacji, wpływają na skuteczność przeprowadzonej analizy.

Modyfikacje zestawów mogą zawierać inne przepuszczalne przez błony barwniki, np. SYTO®13, o większej przydatności niż SYTO®9 w oznaczaniu komórek żywych czy Sytox Green jako odpowiednik barwnika znakującego komórki martwe [18]. Alternatywą może być także propidyna tetra-1-(4,4,7,7-tetrametylo-4,7-diazandekametyleno)-bis-4-[3-metylo-2,3dihydro



Rys. 2. Obrazy preparatów mikroskopowych wykonane różnymi technikami barwienia fluorescencyjnego komórek: A – pałeczki *Lactobacillus brevis* barwione zestawem CFDA/PI; B – paciorkowce *Lactococcus lactis* barwione zestawem LIVE/DEAD®, C – pałeczki *Propionibacterium freudenreichii* barwione zestawem CFDA/PI, D – paciorkowce *Lactococcus lactis* barwione DAPI



Rys. 3. Mechanizm barwienia CFDA/PI (dwuocian karboksylfluoresceiny/jodek propidyny)

(benzo-1,3-oksazolo)-2-metylidem]-1-(3 trimetyloammonowy propylu) jodek – TOTO-1 (1-(4,4,7,7-tetramethyl-4,7-diazaundecamethylene)-bis-4-[3-methyl-2,3dihydro (benzo1,3-oxazole)-2- methylidene]-1-(3trimethylammoniumpropyl) pyridinium tetraiodide), nukleinowy barwnik komórek martwych, o podwójnie większej masie molekularnej niż PI i wysokim poziomie wzbudzenia fluorescencyjnego (Tab. I) [10]. Próbuje się dobrać w zestawy jeszcze inne markery fluorescencyjne, np. CFDA z PI, w celu rozpoznania komórek aktywnych o zintegrowanych błonach cytoplazmatycznych i komórek martwych z uszkodzeniami w tychże błonach (rys. 3) [1, 31, 33, 34, 37].

Innym sposobem podziału populacji na komórki żywe i martwe jest oznaczenie liczby komórek za pomocą określonego markera żywotności komórek i porównanie z całkowitą liczbą komórek, oznaczoną np. 4,6-diamidino-2-fenylindolem – DAPI (4,6-diamidino-2-phenyl-indol). DAPI łączy się z nukleoidem komórki tworząc kompleks silnie fluoryzujący w kolorze niebieskim (rys. 1) (Tab. I) [3, 5]. Detekcja fluorescencji stanowi efekt swoistego wiązania się DAPI z nienaruszonym dsDNA. W barwieniu tym interkalatorem należy wziąć pod uwagę długi okres półtrwania kwasów nukleinowych, które pozostają spójne po śmierci komórki.

Wobec tego, uwzględniając także możliwość niespecyficznego wiązania DAPI z innymi strukturami komórkowymi, populacja wybarwiona tym markerem to suma komórek żywych, komórek martwych oraz w małym stopniu tzw. komórek widmo (*ghost cells*) [18, 30]. Duża łatwość barwienia komórek barwnikiem DAPI oraz jednoczesne zastosowanie wybranego wskaźnika żywotności komórek, np. CTC, CFDA pozwala określić udział komórek aktywnych do całkowitej liczby komórek w badanej próbce [29].

5. Hybrydyzacja DNA, RNA

Idea zastosowania sond oligonukleotydowych w hybrydyzacji z genomem komórki to perspektywa rozwoju diagnostyki mikrobiologicznej. Sonda to fragment 20–30 par zasad pojedynczej nici nukleotydowej, która komplementarnie łączy się z pojedynczą nicią docelowego regionu kwasów nukleinowych komórki. Region kwasów nukleinowych stanowi pojedyncza nić cząsteczki DNA lub RNA [12]. Szybko rozwijająca się dziedzina genomiki w kierunku sekwencjonowania rybosomalnego RNA wpłynęła na wzrost stosowania sond oligonukleotydowych rRNA w mikrobiologii [22].

W zależności od wymaganego poziomu detekcji, mogą one służyć docelowo hybrydyzacji z regionem konserwatywnym, charakterystycznym dla rodzaju lub regionem zmiennym, unikalnym dla poszczególnych gatunków [2]. Pomimo że oligonukleotydowe sondy 16S i 23S rRNA, komplementarne do zmiennych regionów, są szeroko stosowane w identyfikacji gatunkowej, to mogą być przyczyną pewnych trudności w różnicowaniu blisko spokrewnionych gatunków o dużym podobieństwie sekwencji rRNA. W takich przypadkach lepiej może się sprawdzać hybrydyzacja DNA/DNA [12]. Zaletą hybrydyzacji z cząsteczkami rRNA jest ich dużo większa ilość w komórce w porównaniu do specyficznych sekwencji DNA, co niewątpliwie wpływa na efektywność i wiarygodność zastosowanej metody [14]. Niezależnie od rodzaju sondowanej cząsteczki rRNA, detekcja szukanej hybrydy w zasadzie opiera się na dwóch kierunkach hybrydyzacji. Pierwszym jest hybrydyzacja dot-blot, drugim hybrydyzacja *in situ*, czyli we właściwym położeniu w spójnych komórkach [2]. Dot-blot, jako technika *ex situ*, polega na ekstrakcji i immobilizacji całego RNA komórek, po czym następuje jego hybrydyzacja i ocena ilości docelowego rRNA. Ponieważ zawartość komórkowego rRNA zależy od fizjologicznej aktywności komórek, bezpośrednie przełożenie jego ilości na liczbę komórek nie jest możliwe [2, 19]. Podejście typu *in situ*, zakładające hybrydyzację w morfologicznie nienaruszonych komórkach, np. fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* – FISH (*fluorescence in situ hybridization*) umożliwia bezpośrednią ocenę liczby komórek w populacji [4]. Zasada FISH polega na hybrydyzacji sekwencji rRNA komórek sondą oligonukleotydową, sprzężoną kowalencyjnie z barwnikiem fluorescencyjnym, najczęściej przy końcu 5' (rys. 1) [26]. Wśród czynników determinujących jej czułość należy wymienić: ilość docelowych cząsteczek rRNA, długość sondy, rodzaj znacznika fluorescencyjnego [19]. W dużym stopniu na czułość tej metody można wpłynąć poprzez dobór znacznika, zwracając uwagę na intensywność fluorescencji i fotostabilność. Powszechnie używane fluorochromy do znakowania sond to: fluoresceina, Texas red (pochodna sulforodaminy 101, *sulforhodamine 101 acid chloride*), rodamina, cyjanina 3 – Cy3 (*cyanine 3*) i cyjanina 5 – Cy5. Zastosowanie Cy3 zapewnia lepszą rozdzielczość i stabilność niż Cy5, Cy5 lepszą niż fluoresceina [35]. Potencjał techniki FISH w szacowaniu fizjologicznej aktywności komórek bakteryjnych zależy od szybkości dekompozycji rRNA po śmierci komórek, na którą wpływ ma poziom enzymów katalizujących rozpad RNA – RNaz oraz stopień permeabilizacji błon cytoplazmatycznych [19, 26, 30]. Krótszy półokres rozpadu, jaki cechuje rRNA w porównaniu z DNA, uzasadnia aplikację tej techniki w kierunku oceny fizjologicznej aktywności komórek. Zakres zastosowania tej techniki może być w ten sposób rozszerzony ponad precyzyjną

identyfikację gatunkową [19]. Rozwijanie techniki FISH ujawnia jej nowe możliwości, np. opracowanie procedur fluorescencyjnego znakowania mRNA czy pre-rRNA, co pozwala na oszacowanie komórek aktywnych w oparciu o ekspresję genów. Poszukiwanie nowych kierunków zastosowania sond oligonukleotydowych warunkuje selektywny rozwój metod hybrydyzacji w wykrywaniu drobnoustrojów z różnych środowisk [18].

6. Zalety i ograniczenia metod fluorescencyjnego barwienia komórek

Metody barwienia fluorescencyjnego komórek znalazły szerokie zastosowanie w badaniach mikrobiologicznych. W literaturze odnajdujemy różne kierunki aplikacyjne tych metod w badaniach środowiskowych, badaniach żywności, badaniach oporności na czynniki stresowe (Tab. II). Większość badaczy podkreśla, że zaletami metod fluorescencyjnego barwienia komórek są: detekcja pojedynczych komórek, analiza wielu parametrów w tym samym czasie, wysoka dokładność, brak konieczności izolacji DNA czy amplifikacji, szybkość wykonania oznaczenia. Mikroskopia fluorescencyjna i cytometria przepływowa są metodami określającymi liczebność komórek bezpośrednio w preparacie mikroskopowym lub w badanej próbce. Pośrednia analiza ilościowa opiera się na metodach hodowlanych, które wymagają doboru odpowiednich pożywek i warunków inkubacji. Wynik tego rodzaju analizy uzależniony jest od zdolności wzrostu komórek bakteryjnych w warunkach *in vitro*. Ograniczeniem dla metod klasycznych są zatem bakterie niedające się hodować *in vitro*, trudne lub bardzo kosztowne w hodowli. Stosowanie bezpośrednich metod barwienia fluorescencyjnego wyklucza etap hodowli bakterii. Niektóre metody barwienia fluorescencyjnego pozwoliły na ujawnienie tych, które nie dają się hodować na podłożach agarowych (pochodzą głównie ze środowisk ubogich np. woda, gleba). Pod względem przeżywania komórek w różnych środowiskach, metody fluorescencyjnego barwienia pozwalają wyróżnić grupy o różnych stanach fizjologicznych. S u n n y - R o b e r t s i wsp. [36, 37] zbadali oporność szczepów *Lactobacillus rhamnosus* na stres osmotyczny. Użyli do tego celu cytometrii przepływowej z barwieniem CFDA/PI, które to połączenie pozwoliło na wyróżnienie czterech grup komórek w populacji: komórek nieaktywnych, po lizie błon cytoplazmatycznych (CF⁻/PI⁺), komórek aktywnych z uszkodzeniami w błonach cytoplazmatycznych (CF⁺/PI⁺), komórek nieaktywnych lub po wypompowaniu barwnika z komórek i o spójnych błonach cytoplazmatycznych (CF⁻/PI⁻), komórek aktywnych i o spójnych błonach (CF⁺/PI⁻) (rys. 4). Wśród tych komórek część straciła zdolność wzrostu na podłożach, inaczej „hodowalność” (*culturability*) w środowisku

Tabela II

Przykłady zastosowań metod barwienia fluorescencyjnego komórek w badaniach mikrobiologicznych

Metoda	Badane drobnoustroje	Celowość badań	Źródło
EFM + FITC, TRITC-ConA, DAPI	Próbki biofilmu: drobnoustroje kłaczków osadu czynnego, <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 17514	Poznanie i porównanie struktury i składu EPS biofilmów poprzez barwienie różnych składników: białka, węglowodany, DNA komórek	[28]
FCM + CFDA/PI	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> VTTE-97800/ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC 53103)	Oporność pałeczek fermentacji mlekowej na stres osmotyczny	[36, 37]
FCM + CFDA, kalceina AM/PI	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Przydatność cytometrii przepływowej w ocenie przeżywalności patogenów roślin	[11]
EFM + FISH	<i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp./ <i>Enterococcus</i> , <i>Bacteroides</i> spp., <i>Clostridium histolyticum</i> , <i>Escherichia coli</i>	Przeżywalność poszczególnych drobnoustrojów w mleku dla niemowląt	[7]
EFM + FISH	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Pediococcus</i> spp., <i>Oenococcus</i> spp.	Identyfikacja i analiza ilościowa drobnoustrojów występujących w winie	[4]
EFM + FISH	Eubakterie	Ocena różnorodności drobnoustrojów w różnych warstwach sera	[15]
EFM + FISH	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Ocena specyficzności sond oligonukleotydowych oraz wykrywanie <i>L. plantarum</i> w oliwkach	[15]
EFM + Rh123/PI	<i>Pasteurella piscicida</i>	Badania przeżywalności patogena ryb w wodzie morskiej	[23]
FCM + CFDA/PI/DiBAC ₄ (3)	<i>Bifidobacterium lactis</i> DSM 10140, <i>Bifidobacterium adolescentis</i> DSM 20083	Badania przeżywalności bakterii probiotycznych w solach żółci	[1]
FCM + CFDA/PI/TOTO-1	<i>Lactococcus</i> sp., <i>Streptococcus</i> sp., <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Enterococcus</i> sp., <i>Pediococcus</i> sp.	Badania przeżywalności bakterii fermentacji mlekowej w solach żółci i niskim pH	[9]
EFM + SYTO9/PI	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> C62, <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> C75, <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> C83	Badanie rozwoju i przeżywalności paciorkowców mlekowych w mleku	[38]
EFM + DAPI/CTC	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> VTT E-96726, <i>Pseudomonas fragi</i> VTT E-84200	Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej dezynfektantów wobec pałeczek <i>Pseudomonas</i> w biofilmie	[39]

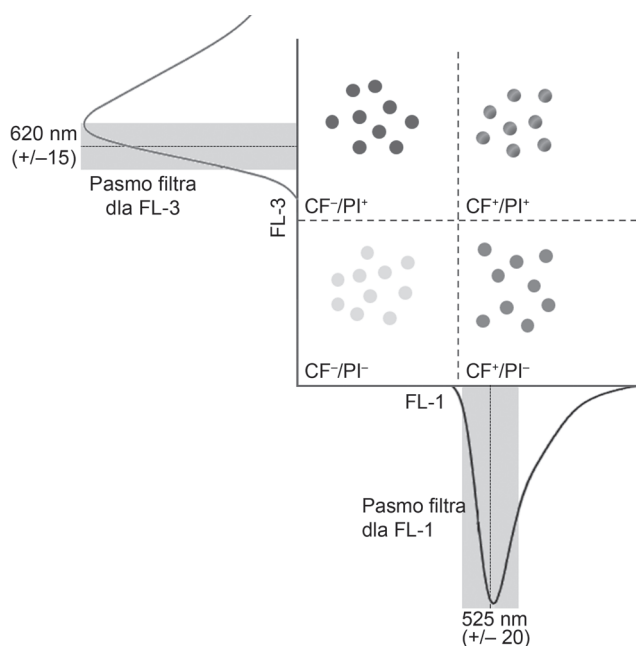
EFM – mikroskopia epifluorescencyjna
 FCM – cytometria przepływowa
 FITC – izotiocyanian fluoresceiny
 TRITC-ConA – izotiocyanian tetrametylorodaminy
 znakowany konkanawalina A
 DAPI – 4,6-diamidino-2-fenyloindol
 CFDA – dwuocian karboksylfluoresceiny
 PI – jodek propidyny
 kalceina AM – ester acetylo metylowy kalceiny

FISH – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*
 Rh123 – rodamina
 DiBAC₄(3) – bis(1,3-kwas dibutylobarbiturowy) trimetylo oxonol
 TOTO-1 – propidyny tetra-1-(4,4,7,7-tetrametylo-4,7-diazandekametyleno)-bis-4-[3-metylo-2,3dihydro (benzo-1,3-oksazolo)-2-metylidem]-1-(3 trimetyloamonowy propylu) jodek
 SYTO9 – barwnik nukleinowy SYTO*9
 CTC – chlorek 5-cyjano-2,3-ditolylo tetrazoliowy

o znacznie zwiększonej osmolarności. Na tej podstawie wyróżnić można komórki w stanie VBNC (*viable but nonculturable*), czyli żywe, ale niezdolne do wzrostu na podłożach hodowlanych [26]. W zależności od drobnoustroju, czynnikiem wywołującym przechodzenie w stan VBNC może być np. nieodpowiednia kwasowość i osmolarność środowiska, obniżenie lub podwyższenie temperatury, niedobór składników pokarmowych [18]. Przechodzenie w postać VBNC może być efektem niewielkich zmian określonych warunków na mniej korzystne, wobec czego zbadanie tego zjawiska wśród bakterii w różnych warunkach środowiskowych wymaga doboru odpowiednich narzędzi. Przedstawione metody barwienia fluorescencyjnego komórek wpasowują się

w ten rodzaj badań, gdyż przy ich pomocy można określić obecność i udział komórek niehodowlanych i odróżnić je od komórek martwych.

Porównując fluorescencyjne metody analizy, mikroskopową i cytometryczną, analizy mikroskopowe umożliwiają określenie ograniczonej liczby komórek, a także są bardziej czasochłonne. Pod tym względem badania cytometryczne wykazują pewną przewagę nad badaniami z użyciem mikroskopii. Z uwagi na aspekt pełniejszej automatyzacji i w rezultacie szybkość otrzymania wyników, cytometria przepływowa pozwala na analizę większej liczby komórek w krótszym czasie. Możliwy jest podział analizowanych populacji na subpopulacje, co sprawia, że ten instrument jest bardziej przydatny



Rys. 4. FL-1/FL-3 plot (na podstawie założeń przedstawionych w pracy Sunny-Roberts i wsp. [35])

w badaniach heterogennej populacji bakterii. Metody fluorescencyjnego barwienia komórek stosowane są powszechnie w analizach prób środowiskowych, np. wody morskiej, których łatwość przygotowania do barwienia fluorescencyjnego wpływa na jego skuteczność i wiarygodność otrzymanych wyników [18]. Należy zwrócić szczególną uwagę na etap wyodrębniania komórek z bardziej złożonych matryc, np. żywności, który wymaga efektywności jak i minimalizacji stopnia uszkodzenia komórek [19]. Odpowiednie przygotowanie próbek, w niektórych przypadkach uwzględnienie etapu utrwalania próbek, gwarantuje otrzymanie cennego narzędzia oceny żywotności różnych drobnoustrojów. Liczne metody barwienia mają coraz większe znaczenie w przemyśle rolno-spożywczym. Metody barwienia mogą być stosowane do kontroli procesów fermentacyjnych, detekcji zanieczyszczeń żywności, oceny skuteczności środków dezynfekcyjnych i wpływu antybiotyków na fizjologię komórek bakterii pochodzących z żywności. Jednak przy ogromnym zróżnicowaniu składu chemicznego środowisk, możliwość interakcji między barwnym znacznikiem a składnikami matrycy może stać się ograniczeniem dla zastosowania omawianych metod. Ma u k o n e n i i wsp. [24] zgłosili trudności z barwieniem komórek bakteryjnych w niemlecznym napoju probiotycznym z użyciem barwnika ChemChrome. Wniosek odnośnie przyczyny takich trudności był związany z rodzajem matrycy, w jakiej znajdowały się komórki, gdyż nie obserwowano już tego problemu po dodaniu tego samego szczepu do innego produktu. Ponieważ ChemChrome, jako pochodna fluoresceiny, może sprawiać trudności z barwieniem komórek ze względu na jego wypompowywanie z wnętrza komórki,

można przypuszczać, że środowisko tego określonego produktu mogło wzmacniać ten proces. Zauważyć warto, że analiza mikrobiologiczna z użyciem barwników ChemChrome oraz zestawu BacLight® pozostałych siedmiu produktów probiotycznych okazała się skuteczna i wiarygodna. Oznaczono również z jej pomocą udział komórek VBNC i wynioskowano, że przechodzenie w ten stan jest zależne od rodzaju produktu, w jakim znajdują się komórki szczepów probiotycznych. Zaobserwowano, że produkty zawierające związki fenolowe znacznie wpływają na wywoływanie tego stanu wśród badanych szczepów. Na tej podstawie można stwierdzić, że metody fluorescencyjnego barwienia komórek to przydatne narzędzie w badaniach stanu fizjologicznego bakterii. Odpowiednie dobranie barwników oraz opracowanie procedury barwienia dostarczyć może interesujących wyników badań i rozszerzać zakres ich stosowania o nowe kierunki.

7. Podsumowanie

Pomimo, że wyniki uzyskane z wystandaryzowanych metod są często wystarczające, to nie można pominąć faktu, że są nieautomatyzowane i czas oczekiwania na wynik jest długi. W powyższej pracy dokonano przeglądu metod fluorescencyjnego barwienia komórek bakterii, które stanowią atrakcyjną alternatywę dla metod klasycznych, nie tylko z uwagi na aspekt automatyzacji i szybkości wykonania. Metody te opierają się na zastosowaniu różnych markerów stanu fizjologicznego bakterii, w istocie pozwalających na zbadanie większości parametrów aktywności i spójności struktur komórkowych. Przedstawiono najbardziej rozpowszechnione barwniki fluorescencyjne, które można nazwać markerami żywotności komórek, wynikające z ich stosowania korzyści, a także ograniczenia. Wspólnym odniesieniem do wszystkich markerów jest fluorescencja poszukiwanego elementu wewnątrzkomórkowego, a element, jaki ma zostać wykryty determinuje wybór tego właściwego. Zatem odpowiedni dobór znacznika może dostarczyć precyzyjnych danych na temat fizjologii mikroflory różnych środowisk. Metody te są wobec tego odpowiedzią na rosnące wymagania z zakresu analityki mikrobiologicznej.

Piśmiennictwo

1. Ben Amor K., Breeuwer P., Verbaarschot P., Rombouts F.M., Akkermans A.D.L., De Vos W.M., Abee T.: Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured, and dead *Bifidobacterium* cells during bile salt stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5209–5216 (2002)
2. Ben Amor K., Vaughan E.E., de Vos W.M.: Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria. *J. Nutr.* **137**, 741S–747S (2007)

3. Biggerstaff J., Le Puil M., Weidow B., Prater J., Glass K., Rado-sevich M., White D.: New methodology for viability testing in environmental samples. *Mol. Cell. Probes*, **20**, 141–146 (2006)
4. Blasco L., Ferrer S., Pardo I.: Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for *in situ* identification of wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **225**, 115–123 (2003)
5. Breeuwand P., Abee T.: Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *Int. J. Food Microbiol.* **55**, 193–200 (2000)
6. Brehm-Stecher B.F., Johnson E.A.: Single-cell microbiology: tools, technologies, and applications. *Microbiol. Molecular Biol. Rev.* **68**, 538–559 (2004)
7. Brück W.M., Graverholt G., Gibson G.R.: Use of batch culture and a two-stage continuous culture system to study the effect of supplemental K-lactalbumin and glycomacropeptide on mixed populations of human gut bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **41**, 231–237 (2002)
8. Bunthof C., Abee T.: Development of a flow cytometric method to analyze subpopulations of bacteria in probiotic products and dairy starters. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2934–2942 (2002)
9. Bunthof C., Bloemen K., Breeuwer P., Rombouts F., Abee T.: Flow cytometric assessment of viability of Lactic Acid Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2326–2335 (2001)
10. Bunthof C., Braak S., Breeuwer P., Rombouts F., Abee T.: Rapid fluorescence assessment of the viability of stressed *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3681–3689 (1999)
11. Chitarra L.G., Breeuwer P., Abee T., Bulk R.W.: The use of fluorescent probes to assess viability of the plant pathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by flow cytometry. *Fitopatol. Bras.* **31**, 349–356 (2006)
12. Coeuret V., Dubernet S., Bernardeau M., Gueguen M., Vernoux J.P.: Isolation, characterization and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Lait*, **83**, 269–306 (2003)
13. Czajkowska D., Witkowska-Gwiazdowska A.: Postęp w analizach mikrobiologicznych żywności. *Przem. Spoż.* **3**, 16–18 (1997)
14. De Vries, M.C., Vaughan, E.E., Kleerebezem, M., de Vos, W.M.: Optimising single cell activity assessment of *Lactobacillus plantarum* by fluorescent *in situ* hybridisation as affected by growth. *J. Microbiol. Met.* **59**, 109–115 (2004)
15. Ercolini D., Hill P.J., Dodd C.E.R.: Development of a fluorescence *in situ* hybridization method for cheese using a 16S rRNA probe. *J. Microbiol. Met.* **52**, 267–271 (2003)
16. Ercolini D., Villani F., Aponte M., Mauriello G.: Fluorescence *in situ* hybridization detection of *Lactobacillus plantarum* group on olives to be used in natural fermentations. *Int. J. Food Microb.* **112**, 291–296 (2006)
17. Hiraoka Y., Kimbara K.: Rapid assessment of the physiological status of the polychlorinated biphenyl degrader *Comamonas testosteroni* TK102 by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2031–2035 (2002)
18. Joux F., Lebaron P.: Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes and Infection*, **2**, 1523–1535 (2000)
19. Lahtinen S., Gueimonde M., Ouwehand A., Reinikainen J., Salminen S.: Comparison of methods to enumerate probiotic bifidobacteria in a fermented food product. *Food Microbiol.* **23**, 571–577 (2006)
20. Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J.: Molecular Cell Biology. 4th edition. W.H. Freeman, New York, USA, 2000
21. Łaniewska-Trokenheim Ł., Olszewska M., Mikš-Krajnik M., Zadernowska A.: Patterns of survival and volatile metabolites of selected *Lactobacillus* strains in long-term incubation in milk. *J. Microbiol.* **48**, 445–451 (2010)
22. Mackiewicz P., Zakrzewska-Czerwińska J., Cebrat S.: Genomika – dziedzina wiedzy XXI wieku. *Biotechnologia*, **3**, 7–21 (2005)
23. Magariños B., Romalde J.L., Cid A., Toranzo A.E.: Viability of starved *Pasteurella piscicida* in seawater monitored by flow cytometry and the effect of antibiotics on its resuscitation. *Lett. Appl. Microbiol.* **24**, 122–126 (1997)
24. Maukonen J., Alakomi H.-L., Nohynek L., Hallamaa K., Lep-pämäki S., Mättö J., Saarela M.: Suitability of the fluorescent techniques for the enumeration of probiotic bacteria in commercial non-dairy drinks and in pharmaceutical products. *Food Res. Int.* **39**, 22–32 (2006)
25. Meyer P., Dworkin J.: Applications of fluorescence microscopy to single bacterial cells. *Res. Microbiol.* **158**, 187–194 (2007)
26. Mikš M., Warmińska-Radyko I.: Wybrane techniki fluorescencyjne w badaniach stanu fizjologicznego i przeżywalności komórek bakteryjnych w żywności. *Medycyna Wet.* **64**, 623–628 (2008)
27. Molenaar D., Bolhuis H., Abee T., Poolman B., Konings W.N.: The efflux of a fluorescent probe is catalyzed by an ATP-driven extrusion system in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **174**, 3118–3124 (1992)
28. Nosyk O., Haseborg E., Metzger U., Frimmel F.H.: A standardized pre-treatment method of biofilm flocs for fluorescence microscopic characterization. *J. Microbiol. Met.* **75**, 449–456 (2008)
29. Oliver J.D.: The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* **43**, 93–100 (2005)
30. Olszewska M., Łaniewska-Trokenheim Ł.: Badania stanu „niehodowalności” komórek bakterii fermentacji mlekowej w niesprzyjających warunkach rozwoju. *Medycyna Wet.* **67**, 105–109 (2011)
31. Papadimitriou K., Pratsinis H., Nebe-Von-Caron G., Kletsas D., Tsakalidou E.: Rapid assessment of the physiological status of *Streptococcus macedonicus* by flow cytometry and fluorescence probes. *Int. J. Food Microbiol.* **111**, 197–205 (2006)
32. Rahman M.: Introduction to Flow Cytometry. Serotec Ltd, Oxford, UK, 2006
33. Rault A., Beal C., Ghorbal S., Ogier J.-C., Bouix M.: Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage. *Cryobiology*, **55**, 35–43 (2007)
34. Rault A., Bouix M., Béal C.: Fermentation pH influences the physiological-state dynamics of *Lactobacillus bulgaricus* CFL1 during pH-controlled culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 4374–4381 (2009)
35. Skowrońska A., Zmysłowska I.: Współczesne metody identyfikacji bakterii stosowane w ekologii mikroorganizmów wodnych – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH). *Post. Mikrobiol.* **45**, 183–193 (2006)
36. Sunny-Roberts E.O., Ananta E., Knorr D.: Flow cytometry assessment of *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) response to non-electrolytes stress. *Nut. Food Sci.* **37**, 184–200 (2007)
37. Sunny-Roberts E.O., Knorr D.: Evaluation of the response of *Lactobacillus rhamnosus* VTT E-97800 to sucrose-induced osmotic stress. *Food Microbiol.* **25**, 183–189 (2008)
38. Warmińska-Radyko I., Olszewska M., Mikš-Krajnik M.: Effect of temperature and sodium chloride on the growth and metabolism of *Lactococcus* strains in long-term incubation of milk. *Milchwissenschaft*, **65**, 32–35 (2010)
39. Wirtanen G., Salo S., Helander I.M., Mattila-Sandholm T.: Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm. *Colloids Surf. B* **20**, 37–50 (2001)
40. Zaręba T.: Rozwój diagnostyki mikrobiologicznej. *Laboratorium*, **7–8**, 28–32 (2011)

Piotr Jadczyk^{1*}, Barbara Kołwzan¹

Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska, Politechnika Wrocławska,
ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław

Wpłynęło w maju 2012 r.

1. Wstęp. 2. Ekstrakcja zanieczyszczeń genotoksycznych. 2.1. Techniki ekstrakcji. 2.2. Rozpuszczalniki organiczne. 2.3. Woda jako rozpuszczalnik. 2.4. Warunki ekstrakcji. 3. Szczepy *Salmonella* Typhimurium stosowane do oceny aktywności mutagennej zanieczyszczeń gleby. 4. Stężenie frakcji mikrosomalnej S-9 i metodyka jej aktywacji. 5. Preinkubacja. 6. Podsumowanie

The application of the Ames test to the evaluation of the mutagenic activity of soil's pollutants

Abstract: The Ames test is universally used for examining the mutagenic activity of contaminated soil samples. Soil pollution is mostly extracted with the use of an ultrasonic bath or Soxhlet's apparatus. Dichloromethane and methanol are commonly applied solvents for the extraction of soil pollutants. Methanol was the most effective solvent. A mixture or the sequence of solvents was also applied for the extraction. Less effective was the extraction of soil pollutants in the form of water leakage. There is no sufficient literature data for determining optimal conditions of the extraction. Variants of the biotest technique applied by different authors demonstrated the significant diversity. The organisms tested the most often were strains of *Salmonella* Typhimurium TA 98 and TA 100. Its different sensitivity on extracts genotoxicity suggests the predominance of soil pollutants causing the mutation of the reading phase, which could be detected only by *Salmonella* Typhimurium TA 98, whereas mutations of the substitution of base pairs, are detected with the use of *Salmonella* Typhimurium TA 100. For activating promutagens a microsomal fraction S-9, obtained from the liver of rat, has most often been applied in different concentrations, which is activated by Aroclor 1254. Some authors applied a preincubation when performing Ames test for the genotoxicity evaluation of soil pollutants. Papers concerning the influence of the preincubation on the mutagenic effect in Ames test are rarely found. Collected literature data show the significant usefulness of the Ames test for the evaluation of mutagenic activity of soil pollutants. The comparison of the results obtained by different authors prevents the diversification of extraction techniques, solvents application and some aspects of biotest: test strains, the concentration and the preparation of the microsomal fraction S-9, the possibility of applying the preincubation. Unification of the extraction technique and the biotest, taking into consideration soil diversity and pollutants types would facilitate the comparison of the results.

1. Introduction. 2. The extraction of genotoxic pollutants. 2.1. Methods of the extraction. 2.2. Organic solvents. 2.3. The water as the solvent. 2.4. Extraction's conditions. 3. *Salmonella* Typhimurium strains used to evaluation of the mutagenic activity of soil's pollutants. 4. S-9 microsomal fraction's concentration and its activation's methods. 5. Preincubation. 6. Conclusion

Słowa kluczowe: biotest, ekstrakcja zanieczyszczeń, genotoksyczność, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* test, zanieczyszczenia gleby
Key words: biotest, pollutants extraction, genotoxicity, *Salmonella* Typhimurium, soil pollutants

1. Wstęp

Szereg zanieczyszczeń gleby wykazuje aktywność mutagenną i kancerogenną. Do takich zanieczyszczeń należą wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) oraz ich pochodne chlorowe i nitrowe, a także metale ciężkie. Pochodzenie tych zanieczyszczeń w glebie jest różne. Część z nich (m.in. WWA i ich nitropochodne) trafia do gleby w wyniku depozycji zanieczyszczeń atmosfery [16]. Są one emitowane jako produkty spalania paliw. Do zanieczyszczenia gleby nitropochodnymi WWA dochodzi też na terenach wojskowych, przemysłowych i górniczych, ponieważ są one używane jako materiały wybuchowe [7, 19, 25]. Chlorowane węglowodory aromatyczne są stosowane w rolnictwie jako pestycydy, część z nich trafia do gleby podczas opryskiwania upraw [9, 38]. Polichlorowane bifenyle

znajdowały zastosowanie jako m.in. płyny hydrauliczne, płyny izolująco-chłodzące w transformatorach oraz plastyfikatory. Są one bardzo trwałymi zanieczyszczeniami przedostającymi się do gleb w wyniku niedbałego ich składowania oraz jako odpady poprodukcyjne [52]. Zanieczyszczenie gleby produktami naftowymi, wśród których są także WWA i ich liczne pochodne następuje na skutek wycieku paliw podczas awarii rurociągów, cystern, wokół stacji benzynowych itp. [10, 49]. Aktywność mutagenna wykazują też niektóre z metali ciężkich zanieczyszczających glebę. Źródłem tych zanieczyszczeń jest różnorodna aktywność przemysłowa człowieka [38], są one uwalniane przez hutnictwo [52], a jako zanieczyszczenia paliw są także emitowane podczas procesów spalania.

Mutageny zanieczyszczające glebę stanowią poważne zagrożenie zdrowotne. Ulegają one biokumulacji

* Autor korespondencyjny: Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska, Politechnika Wrocławska, ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław; piotr.jadczyk@pwr.wroc.pl

w tkankach roślin uprawnych oraz karmionych nimi zwierząt gospodarskich. Prowadzi to do skażenia żywności spożywanej przez ludzi. Część tych zanieczyszczeń migruje do wód podskórnych [30] i powierzchniowych, które są ujmowane na potrzeby ludzi, także do picia.

Dlatego też konieczne jest monitorowanie skażenia gleb przez zanieczyszczenia wykazujące aktywność mutagenną i kancerogenną. Najczęściej stosuje się do tego metody fizyko-chemiczne (GC-MS, HPLC). Ze względu na koszt analiz możliwe jest oznaczanie jedynie wybranych zanieczyszczeń wskaźnikowych, takich jak np. WWA z listy EPA. Wyniki analiz fizyko-chemicznych pozwalają tylko na przybliżoną ocenę zagrożenia zdrowotnego, jakie stwarzają mutageny zanieczyszczające gleby. Mogą one w zespołach działać addytywnie, synergistycznie albo antagonistycznie. Część z nich w środowisku glebowym oraz po wnikięciu do organizmu ludzkiego ulega przemianom biochemicznym powodujących zwiększenie albo zmniejszenie aktywności mutagennej. Na pełną ocenę genotoksyczności wszystkich mutagenów zanieczyszczających badaną glebę pozwala jedynie zastosowanie biotestów. W badaniach nad mutagenezą środowiskową najpowszechniej stosowany jest test Ames [21, 41]. Charakteryzuje go stosunkowo znaczna wrażliwość na działanie mutagenów środowiskowych oraz znaczna zdolność prognozowania ich kancerogenności [21].

Organizmami testowymi w teście Ames są bakterie *Salmonella* Typhimurium, które w wyniku celowej mutacji zostały pozbawione zdolności syntezy histydyny. W konsekwencji nie mogą one rosnąć na podłożu mikrobiologicznym pozbawionym tego aminokwasu. Test polega na hodowli bakterii na podłożu niemal zupełnie pozbawionym histydyny w obecności badanej próbki, np. ekstraktu glebowego. Wzrost bakterii oznacza, że uległy one mutacji powrotnej, polegającej na naprawie wady genetycznej, jaką jest niezdolność do wytwarzania histydyny. Zastosowanie w teście frakcji enzymatycznej uzyskiwanej najczęściej z wątroby szczurów pozwala zasymulować w teście bakteryjnym warunki biochemiczne panujące w organizmie kręgowca, jakim jest człowiek [34, 41].

Piśmiennictwo na temat genotoksyczności zanieczyszczeń gleby jest obszerna. Przedstawia ona wyniki badania wielu próbek gleb zebranych w różnych częściach świata. Brakuje natomiast prac przeglądowych. Dotychczasowy stan wiedzy na temat genotoksyczności gleb został dotychczas podsumowany najpierw przez Watanabe i Hirayama [57], a następnie przez White i Claxton [60]. Watanabe i Hirayama [57] ogólnikowo wymienili najpowszechniej stosowane metody ekstrakcji zanieczyszczeń mutagennych z gleb zwracając uwagę, że do biotestów wprowadzane są glebowe wyciągi wodne oraz ekstrakty organiczne, a dokładniej przeanalizowali zastosowanie biotestów do badania

genotoksyczności gleb. Autorzy ci dokonali podziału gleb zawierających zanieczyszczenia genotoksyczne na gleby: przemysłowe, rolnicze i komunikacyjne. Praca White i Claxtona [60] jest znacznie bardziej obszerna, podkreślono w niej powszechność zastosowania testu Ames w badaniach nad genotoksycznością gleb. Autorzy w oparciu o analizę statystyczną wyników badania genotoksyczności zanieczyszczeń wyekstrahowanych z 1633 próbek gleby określili zależność efektu mutagennego od rozpuszczalnika użytego do ekstrakcji, zastosowanego szczepu *Salmonella* Typhimurium, zawartości w glebie WWA, pochodzenia zanieczyszczeń (gleby miejskie, przemysłowe i rolnicze), aktywacji metabolicznej oraz zróżnicowanie powszechności zastosowania różnych wariantów metodyki. Autorzy tej pracy nie podjęli natomiast szeregu innych ważnych zagadnień, jak: metodyka ekstrakcji (technika, czas i temperatura), stężenie frakcji S9 oraz związek użyty do jej aktywacji.

Celem prezentowanej pracy jest podsumowanie aktualnego stanu wiedzy na temat badania genotoksyczności gleb testem Ames ze szczególnym uwzględnieniem techniki ekstrakcji, czasu jej trwania i temperatury w jakiej jest ona prowadzona oraz użytego rozpuszczalnika, możliwości badawczych jakie daje zastosowanie jako organizmów testowych różnych szczepów *Salmonella* Typhimurium, stężenia frakcji mikrosomalnej S9 oraz metodyki jej aktywacji. Większość prac będących podstawą prezentowanego opracowania nie była cytowana w pracy White i Claxton [60].

2. Ekstrakcja zanieczyszczeń genotoksycznych

2.1. Techniki ekstrakcji

Zanieczyszczające glebę związki mutagenne muszą być z niej wyekstrahowane przed wprowadzeniem do testu Ames oraz analizą chemiczną. Ekstrakcja ta polega najczęściej na wypłukaniu zanieczyszczeń organicznych za pomocą rozpuszczalników. Autorzy poszczególnych prac stosowali jednak różne techniki ekstrakcji i różne rozpuszczalniki.

Najpowszechniej stosowane były ekstrakcja na zimno w łaźni ultradźwiękowej oraz ekstrakcja w aparatach Soxhleta, rzadziej inne techniki (tab. I). Mieszanie i wytrząsanie było stosowane do otrzymywania wyciągów wodnych zanieczyszczeń gleby [11–13, 44]. Niektórzy autorzy powtarzali ekstrakcję takim samym rozpuszczalnikiem [12, 16, 58]. Inną modyfikacją była sekwencja dwóch różnych technik ekstrakcji, np. poprzedzenie ekstrakcji w łaźni ultradźwiękowej wytrząsaniem gleby z rozpuszczalnikiem [7]. W piśmiennictwie nie ma informacji na temat skuteczności poszczególnych technik ekstrakcji.

Tabela I
Techniki stosowane do ekstrakcji zanieczyszczeń mutagennych gleby

Technika ekstrakcji	Liczba prac	Piśmiennictwo
W aparatach Soxhleta	12	[4, 10, 22, 23, 26–29, 37, 49, 58, 59]
Ekstrakcja na zimno w łaźni ultradźwiękowej	8	[12, 33, 36, 34, 38, 48, 50, 56]
Ekstrakcja przyspieszona	3	[12–15]
Wyrząsanie	3	[11, 12, 44]
Mieszanie	2	[9, 13]
Zalewanie gleby rozpuszczalnikiem i odparowywanie jej w podciśnieniu	1	[16]

2.2. Rozpuszczalniki organiczne

Do ekstrahowania zanieczyszczeń gleby w celu oceny ich aktywności mutagennej stosowane były różne rozpuszczalniki. Większość autorów stosowała ekstrakcję jednym rozpuszczalnikiem (tab. II), niektórzy stosowali ich mieszaninę (tab. III) lub sekwencję kolejnych rozpuszczalników (tab. IV). Na etapie planowania eksperymentu istotne znaczenie ma fakt, że badanie genotoksyczności ekstraktów tych samych próbek gleby, otrzymanych za pomocą różnych rozpuszczalników znacznie zwiększa pracochłonność i materiałochłonność badań, w niewielkim stopniu zwiększa natomiast prawdopodobieństwo wykrycia genotoksyczności poszczególnych próbek [22]. Najczęściej stosowanymi rozpuszczalnikami były dichlorometan i metanol. W h i t e

Tabela II
Rozpuszczalniki stosowane do ekstrakcji zanieczyszczeń mutagennych gleby

Rozpuszczalnik	Liczba prac	Piśmiennictwo
Dichlorometan	16	[6, 9, 10, 12, 13, 15, 22, 23, 5, 26–28, 29, 32, 37, 50]
Metanol	13	[1, 3, 10, 11, 13, 15, 16, 22, 25, 26, 28, 56, 58]
Aceton	6	[1, 3, 15, 16, 25, 56]
Acetonitryl	6	[1, 3, 11, 16, 25, 40]
Heksan	6	[3, 11, 22, 26–28]
Eter dietylowy	4	[26, 28, 30]
Cykloheksan	2	[11, 37]
Chloroform	1	[3]
Etanol	1	[11]
DMSO	1	[30]
Woda	7	[6, 7, 11, 13, 25, 30, 44]
Kwas octowy 1 M	1	[12]
Wodorotlenek sodu 1 M	1	[12]

Tabela III
Mieszaniny rozpuszczalników stosowane do ekstrakcji zanieczyszczeń gleby

Mieszanina rozpuszczalników	Piśmiennictwo
Benzen + etanol (3:1)	[36]
Dichlorometan + heksan (1:1)	[6]
Aceton + heksan	Googgleman i Spitzauer 1982 [za 25]
Dichlorometan + metanol (2,3:1)	[4]
Heksan + aceton (2:1)	[16]
Aceton + toluen + metanol (1:1:1)	[16]
DMSO + etanol (1:1)	[7]
dichlorometan + aceton	[11]
eter dietylowy + heksan (1:1)	[22, 26, 28]

Tabela IV
Sekwencje rozpuszczalników i ich mieszanin stosowane do ekstrakcji zanieczyszczeń gleby

Sekwencja rozpuszczalników i ich mieszanin	Piśmiennictwo
Cykloheksan, aceton	[38]
Aceton, heksan, dichlorometan, toluen, dietylketon	[59]
Heksan, aceton, dichlorometan	
Dichlorometan, aceton, toluen+dietylketon (2:1), heksan	
Aceton+dichlorometan (1:1), toluen+dietylketon (2:1)	
Aceton+dichlorometan (1:1), toluen+dietylketon (2:1)	

i C l a x t o n [60] na podstawie analizy wyników badania genotoksyczności 1633 próbek gleby opisanych w literaturze stwierdzili, że ponad 50% z nich było ekstrahowanych metanolem, 24% mieszaniną heksanu i acetonu, 14% dichlorometanem, a 11% innymi rozpuszczalnikami. Powszechność zastosowania tych samych rozpuszczalników ułatwia porównywanie wyników, nie powinna ona jednak być jedynym kryterium ich doboru.

Prac poświęconych porównaniu skuteczności ekstrakcji zanieczyszczeń mutagennych gleby jest niewiele. Większość z nich omawia wyniki badania aktywności mutagennej nielicznych próbek gleby. Prac, w których porównano skuteczność ekstrakcji zanieczyszczeń mutagennych różnymi rozpuszczalnikami co najmniej 10 próbek gleby jest zaledwie kilka [13, 15, 38]. Uzyskane dotychczas wyniki wskazują, że metanol ekstrahował zanieczyszczenia mutagenne na ogół nieznacznie skuteczniej od dichlorometanu. Tak było w przypadku 70% z 18 [13] oraz połowy z 21 badanych próbek gleby [15]. Na wysoką skuteczność metanolu wskazują także prace innych autorów oparte na wynikach badania mutagenności pojedynczych gleby [1, 3, 4]. Nie zawsze jednak

tak było. Courty i wsp. [11] na podstawie wyników badania mutagenności 4 próbek gleby ekstrahowanych 8 różnymi rozpuszczalnikami, w tym metanolem uznali dichlorometan, aceton i acetonitryl za rozpuszczalniki najskuteczniej ekstrahujące zanieczyszczenia mutagenne z gleb. W niektórych przypadkach skuteczniejsze od metanolu czy dichlorometanu okazały się inne rozpuszczalniki: acetonitryl [16] i eter dietylowy [30]. Były to jednak wyniki badania pojedynczych próbek gleby. Monarca i wsp. [38] stwierdzili, że acetonem ekstrahuje się dwukrotnie większą masę zanieczyszczeń niż cykloheksanem (średnia dla 10 próbek gleby), jednak nie porównywali oni aktywności mutagennej obydwóch ekstraktów. White i Claxton [60] na podstawie danych literaturowych porównali metodami statystycznymi genotoksyczność wobec *Salmonella Typhimurium* próbek gleby ekstrahowanych metanolem, dichlorometanem i mieszaniną heksan/aceton stwierdzając, że skuteczność ekstrakcji zależała nie tylko od użytego rozpuszczalnika, ale i od rodzaju zanieczyszczeń obecnych w glebie (gleby przemysłowe, miejskie i rolnicze). Nie było zatem możliwe wskazanie jednego – uniwersalnego rozpuszczalnika, który byłby najbardziej skuteczny do ekstrakcji wszystkich próbek gleb. Zebrane dane literaturowe wskazują, że w pierwszej kolejności należy brać pod uwagę metanol i dichlorometan.

Efekt ekstrakcji zanieczyszczeń mutagennych z gleby może być też zależny od rodzaju gleby. Zróżnicowanie skuteczności ekstrakcji zanieczyszczeń mutagennych różnymi rozpuszczalnikami z pojedynczych próbek w zależności od rodzaju gleby analizowali jedynie Kool i wsp. [30]. Ekstrakcja eterem dietylowym była najskuteczniejsza w przypadku gleby ogrodowej, torfistej i bielcowej), natomiast w przypadku gleby piaszczystej nie było jednego ekstraktu, który wykazywałby największą aktywność mutagenną wobec różnych szczepów *Salmonella* z aktywacją metaboliczną i bez niej.

2.3. Woda jako rozpuszczalnik

Część zanieczyszczeń gleby stanowią związki nieorganiczne, m. in. sole metali ciężkich. Są one rozpuszczalne w wodzie. Dlatego też niektórzy autorzy badali aktywność mutagenną tej grupy zanieczyszczeń ekstrahując je z gleby w postaci odcieków wodnych (tab. II). Zastosowanie wody jako rozpuszczalnika, pozwala na ocenę możliwości migracji zanieczyszczeń mutagennych gleby wraz z wodami gruntowymi oraz na określenie wpływu pH wód gruntowych i opadowych na aktywność mutagenów zanieczyszczających gleby. Największą aktywność mutagenną wykazywał ekstrakt wodny zanieczyszczeń gleby o odczynie obojętnym [30]. Była ona większa od aktywności mutagennej zanieczyszczeń ekstrahowanych DMSO. Aktywność mutagenna roztworów wodnych o odczynie kwaśnym i zasadowym była

natomiast znikoma. Wyniki tych badań wskazywały na niebezpieczeństwo przenikania mutagenów zanieczyszczających gleby do wód ujmowanych na potrzeby gospodarstw domowych ludzi, w tym także do picia. Niewielką aktywność mutagenną zanieczyszczeń gleby rozpuszczalnych w wodzie o pH = 2 stwierdzili też Knize i wsp. [25], zanieczyszczenia tej samej gleby rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych były znacznie bardziej aktywne mutagennie. Zanieczyszczenia gleby ekstrahowane wodą wykazywały mniejszą aktywność mutagenną od zanieczyszczeń tej samej gleby ekstrahowanych metanolem, a w 2 z 3 próbek także dichlorometanem [13]. W niektórych przypadkach odcieki wodne z gleb przed wprowadzeniem do testu Amesa były zagęszczane na żywicach, a następnie wymywane z nich rozpuszczalnikami organicznymi [17, 51].

2.4. Warunki ekstrakcji

Autorzy poszczególnych prac stosują nie tylko różne techniki ekstrakcji i różne rozpuszczalniki oraz ich mieszaniny i sekwencje, ale i różne parametry ekstrakcji. Zróżnicowanie tych parametrów obejmuje: czas ekstrakcji, temperaturę w jakiej jest prowadzona, prędkość wytrząsania.

Courty i wsp. [11] dokonali przeglądu literaturowego proporcji pomiędzy masą gleby a objętością rozpuszczalnika. Zróżnicowanie tych proporcji wynosiło od 1:1 do 1:10. Aktywność mutagenna zanieczyszczeń gleby ekstrahowanych przy proporcji gleby i rozpuszczalnika 1:10 była większa niż przy proporcji 1:1 w przypadku 3 z 4 próbek gleby badanych przez ten zespół autorów. Dane te pozwalają na stwierdzenie, że użycie większej ilości rozpuszczalnika pozwala na zwiększenie wydajności ekstrakcji. Nie są one jednak wystarczające do określenia optymalnych proporcji pomiędzy masą gleby i objętością rozpuszczalnika. Dalsze badania w tym kierunku powinny uwzględniać zróżnicowanie technik ekstrakcji, stosowanych rozpuszczalników oraz zróżnicowanie właściwości różnych typów genetycznych gleb, a także rodzaje obecnych w nich zanieczyszczeń.

Czasy ekstrakcji stosowane w różnych laboratoriach wykazywały znaczne różnicowanie: od 10 min. do 18 godzin przy ekstrakcji ultradźwiękami [7, 32, 33, 38, 48, 56, 58], 6–24 godzin przy ekstrakcji w aparatach Soxhleta [4, 6, 10, 22, 27, 29, 37, 49], od 30 min. do 24 godzin w przypadku mieszania i wytrząsania [11–13, 44]. Ekstrakcja w aparatach Soxhleta była zatem najbardziej czasochłonną metodą. Niewiele jest natomiast danych na temat zależności pomiędzy czasem ekstrakcji, a jej skutecznością. Ekstrakty 3 z 4 próbek gleby badanych przez Courty i wsp. [11] wykazywały większą aktywność mutagenną wobec szczepu *Salmonella Typhimurium* TA 98 gdy czas ekstrakcji wynosił 24 a nie 4 godziny. Pozwala to wnioskować, że wydłuża-

nie czasu ekstrakcji zwiększa jej skuteczność. Dane te są jednak niewystarczające do określenia optymalnego czasu ekstrakcji, to znaczy gwarantującego wysoką skuteczność bez zbędnego wydłużania ekstrakcji. Dalsze badania mające na celu optymalizację czasu ekstrakcji powinny być prowadzone w sposób uwzględniający różnicowanie stosowanych technik ekstrakcji, rozpuszczalników, różnorodność typów genetycznych gleb oraz ich zanieczyszczeń.

Dane piśmiennictwa nie dają podstaw do określenia optymalnej temperatury ekstrakcji. W przypadku ekstrakcji ultradźwiękami, poprzez wytrząsanie albo mieszanie proces ten może być prowadzony w temperaturze pokojowej. 3 z 4 próbek gleby badanych przez C o u r t y i wsp. [11] wykazywały większą aktywność mutagenną gdy ekstrakcję prowadzono w temperaturze 37°C (takiej samej jak badanie genotoksyczności testem Ames) niż w temperaturze pokojowej. W przypadku zastosowania aparatów Soxhleta temperatura ekstrakcji jest zależna od temperatury wrzenia zastosowanego rozpuszczalnika (ponad 37°C). Nie zawsze też, ekstrakcja dichlormetanem o stosunkowo niskiej temperaturze wrzenia (40,2°C) dawała najlepsze rezultaty, w przypadku wielu gleb był to metanol (temperatura wrzenia 64,5°). Przy doborze rozpuszczalnika należy jednak pamiętać, że nadmierne ogrzewanie może spowodować rozkład najmniej trwałych mutagenów.

Wpływ na skuteczność ekstrakcji może mieć także prędkość wytrząsania i mieszania. Autorzy dostępnych prac stosowali różne prędkości, np. 120 obrotów na minutę [44]. Nie ma natomiast danych literaturowych, które pozwoliłyby określić graniczną prędkość wytrząsania i mieszania, której zwiększanie nie powodowałoby już przy danym czasie ekstrakcji zwiększania skuteczności tego procesu. Niektórzy autorzy podkreślają, że ekstrakcję prowadzono bez dostępu światła [11]. Jest to istotne, ze względu na możliwość fotochemicznego rozkładu niektórych WWA.

Do wypracowania metodyki ekstrakcji zanieczyszczeń mutagennych gleby, która zostałaby powszechnie zaakceptowana konieczne są dalsze badania. Powinny one obejmować przede wszystkim poszukiwania najbardziej skutecznego rozpuszczalnika, czy też mieszaniny albo sekwencji rozpuszczalników. Warunkiem porównywalności wyników uzyskiwanych w różnych laboratoriach jest też ujednolicenie metody ekstrakcji oraz czasu jej trwania. Rozstrzygnięcia wymaga też kwestia, czy możliwe jest opracowanie uniwersalnej metodyki ekstrakcji zanieczyszczeń gleby, czy także konieczne jest jej zróżnicowanie w zależności od rodzaju gleby oraz przeważającej w próbce grupy zanieczyszczeń. C o u r t y i wsp. [11] zaproponowali następującą kolejność badań mających na celu określenie optymalnej dla danej partii próbek gleb metodyki ekstrakcji oraz badania genotoksyczności:

1. identyfikacja bardziej wrażliwego szczepu (TA 98 i TA 100),
2. identyfikacja najbardziej skutecznego rozpuszczalnika,
3. optymalizacja warunków ekstrakcji: temperatury, czasu i proporcji między glebą a rozpuszczalnikiem.

3. Szczepy *Salmonella typhimurium* stosowane do oceny aktywności mutagennej zanieczyszczeń gleby

W badaniach nad mutagenną aktywnością zanieczyszczeń gleby testem Amesa najpowszechniej stosowane są szczepy TA 98 i TA 100 (tab. V). Szczep TA 98 użyty został przez autorów wszystkich dostępnych prac, szczep TA 100 przez większość nich. Inne szczepy były sporadycznie stosowane do oceny właściwości mutagennych zanieczyszczeń gleby. Powszechność zastosowania szczepów TA 98 i TA 100 w oparciu o zebrane dane literaturowe stwierdzili też White i Claxton [60].

Tabela V

Zastosowanie szczepów *Salmonella Typhimurium* do badania aktywności mutagennej zanieczyszczeń gleby testem Ames

Szczep	Liczba prac	Piśmiennictwo
TA 98	33	[1, 4, 6, 9–16, 22, 23, 25–33, 36–40, 44, 49, 50, 56, 58, 59]
TA 100	22	[1, 6, 7, 9–12, 16, 23, 25, 29–31, 36–38, 44, 49, 50, 56, 58, 59]
YG 1041	4	[26, 27, 29, 50]
YG 1042	3	[26, 29, 50]
TA 97a	3	[1, 12, 31]
TA 102	2	[1, 50]
TA 104	2	[1, 50]
TA 98NR	2	[25, 59]
TA 98/1,8–DNP6	1	[25]
TA 100NR	1	[25]
YG 1021	1	[59]
YG 1024	1	[59]
YG 1026	1	[59]
YG 1029	1	[59]
TA 97	1	[50]

Wyniki większości autorów stosujących szczepy TA 98 i TA 100 do oceny aktywności mutagennej zanieczyszczeń gleby wskazują na większą wrażliwość szczepu TA 98 [1, 7, 9, 11, 16, 23, 25, 26, 29, 30, 37, 38, 56]. Na większą wrażliwość szczepu TA 98 niż TA 100 wskazywały także wyniki analizy danych literaturowych dokonanej przez White i Claxton [60]. Pozwala to wnioskować, że wśród zanieczyszczeń gleby przeważają mutageny powodujące powstawanie mutacji zmiany fazy odczytu, na wykrywanie których pozwala szczep TA 98, nie zaś mutageny powodujące powstawanie

mutacji typu zmiany par zasad na wykrywanie których pozwala szczep TA 100. Zdarzały się jednak przypadki odwrotne [6, 49]. Dlatego też zasadne jest stosowanie w początkowej fazie badań obydwóch szczepów. Pozwala to na wybór bardziej wrażliwego z nich. Rozwiązanie takie zastosowali z powodzeniem M c D a n i e l s i wsp. [37] oraz C o u r t y i wsp. [11].

Szczepy TA 97, TA 97a, TA 102, TA 104 były sporadycznie stosowane do badania aktywności mutagennej zanieczyszczeń gleby (tab. IV). Ponadto były one albo w ogóle nie wrażliwe na działanie mutagenów zanieczyszczających badane gleby, albo wykazywały wrażliwość mniejszą od szczepów TA 98 i TA 100 [1]. Także M o r t e l m a n s i Z e i g e r [41] na podstawie analizy wyników wielu badań aktywności mutagennej różnych mutagenów prowadzonych w różnych laboratoriach na przestrzeni wielu lat zalecają stosowanie szczepów TA 97, TA 102 i TA 104 do potwierdzania wyników ujemnych testów wstępnych z zastosowaniem szczepów TA 98 i TA 100. Szczep TA 97 pozwala na wykrywanie mutacji typu zmiany fazy odczytu, podobnie jak szczep TA 98, szczepy TA 102 i TA 104 umożliwiają wykrywanie mutacji typu podstawiania par zasad.

Niektóre ze szczepów stosowanych w teście Amesa posiadają modyfikacje genetyczne, które predysponują je do wykazywania udziału wybranych grup związków chemicznych w ogólnej mutagenności badanej próbki o charakterze mieszaniny wieloskładnikowej. Charakter taki mają ekstrakty zanieczyszczeń gleby. Modyfikacje genetyczne omawianych szczepów polegają na pozbawieniu ich wrażliwości na mutagenne działanie niektórych grup mutagenów, albo zwiększeniem tej wrażliwości. Należą do nich szczepy *Salmonella* Typhimurium TA 98NR, TA 100NR pozbawione zdolności wytwarzania nitroreduktazy [46, 47] oraz szczep TA 98/1,8-DNP₆ pozbawiony zdolności wytwarzania nitroreduktazy specyficznej wobec nitropirenów [45]. Szczepy te są pozbawione wrażliwości na mutagenne działanie nitrowych pochodnych WWA. Szczepy *Salmonella* Typhimurium YG 1021, YG 1024 mają wprowadzone plazmidy zawierające kopię genu odpowiedzialnego za syntezę nitroreduktazy, szczepy YG 1026 i YG 1029 mają wprowadzone plazmidy zawierające kopię genu odpowiedzialnego za syntezę O-acetylotransferazy. Szczepy YG 1041 i YG 1042 wykazują podwyższoną aktywność nitroreduktazową i O-acetylotransferazową. Szczepy o zwiększonej aktywności nitroreduktazowej są szczególnie wrażliwe na mutagenne działanie nitropochodnych WWA, szczepy o zwiększonej aktywności O-acetylotransferazowej są szczególnie wrażliwe na mutagenne działanie nitrowych i aminowych pochodnych WWA [18, 20, 53–55]. Przypadki zastosowania szczepów o zmienionej aktywności nitroreduktazowej i O-acetyloaminotransferazowej są jak na razie nieliczne i wskazują na znaczący udział nitrowych

i aminowych pochodnych WWA wśród ogółu mutacji powodowanych przez zanieczyszczenia gleby (tab. 5).

Wyniki dotychczasowych badań prowadzonych różnych laboratoriach pozwalają rekomendować szczepy TA 98 i TA 100 do badania aktywności mutagennej zanieczyszczeń gleby. Ich pochodne o zmienionej aktywności nitroreduktazowej i O-acetylotransferazowej pozwalają na określenie udziału nitrowych i aminowych pochodnych WWA. Szczepy o zwiększonej aktywności nitroreduktazowej umożliwiają wykrycie aktywności mutagennej badanych prób, nawet wtedy, gdy w próbie nie ma innych mutagenów. Szczepy pozbawione aktywności nitroreduktazowej dadzą wówczas wynik ujemny, podobnie jak szczepy macierzyste. Zastosowanie szczepów o zwiększonej aktywności nitroreduktazowej powinno, zatem mieć pierwszeństwo przed zastosowaniem szczepów aktywności tej pozbawionych.

4. Stężenie frakcji mikrosomalnej S-9 i metodyka jej aktywacji

Do aktywacji promutagenów stosowana jest w teście Amesa frakcja mikrosomalna [34, 41]. Najczęściej używa się ją z wątroby szczurów, czasem jednak stosowana jest frakcja uzyskana z wątroby ssaków innych gatunków. W poszczególnych laboratoriach stosuje się różne stężenia frakcji mikrosomalnej S-9 oraz różne jej aktywatory. Brakuje natomiast prac porównujących skuteczność aktywacji promutagenów wyekstrahowanych z gleby przez frakcję mikrosomalną S-9 w zależności od jej stężenia i związku użytego do aktywacji jej enzymów. Wielu autorów pomija w opisie metodyki informacje o przygotowaniu frakcji mikrosomalnej oraz o jej stężeniu we frakcji S-9 mix.

W badaniach nad aktywnością mutagenną zanieczyszczeń gleby najczęściej stosowana jest frakcja mikrosomalna wypreparowana z wątroby szczurów [1, 6, 9, 12–16, 25, 28–30, 37, 44, 49, 50, 56, 58], rzadziej z wątroby chomików [39].

Do aktywacji enzymów tej frakcji najczęściej stosowany był Aroclor 1254 [1, 6, 9, 11–16, 23, 25, 26, 29, 30, 37, 44], ewentualnie Aroclor 1248 [59]. Część autorów zamiast wysoce toksycznego, rakotwórczego i trwałego Arocloru stosuje fenobarbital sodu [49] albo fenobarbital z naftoflawonem [16, 56, 58, 59] wg metodyki opisanej przez O n g a i wsp. [43]. W e s p i wsp. [59] stwierdzili jednak w badaniach wstępnych, że frakcja mikrosomalna aktywowana Aroclorem 1248 wykazuje większą aktywność wobec promutagenów zanieczyszczających glebę niż frakcja aktywowana fenobarbitalem z naftoflawonem i w badaniach zasadniczych zastosowali frakcję aktywowaną Aroclorem 1248. M o r e l l i i wsp. [39, 40] do aktywacji enzymów wątroby chomika zastosowali 3-metylocholanren.

Do aktywacji promutagenów będących zanieczyszczeniami gleby w różnych laboratoriach stosowana jest frakcja S-9 mix o różnej zawartości frakcji S-9 uzyskiwanej bezpośrednio z wątroby: 4% [13, 37], 7,5% [30], 10% [11, 13, 23, 27, 28, 56, 58], 30% [9, 13, 14, 15]. K n i z e i wsp. [25] zastosowali frakcję S-9 mix w ilości odpowiadającej 2 mg białka na płytkę, N i e l s e n i wsp. [42] 1 mg białka na płytkę. Jedynie D o n e l l y i wsp. [13] Porównywali skuteczność aktywacji metabolicznej promutagenów będących zanieczyszczeniami gleby przez frakcje S-9 mix różniące się zawartością czystej frakcji S-9. Mutagenność małych dawek badanych prób najbardziej podnosiła frakcja 4%, dużych 10%, frakcja 30% wykazywała działanie toksyczne.

M a r o n i A m e s [34] zalecają stosowanie frakcji 4%, a w przypadku uzyskania wyniku ujemnego frakcji o stężeniu 10%. Za optymalne uważają oni zastosowanie obydwóch stężeń frakcji w jednym eksperymencie, zwracają jednak uwagę, że rozwiązanie takie podnosi jego koszty. M o r t e l m a n s i Z e i g e r [41] w oparciu o analizę wyników uzyskanych w różnych laboratoriach przez autorów 95 publikacji stwierdzają, że w teście Amesa stosowana jest frakcja o stężeniu 4–30%. Przy doborze jej optymalnego dla danego rodzaju próbek w niektórych laboratoriach zaczyna się od stężeń niskich, a w innych od stężeń dużych. Autorzy ci zalecają dobór stężenia frakcji w zakresie 5–30% zaczynając od stężeń dużych. Wyniki dotychczasowych badań nad zróżnicowaniem skuteczności aktywacji metabolicznej zanieczyszczeń gleby przez różne stężenia frakcji S-9 w S-9 mix wskazują na toksyczność stężeń wysokich [13]. Przemawia to za zastosowaniem w eksperymencie wstępnym niewielkich stężeń frakcji i zwiększaniem ich w kolejnych eksperymentach w przypadku uzyskania wyników ujemnych. Rozwiązanie takie z punktu widzenia praktyki laboratoryjnej ma szereg zalet. Umożliwia wykrycie aktywności mutagennej niewielkiej dawki mutagenów, a co za tym idzie większa wrażliwość testu. Pozwala to też ograniczyć wielkość próbki niezbędnej do badań, a w konsekwencji ilość rozpuszczalników zużytych do jej ekstrakcji. Ograniczenie zużycia frakcji ma nie tylko wymiar finansowy, ale i etyczny, pozwala bowiem zminimalizować liczbę zwierząt niezbędnych do jej uzyskania oraz zużycie wysoce niebezpiecznych odczynników, takich jak Aroclor.

Aroclor 1254 jest najpowszechniej stosowanym i najbardziej uniwersalnym induktorem enzymów mikrosomalnych [34, 41]. Przemawia to za stosowaniem go do aktywacji mieszaniny wieloskładnikowej, jaką jest ekstrakt zanieczyszczeń gleby. Pozostałe związki stosowane do aktywacji enzymów mikrosomalnych mogą wykazywać większą skuteczność aktywowaniu niektórych związków. Fenobarbital skuteczniej aktywuje aminy aromatyczne, jest jednak nieefektywny w aktywowaniu niektórych węglowodorów aromatycznych [2]. Sku-

teczną alternatywą dla Arocloru okazała się natomiast mieszanina fenobarbitalu i β -naftoflawonu [35, 43]. Znalezienie takiej alternatywy jest ważne ze względu na zagrożenie jakie wyjątkowo trwałe i wysoce rakotwórcze Aroclor stanowi dla pracowników laboratorium oraz dla środowiska oraz ze względu na trudności w precyzyjnym dozowaniu cieczy o znacznej lepkości [34].

Do aktywowania mutagenów pośrednich w teście Amesa wykorzystywana jest frakcja mikrosomalna uzyskiwana z wątroby, rzadziej nerek albo płuc. Płuca są jednak trudne do homogenizacji ze względu na ich gąbczastą strukturę, są także mniej sterylne niż wątroba. Ponadto frakcja uzyskana z wątroby wykazuje największą aktywność enzymów odpowiedzialnych za aktywację promutagenów. Organy, z których otrzymuje się frakcję mikrosomalną najczęściej pozyskuje się ze szczurów, a także z chomików, świnek morskich, myszy oraz ludzi [34, 41]. M a r o n i A m e s [34] zalecają generalnie stosowanie w teście Amesa frakcji mikrosomalnej uzyskanej z wątroby szczurów, zwracają jednak uwagę, że w niektórych przypadkach frakcja uzyskana z wątroby chomików może skuteczniej aktywować promutageny. Dzieje się tak w przypadku np. nitrozoamin [5].

Dalsze badania nad aktywacją promutagenów zanieczyszczających gleby powinny pozwolić na ostateczne zastąpienie Arocloru innymi aktywatorami enzymów oraz określić standardowe stężenie frakcji mikrosomalnej. Standardowa procedura powinna określać także gatunek ssaka oraz jego organ, z którego pochodziłyby enzymy używane w teście do aktywacji promutagenów. Wyjaśnienia wymaga też kwestia, czy możliwe jest stworzenie procedury uniwersalnej, która będzie mogła być stosowana do badania wszystkich próbek gleby, czy też konieczne jest jej zróżnicowanie w zależności od przeważającej w danej glebie grupy zanieczyszczeń. Wyniki badań dotychczasowych pozwalają rekomendować tymczasowo zastosowanie frakcji uzyskanej z wątroby szczurów ze względu na powszechność jej stosowania.

5. Preinkubacja

Oryginalna procedura testu Amesa przewiduje możliwość zastosowania preinkubacji w celu przedłużenia czasu kontaktu bakterii testowych z badaną próbką. Niektórzy autorzy stosowali ten wariant testu do badania genotoksyczności zanieczyszczeń gleby [12, 44]. Nie ma jednak prac, których autorzy porównaliby efekt mutageny powodowany przez zanieczyszczenia wyekstrahowane z gleby w teście bez i z preinkubacją.

6. Podsumowanie

Test Amesa jest powszechnie stosowany do badania aktywności mutagennej prób środowiskowych, w tym zanieczyszczeń gleb. Zanieczyszczenia te przed

wprowadzeniem do testu muszą być wyekstrahowane z gleby. Najczęściej w tym celu stosowana jest ekstrakcja na zimno w łaźni ultradźwiękowej oraz ekstrakcja w aparatach Soxhleta. W piśmiennictwie nie ma informacji na temat zróżnicowanie skuteczności różnych technik ekstrakcji. Rozpuszczalnikami najpowszechniej stosowanymi do ekstrakowania zanieczyszczeń gleb są dichlorometan i metanol. Powszechność zastosowania tych samych rozpuszczalników ułatwia porównywanie wyników, nie powinna być jednak kryterium ich doboru. Często najskuteczniejsza była ekstrakcja metanolem. Niektórzy autorzy do ekstrakcji zanieczyszczeń gleb stosowali mieszaninę albo sekwencję rozpuszczalników. Skuteczność ekstrakcji różnymi rozpuszczalnikami wykazywała zróżnicowanie w zależności od rodzaju gleby oraz składu jej zanieczyszczeń. Mało skuteczna była ekstrakcja zanieczyszczeń gleb w postaci odcieków wodnych. Na ogół wykazywały one niewielką genotoksyczność w teście Amesa. Zróżnicowanie technik ekstrakcji oraz stosowanych w niej rozpuszczalników powoduje, że istniejące obecnie dane literaturowe są niewystarczające do określenia optymalnych warunków ekstrakcji (czasu, temperatury, proporcji między glebą a rozpuszczalnikiem).

Znaczne zróżnicowanie wykazywały także liczne warianty techniki samego biotestu stosowane przez autorów poszczególnych prac. Organizmami testowymi najczęściej były szczepy *Salmonella* Typhimurium TA 98 i TA 100. Zróżnicowanie ich wrażliwości na genotoksyczne działanie ekstraktów większości gleb wskazywało, że w glebach obecne są głównie zanieczyszczenia powodujące powstawanie mutacji zmiany fazy odczytu, na wykrywanie których pozwala szczep *Salmonella typhimurium* TA 98, nie zaś mutacje podstawiania par zasad, na wykrywanie których pozwala szczep *Salmonella typhimurium* TA 100. Do aktywowania promutagenów najczęściej stosowana była w różnych stężeniach frakcja mikrosomalna S-9 otrzymana z wątroby szczurów, aktywowana Aroclorem 1254. Niektórzy autorzy stosowali do oceny genotoksyczności zanieczyszczeń gleb wariant testu Amesa z preinkubacją. Nie ma jednak prac, których autorzy określiliby wpływ preinkubacji na wielkość efektu mutagennego w teście Amesa.

Zebrane dane z piśmiennictwa wskazują na znaczną przydatność testu Amesa do oceny aktywności mutagennej zanieczyszczeń gleb. Porównywanie wyników otrzymywanych przez różnych autorów utrudnia zróżnicowanie technik ekstrakcji, stosowanych w niej rozpuszczalników oraz niektórych aspektów samego biotestu: dobór szczepów testowych, stężenie i sposób przygotowania frakcji mikrosomalnej S-9 stosowanej do aktywowania obecnych w próbkach promutagenów oraz celowości stosowania preinkubacji. Pozwoli to na ujednolicenie techniki ekstrakcji i biotestu z uwzględnieniem zróżnicowania rodzajów gleb oraz obecnych w nich zanieczyszczeń.

Piśmiennictwo

1. Aleem A., Malik A.: Genotoxic hazards of long-term application of wastewater on agricultural soil. *Mutat. Res.* **538**, 145–154 (2003)
2. Ames B.N., Durston W.E., Yamasaki E. Lee F.D.: Carcinogens are mutagens, a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 2281–2285 (1973)
3. Ansari M., Malik A.: Genotoxicity of agricultural soils in the vicinity of industrial area. *Mutat. Res.* **673**, (2009)
4. Barbee G.C., Brown K.W., Thomas J.C., Donnelly K.C., Murray H.E.: Mutagenic activity (Ames Test) of Wood-Preserving waste Sludge applied to Soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **57**, 54–62 (1996)
5. Bartch H., Malaveille C., Montesano R.: In vitro metabolism and microsome mediated mutagenicity of dialkylnitrosoamines in rat, hamster and mouse tissues. *Cancer Res.* **35**, 644–651 (1975)
6. Békaert C., Rast C., Ferrier V., Bispo A., Jourdain M.J., Vasseur P.: Use of in vitro (Ames and Mutatox test) and in vivo (Amphibian Micronucleus test) assays to assess the genotoxicity of leachates from a contaminated soil. *Org. Geochem.* **30**, 953–962 (1999)
7. Berthe-Corti L., Jacobi H., Kleihare S., Witte I.: Cytotoxicity and mutagenicity of a 2,4,6-trinitrotoluene (tnt) and hexogen contaminated soil in *S. typhimurium* and mammalian cells. *Chemosphere*, **37**, 209–218 (1998)
8. Bierkens J. Klein G., Corbiser P. Van Den Heuel R., Verschaeve L., Weltens R., Schoeters G.: Comparative sensitivity of 20 bioassays for soil quality. *Chemosphere*, **37**, 2935–2947 (1998)
9. Brown K.W., Donnelly K.C., Thomas J.C., Davol P., Scott B.R.: Mutagenicity of 3 agricultural soils. *Sci. Total Environ.* **41**, 173–186 (1985)
10. Cho B.-H., Chino H., Tsuji H., Unito T., Naganka K., Otsuka S., Yamashita K., Matsumoto S., Oyaizu H.: Laboratory-scale bioremediation of oil-contaminated soil of Kuwait with soil amendment materials. *Chemosphere*, **35**, 7, 1599–1611 (1997)
11. Courty B. Le Curieux F., Milon V., Marzin D.: Influence of extraction parameters on the mutagenicity of soil samples. *Mutat. Res.* **565**, 23–34 (2004)
12. da Silva Júnior F.M.R., Vaz Rocha J.A., Vargas V.M.F.: Extraction parameters in the mutagenicity assay of soil samples. *Sci. Total Environ.* **407**, 6017–6023 (2009)
13. Donnelly K.C., Brown K.W., Anderson C.S., Thomas J.C., Scot B.R.: Bacterial mutagenicity and acute toxicity of solvent and aqueous extracts of soil samples from a abandoned chemical manufacturing site. *Environ. Toxicol. Chem.* **10**, 1123–1131 (1991)
14. Donnelly K.C., Thomas J.C., Anderson C.S., Brown K.W.: The Influence of Application of Soil Amended with Municipal Sewage Sludge. *Environ. Pollut.* **68**, 147–159 (1990)
15. Donnelly K.C., Thomas J.C., Brown K.W.: Mutagenic potential of environmental samples before and after remediation of a solvent-contaminated site. *Environ. Toxicol. Chem.* **14**, 1281–1286 (1995)
16. Edenharter R., Ortseifen M., Koch M., Wesp H.F.: Soil mutagens are airborne mutagens, variation of mutagenic activities induced in *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 by organic extracts of agricultural and forest soils in dependence on location and season. *Mutat. Res.* **472**, 23–36 (2000)
17. Ehrlichmann H., Dott W., Eisentraeger A.: Assessment of Water-Extractable Genotoxic Potential of Soil Samples from Contaminated Sites. *Ecotoxicol. Environment. Safety*, **46**, 73–80 (2000)

18. Einistö P., Watanabe M., Ishidate Jr. M., Nohmi T.: Mutagenicity of 30 chemicals in *Salmonella typhimurium* strains possessing different nitroreductase or O-acetyltransferase activities. *Mutat. Res.* **259**, 95–102 (1991)
19. George S.E., Huggins-Clark G., Brooks L.R.: Use of a *Salmonella* microsusensions of munitions compounds at low concentrations. *Mutat. Res.* **490**, 45–56 (2001)
20. Hagiwara Y., Watanabe M., Oda Y., Sofuni T., Nohmi T.: 1993. Specificity and sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG 1041 and YG 1042 strains possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity. *Mutat. Res.* **291**, 171–180 (1993)
21. Indulski J. (red.): Przewodnik do testów krótkoterminowych przeznaczonych do wykrywania mutagennych i rakotwórczych substancji chemicznych. Kryteria zdrowotne środowiska, t. 51. Inst. Med. Pracy, Łódź 1993
22. Jadczyk P., Kołwzan B.: Genotoxicity of soil pollutants extracted with different solvents. *Pol. J. Environ. Stud.* (W druku)
23. Jadczyk P., Kołwzan B., Rybak J., Adamiak W.: Badania właściwości toksycznych i mutagennych gleby skażonej materiałami wybuchowymi. W, Zielińska-Psujka B., Orłowski J. [red.] Wyd. Naukowe Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego, s. 101–105, Poznań 2007
24. Jarvis A., McFarland V., Honeycutt E.: Assessment of the Effectiveness of Composting for the Reduction of Toxicity and Mutagenicity of Explosive-Contaminated. *Soil. Ecotox. Environ. Safe*, **39**, 131–135 (1998).
25. Knize M. G., Takemoto B., Lewis P. R., Felton J. S. The characterization of the mutagenic activity of soil. *Mutat. Res.* **192**, 23–30 (1987)
26. Kołwzan B., Heweyer M., Jadczyk P., Andrzejewski P., Dąbrowska A.: Ocena genotoksyczności gleb skażonych materiałami wybuchowymi. W, II Kongres Inżynierii Środowiska. Materiały. T. 2. Lublin 2005, Komitet Inżynierii Środowiska PAN, s. 533–541
27. Kołwzan B., Jadczyk P., Pawlik M., Andrzejewski P., Dąbrowska A.: Genotoksyczność gleb zanieczyszczonych. Genotoxicity of contaminated soils. W, Andrzejewski P. [red.] Zanieczyszczenie środowiska produktami naftowymi i innymi antropogennymi zanieczyszczeniami organicznymi, ich analiza, monitoring i usuwanie. Soil and groundwater contamination by oil products and other anthropogenic organic compounds, analysis, monitoring and remediation. Futura and PZITS Poznań 2005, s. 65–74
28. Kołwzan B., Jadczyk P., Pawlik M., Umińska B.: Zastosowanie testu Amesa do badania genotoksyczności gleby. W, Biotechnologia środowiskowa. VII Ogólnopolskie Sympozjum Naukowo-techn. Politechnika Śląska, s. 213–219, 2005
29. Kołwzan B., Jadczyk P., Rybak J., Adamiak W.: Genotoxicity of explosives contaminated soil before and after bioremediation. *Environ. Prot. Eng.* **34**, 53–62 (2008)
30. Kool H.J., Van Kreyll C.F., Persad S.: 1989. Mutagenic activity in groundwater in relation to mobilization of organic mutagens in soil. *Sci. Total. Envir.* **84**, 185–199 (1989)
31. Lah B., Vidic T., Glasencnic., Cepeljnik T., Gorjanc G., Marinsek-Logar R.: Genotoxicity evaluation of water soil leachates by Ames test comet assay, and preliminary *Tradescantia* micronucleus assay. *Environ. Monit. Assess.* **139**, 107–118 (2008)
32. Malachová K., Lednická D., Novotný Č.: Genotoxicity estimation in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons after biodegradation. In: Šašek V. et al. (eds.). The utilization of Bioremediation to Reduce Soil Contamination, Problems and Solutions, s. 211–215. Kluwer Acad Publ. 2003
33. Malachová K.: Using Short-Term Mutagenicity Tests for the Evaluation of genotoxicity of Contaminated Soils. *J. Soil Contam.* **8**, 667–680 (1999)
34. Maron D.M., Ames B.N.: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* **113**, 173–215 (1983)
35. Matsushima T., Sawamura M., Hara K., Sumigura T.: A safe substitute for polychlorinated biphenyls as an inducer of metabolic activation system. In, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R., Philpot R.M. (eds.). *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*. Elsevier/Noth-Holland. Amsterdam, s. 85–88, 1976
36. Matsushita H., Tamura T., Kato Y., Nishimura T.: Mutagenic activities of organic components in soil collected in Tokyo, Bangkok, Chaing Mai and Manila. *Mutat. Res.* **130**, 370 (1984)
37. McDaniels A.E., Reyes A.L., Wymer L.J., Rankin C.C., Stelma Jr.G.N.: Genotoxic Activity Detected in Soils From a Hazardous waste site by the Ames Test and an SOS Colorimetric Test. *Environ. Mol. Mutagen.* **22**, 115–122 (1993)
38. Monarca S., Feretti D., Zerbini I., Alberti A., Zani C., Resola S., Gelatti U., Nardi G.: Soil Contamination Detected Using Bacterial and Plant Mutagenicity Tests and Chemical Analyses. *Environ. Res. A*, **88**, 64–69 (2002)
39. Morelli I.S., Vecchioli G.I., Del Panno M.T., Garré M.I., Costanza O.R., Paineira M.T.: Assessment of the toxic potential of hydrocarbon containing sludges. *Environ. Pollution*, **89**, 131–135 (1995)
40. Morelli I.S., Vecchioli G.I., Del Panno M.T., Paineira M.T.: Effect of petrochemical sludge concentrations on changes in mutagenic activity during soil bioremediation process. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**, 2179–2183 (2001)
41. Mortelmans K., Zeiger E.: The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* **455**, 29–60 (2000)
42. Nielsen P.A.: Mutagenicity studies on complex environmental mixtures, selection of solvent system for extraction. *Mutat. Res.* **276**, 117–123 (1992)
43. Ong T.-M., Mukhtar M., Wolf C.R., Zeiger E.: Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* **4**, 55–65 (1980)
44. Pereira R., Marques C.R., Ferreira M.J.S., Neves M.F.J.V., Caetano A.L.: Phytotoxicity and genotoxicity of soils from an abandoned uranium mine area. *Appl. Soil Ecol.* **42**, 209–220 (2009)
45. Rosenkranz H.S., McCoy E.C., Mermelstein R., Speck W.T.: A cautionary note on the use of nitroreductase-deficient strains of *Salmonella typhimurium* for the detection of nitroarenes as mutagens in complex mixtures including diesel exhaust. *Mutat. Res.* **91**, 103–105 (1981)
46. Rosenkranz H.S., Speck W. T.: Activation of nitrofurantoin to a mutagen by rat liver nitroreductase. *Biochem. Pharmacol.* **25**, 1555–1556 (1976)
47. Rosenkranz H.S., Speck W.T.: Mutagenicity of metronidazole, Activation by mammalian liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **66**, 520–525 (1975)
48. Šašek V., Bhatt M., Cajthaml T., Malachová K., Lednická D., Metwally M., Al-Muzaini S.: Arch. Environ. Compost-mediated removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil. *Contam. Toxicol.* **44**, 336–342 (2003)
49. Sato S., Matsumura A., Urushigawa Y.: Type analysis and mutagenicity of petroleum oil extracted from sediment and soil samples in Kuwait. *Environ. Interan.* **24**, 67–76 (1998)
50. Sayles G.D., Acheson C.M., Kupferle M.J., Shan Y., Zhou Q., Meier J.R., Chang L., Brenner R.C.: Land Treatment of PAH-Contaminated Soil, Performance Measured by Chemical and Toxicity Assays. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 4310–4317 (1999)
51. Smith J.W.: Mutagenicity of extracts from agricultural soil in the *Salmonella*/microsome test. *Environ. Mutagen.* **4**, 369–370 (1982)

52. Walker C.H., Hopkin S.P., Sibly R.M., Peakall D.B.: Podstawy ekotoksykologii. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2002
53. Watanabe M., Ishidate Jr. M., Nohmi T.: A sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes, construction of nitroreductase-overproducing derivatives of *Salmonella typhimurium* strains TA 98 i TA 100. *Mutat. Res.* **216**, 211–220 (1989)
54. Watanabe M., Ishidate Jr.M., Nohmi T.: Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines, new derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated O-acetyltransferase levels. *Mutat. Res.* **234**, 337–348 (1990)
55. Watanabe M., Sofuni T., Nohmi T.: Comparison of the sensitivity of *Salmonella typhimurium* strains YG 1024 and 1012 for detecting the mutagenicity of aromatic amines and nitroarenes. *Mutat. Res.* **301**, 7–12 (1993)
56. Watanabe T., Hasei T., Takahashi Y., Otake S., Murahashi T., Takamura T., Hirayama T., Wakabayashi K.: Mutagenic activity and quantification of nitroarenes in surface soil in the Kinki region of Japan. *Mutat. Res.* **538**, 121–131 (2003)
57. Watanabe T., Hirayama T.: Genotoxicity of Soil. *J. Health. Sci.* **47**, 433–438 (2001)
58. Watanabe T., Takahashi K., Konishi E., Hoshino Y., Hasei T., Asanoma M., Hirayama T., Wakabayashi K.: Mutagenicity of surface soil from residential areas in Kyoto city, Japan, and identification of major mutagens. *Mutat. Res.* **649**, 201–212 (2008)
59. Wesp H. F. Tang X., Edenharder R.: The influence of automobile exhausts on mutagenicity of soils, contamination with, fractionation, separation, and preliminary identification of mutagens in the *Salmonella*/reversion assay and effects of solvent fractions on the sister-chromatid exchanges in human lymphocyte cultures and in the in vivo mouse bone marrow micronucleus assay. *Mutat. Res.* **472**, 1–21 (2000)
60. White P., Claxton L.D.: Mutagens in contaminated soils, a review. *Mutat. Res.* **567**, 227–345 (2004)

SPIS TREŚCI

D. Lesiak, A. Brzozowska, K. Bieńkowska-Szewczyk, A.D. Lipińska – US3 – wielofunkcyjna kinaza serynowo-treoninowa alfaherpeswirusów	329
S. Rynans, S. Walter de Walthoffen, T. Dzieciatkowski, G. Młynarczyk – Wirusowe zakażenia ośrodkowego układu nerwowego. Część I: Wirusy DNA	343
S. Rynans, S. Walter de Walthoffen, T. Dzieciatkowski, G. Młynarczyk – Wirusowe zakażenia ośrodkowego układu nerwowego. Część II: Wirusy RNA	349
M. Wiciński, P. Sopońska, B. Brzoszczyk, B. Malinowski, A. Michalska, E. Grzešek, K. Szadujkis-Szadurska, T. Kornatowski, A. Czeczuk, G. Grzegorz – Udział ludzkiego cytomegalowirusa w mechanizmach karcynogenezy glejaka wielopostaciowego	355
E. Oleńska, W. Małek – Mechanizmy oporności bakterii na metale ciężkie	363
M. Staniszevska, M. Bondaryk, W. Kurzątkowski – Rola arylamidazy leucynowej w wirulencji <i>Candida albicans</i>	373
A. Zabłotni, A. Dziadosz – Ekstremofile – mikroorganizmy z przeszłością i z przyszłością ...	381
M. Mendrycka, K. Mucha, S. Stawarz – Bioremediacja związków ropopochodnych oraz szlaki ich biodegradacji	397

PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

M. Olszewska, Ł. Łaniewska-Trokenheim – Metody fluorescencyjnego barwienia komórek w badaniach stanu fizjologicznego bakterii	409
P. Jadczyk, B. Kołwzan – Zastosowanie testu Amesa do oceny aktywności mutagennej zanie- czyszczeń gleby	419

CONTENTS

D. Lesiak, A. Brzozowska, K. Bieńkowska-Szewczyk, A.D. Lipińska – US3 – a multifunctional serine-threonine kinase of alphaherpesviruses	329
S. Rynans, S. Walter de Walthoffen, T. Dzieciatkowski, G. Młynarczyk – Viral infections of the central nervous system. Part I: DNA viruses	343
S. Rynans, S. Walter de Walthoffen, T. Dzieciatkowski, G. Młynarczyk – Viral infections of the central nervous system. Part II: RNA viruses	349
M. Wiciński, P. Sopońska, B. Brzoszczyk, B. Malinowski, A. Michalska, E. Grzešek, K. Szadujkis-Szadurska, T. Kornatowski, A. Czeczuk, G. Grzegorz – The role of human cytomegalovirus in mechanisms of glioblastoma muliforme carcinogenesis	355
E. Oleńska, W. Małek – Mechanisms of heavy metals resistance in bacteria	363
M. Staniszevska, M. Bondaryk, W. Kurzątkowski – The role of leucine arylamidase in the virulence of <i>Candida albicans</i>	373
A. Zabłotni, A. Dziadosz – Extremophiles – microorganisms with the past and the future ...	381
M. Mendrycka, K. Mucha, S. Stawarz – Bioremediation of petroleum compounds and their biodegradation pathways	397

METHODS AND STANDARDS

M. Olszewska, Ł. Łaniewska-Trokenheim – Fluorescence-based methods of cell staining in physiological state studies of bacteria	409
P. Jadczyk, B. Kołwzan – The application of the Ames test to the evaluation of the mutagenic activity of soil's pollutants	419

