

# **Wybrane zagadnienia z zakresu mikrobiologii**



# **Wybrane zagadnienia z zakresu mikrobiologii**

Redakcja:  
Alicja Danielewska  
Monika Maciąg

Lublin 2019

**Wydawnictwo Naukowe TYGIEL składa serdecznie podziękowania  
dla zespołu Recenzentów za zaangażowanie w dokonane recenzje  
oraz merytoryczne wskazówki dla Autorów.**

**Recenzentami niniejszej monografii byli:**

- prof. dr hab. n. farm. Anna Malm
- dr hab. Magdalena Krauze
- dr hab. Aneta Nowakiewicz
- dr hab. inż. Grażyna Żukowska
- dr Justyna Bohacz
- dr Bożena Futoma-Kołodziej
- dr Agnieszka Graczyk-Jarzynka
- dr Monika Jach
- dr Magdalena Karaś
- dr Aneta Kondrzycka-Dąda
- dr Agnieszka Kuźniar
- dr Monika Osińska-Jaroszuk
- dr Elżbieta Rusinek-Prystupa
- dr Dawid Stefaniuk

Wszystkie opublikowane rozdziały otrzymały pozytywne recenzje.

Skład i łamanie:  
Alicja Danielewska  
Monika Maciąg

Projekt okładki:  
Marcin Szklarczyk

© Copyright by Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o.

ISBN 978-83-65932-84-6

Wydawca:  
Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o.  
ul. Głowackiego 35/341, 20-060 Lublin  
[www.wydawnictwo-tygiel.pl](http://www.wydawnictwo-tygiel.pl)

## Spis treści

Magdalena Fordon, Beata Krawczyk

Charakterystyka oporności *Klebsiella pneumoniae* New Delhi na karbapenemy .....7

Dominik Wojdyła, Karolina Stępień, Beata Ciak, Mateusz Mołoń

Rola stresu oksydacyjnego w starzeniu się drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.....17

Karolina Stępień, Dominik Wojdyła, Mateusz Mołoń

Wykorzystanie drożdży pączkujących *Saccharomyces cerevisiae* w badaniach nad wpływem restrykcji kalorycznej na aktywność metaboliczną i starzenie komórek.....31

Magdalena Siemieniuk, Ewa Grabowska, Urszula Czyżewska, Aneta Zambrzycka, Adam Tylicki

Azole w terapii grzybic – charakterystyka i mechanizmy oporności .....39

Ewelina Wanarska

Przeciwdrobnoustrojowa terapia fotodynamiczna.....53

Agnieszka Prusek, Grażyna Janikowska, Joanna Gola, Jolanta Pudełko

Wpływ formy amfoterycyny B na jej toksyczność .....63

Marta Kozieł, Paulina Lipa, Monika Janczarek

Modyfikacje składu lipidowego bakteryjnych błon komórkowych w odpowiedzi na stres niskich temperatur .....74

Julia Dreksler, Martyna Stefaniak, Joanna Żylińska-Urban, Joanna Cieśla

Produkcja enancjomerów kwasu mlekowego przez bakterie .....89

Bożena Kowalczyk, Agata Małek, Agata Józefczak, Marta Palusińska-Szys

Diagnostyka pałeczek *Legionella* w materiale klinicznym .....105

Pola Łomża, Agnieszka Tabernacka

Zastosowanie procesów mikrobiologicznej dehalogenacji związków organicznych w inżynierii środowiska .....129

Pola Łomża, Agnieszka Tabernacka

Mikrobiologiczne procesy dehalogenacji związków organicznych .....137

Maria Kurzylewska, Katarzyna Dworaczek, Natalia Walczak, Anna Turska-Szewczuk

Czynniki wirulencji bakterii z rodzaju *Aeromonas* sp. izolowanych od ryb .....147

Agnieszka Rożek

Udział sulfidogennych zespołów mikroorganizmów w procesie powstawania żelazowych (II) faz mineralnych ..... 168

Michał Styczyński

Bioprospekcja antarktycznych psychrotolerancyjnych szczepów bakterii ..... 179

Ewa Brągoszewska

Ocena wpływu składowania i utylizacji odpadów mikrobiologicznych na jakość powietrza oraz zdrowie pracowników laboratorium mikrobiologicznego ..... 190

Indeks Autorów ..... 197

# Charakterystyka oporności *Klebsiella pneumoniae* New Delhi na karbapenemy

## 1. Wprowadzenie

Bakterie z gatunku *Klebsiella pneumoniae* to Gram-ujemne, nieurzęsione, nieruchliwe oraz względnie beztlenowe pałeczki, należące do rodziny *Enterobacteriaceae*. Ich naturalnym środowiskiem występowania są wody powierzchniowe, gleba, a także nosogardziel i przewód pokarmowy ssaków. Ze względu na przyczynianie się do powstawania między innymi zapalenia płuc, zakażenia układu moczowego, ropnia wątroby, a także bakteremii prowadzącej często do sepsy są one uznawane za niezwykle niebezpieczne patogeny oportunistyczne. *K. pneumoniae* odpowiedzialna jest za wywołanie wielu infekcji szpitalnych, szczególnie u osób z obniżoną odpornością [1, 2].

Nadużywanie przez dziesiątki lat antybiotyków wywarło wielką presję selekcyjną na te bakterie, co przyczyniło się do zwiększania się liczby coraz to nowych szczepów wielolekoopornych. Zjadliwość *K. pneumoniae*, wynikająca z obecności wielu czynników wirulencji oraz zdolności do tworzenia biofilmu dodatkowo sprzyja jej rozprzestrzenianiu się.

Bakterie *K. pneumoniae* New Delhi, posiadające gen oporności na karbapenemy (*bla<sub>NDM</sub>*) zostały po raz pierwszy wyizolowane w 2008 roku w Szwecji od pacjenta wcześniej hospitalizowanego w Indiach [3]. Mikroorganizmy te szybko rozprzestrzeniają się po całym świecie, a od 2011 roku występują również w Polsce. Stanowią one wysokie ryzyko epidemiologiczne dlatego badania mające na celu ułatwienie różnicowania genetycznego tych szczepów oraz ich charakterystykę są niezwykle istotne [4].

Celem pracy było przedstawienie informacji na temat oporności szczepów *K. pneumoniae* New Delhi na karbapenemy oraz problemu ich rozprzestrzeniania się.

## 2. Oporność *Klebsiella pneumoniae* na karbapenemy

Oporność szczepów *K. pneumoniae* New Delhi na karbapenemy wynika z obecności genu *bla<sub>NDM</sub>*, kodującego enzym metalo- $\beta$ -laktamazę New Delhi, określaną w skrócie jako NDM (ang. *New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase*). Należy on do grupy metalo- $\beta$ -laktamaz (MBL) zdolnych do hydrolizy prawie wszystkich antybiotyków  $\beta$ -laktamowych. Głównymi nosicielami genu *bla<sub>NDM</sub>* są bakterie z gatunku *K. pneumoniae* oraz *Escherichia coli*, przy czym najbardziej rozpowszechnione są pewne typy sekwencji (ST, ang. *sequence type*). Są to odpowiednio ST11, ST14, ST15 lub ST147 dla *K. pneumoniae* oraz ST167, ST410 lub ST617 w przypadku *E. coli*.

---

<sup>1</sup> magda.fordon@gmail.com, Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska.

<sup>2</sup> beata.krawczyk@pg.edu.pl, Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska.

Szczepy NDM-pozytywne zostały zidentyfikowane na całym świecie, z największą częstotliwością występowania na subkontynencie indyjskim, na Bliskim Wschodzie i na Bałkanach. Większość plazmidów niosących gen *bla<sub>NDM</sub>* posiada konkretne typy replikonów, takie jak IncX3, IncFII lub IncC [4].

### 3. Metallo-β-laktamaza New Delhi

Enzymy zwane β-laktamazami podzielone są na klasy A, B, C oraz D ze względu na różnice w ich sekwencji aminokwasowej [5, 6]. Enzymy z klasy A, C i D posiadają w miejscu aktywnym resztę seryny, natomiast enzymy klasy B zawierają w nim jeden lub dwa jony cynku, skąd pochodzi ich nazwa – metallo-β-laktamazy (MBL).

MBL są podzielone na trzy podklasy (B1, B2 i B3). Enzymy podklasy B1 i B3 posiadają dwa jony cynku w miejscu aktywnym i wykazują szeroki zakres substratów, do których należą penicyliny, cefalosporyny oraz karbapenemy. Enzymy podklasy B2 mają z kolei tylko jeden aktywny jon cynku, podczas gdy wiązanie drugiego jonu cynku hamuje ich aktywność katalityczną. Wykazują one wąski zakres substratów, obejmujący karbapenemy, ale nie penicyliny i cefalosporyny [7, 8].

Istnieje kilka MBL należących do podklasy B2, w tym CphA z *Aeromonas hydrophila*, Sfh-1 z *Serratia fonticola* oraz ImiS z *Aeromonas veronii*. Zidentyfikowano również kilka MBL należących do podklasy B3, takich jak L1 z *Stenotrophomonas maltophilia*, AIM-1 z *Pseudomonas aeruginosa* i GOB-1 z *Elizabethkingia meningoseptica*. Jednak większość zidentyfikowanych do tej pory MBL należy do podklasy B1 [9]. Trzy najczęściej występujące w izolatach klinicznych MBL, tj. IMP (imipenemaza), VIM oraz NDM należą do podklasy B1. Geny kodujące IMP, VIM i NDM są w dużej mierze zlokalizowane na plazmidach, przez co mogą być przenoszone między szczepami bakteryjnymi na drodze transferu wertykalnego i horyzontalnego. Ma to szczególne znaczenie w rozprzestrzenianiu się tego typu oporności, zwłaszcza w środowisku szpitalnym. Sekwencja aminokwasowa enzymów NDM znacznie różni się od pozostałych MBL podklasy B1 – ich zgodność wynosi zaledwie około 34%. Z tego powodu wprowadzono dalszy podział podklasy B1 na dwie pod-podklasy (B1a i B1b), w wyniku czego NDM zaklasyfikowano do pod-podklasy B1b, a pozostałe – do B1a.

Jony cynku odgrywają kluczową rolę w działaniu wszystkich NDM. Interakcja między enzymem a substratem jest możliwa dzięki związanym w miejscu aktywnym jonom cynku. Jony te aktywują również cząsteczkę wody, z której na skutek oderwania protonu powstaje aktywny jon wodorotlenkowy. Jon ten poprzez atak nukleofilowy na atom węgla grupy karbonylowej prowadzi do hydrolizy pierścienia β-laktamu [10, 11].

Warto zwrócić uwagę na lokalizację NDM w komórce, która różni się od lokalizacji wszystkich innych MBL. NDM jest lipoproteiną, która zakotwiczona jest w zewnętrznej błonie bakterii Gram-ujemnych, co umożliwia sekwencja aminokwasowa (LSGC) ulegająca lipidacji, znajdująca się w sekwencji sygnałowej NDM [12, 13]. Wszystkie inne MBL są rozpuszczalnymi białkami periplazmatycznymi. Zakotwiczenie w błonie znacznie zwiększa stabilność NDM, nawet w warunkach niedoboru cynku, który powstaje w wyniku uwalniania białka chelatującego (kalprotektyny) przez gospodarza w miejscu zakażenia. Wynikające z tego niedobory cynku mogą zakłócać działanie MBL, takich jak NDM. Zakotwiczenie ich w błonie



ułatwia także wydzielanie tego enzymu w pęcherzykach błony zewnętrznej (OMV). Pęcherzyki zawierające NDM mogą chronić sąsiednie populacje bakterii przed działaniem związków  $\beta$ -laktamowych, a mogą przenosić zarówno NDM, jak i  $bla_{NDM}$  [13-15]. Jest to przyczyną szybkiego rozprzestrzeniania się zarówno bakterii *Klebsiella pneumoniae* New Delhi, jak i plazmidów niosących gen  $bla_{NDM}$  wśród coraz większej liczby mikroorganizmów.

### 3.1. Warianty NDM

Enzymy NDM składają się z 270 aminokwasów i zawierają dwa jony cynku w miejscu aktywnym, w którym zachodzi hydroliza antybiotyków  $\beta$ -laktamowych. Drugorzędową strukturę tych enzymów tworzy 9  $\alpha$ -helis, 17  $\beta$ -kartek oraz 3  $\beta$ -zakręty.

Obecnie znane są 24 warianty enzymu NDM, które powstały w wyniku różnych substytucji w obrębie sekwencji aminokwasowej. Podstawienie M154L jest najpowszechniejsze i jest obserwowane w aż 10 z 24 różnych wariantów NDM. Warianty NDM zwykle zawierają od 1 do 5 podstawień aminokwasów w porównaniu z NDM-1. NDM-18 jest wyjątkiem, ponieważ od sekwencji NDM-1 różni się jedynie obecnością tandemowego powtórzenia 5 aminokwasów (QRFGD, w pozycjach od 44 do 48 w NDM-1). Miejsce aktywne jest silnie zakonserwowane we wszystkich wariantach NDM, na co wskazuje brak substytucji aminokwasowych w jego obrębie. Jednakże niektóre warianty różnią się między sobą aktywnością wobec  $\beta$ -laktamów. Przykładowo, warianty zawierające substytucję V88L (NDM-5, -17, -20 i -21) wykazują zwiększoną aktywność karbapenemazy [16-19]. Wartość MIC (ang. *minimal inhibitory concentration*) ertapenemu wobec szczepów produkujących NDM-5 lub NDM-20 okazała się być 4- lub 8-krotnie wyższa niż w przypadku szczepów produkujących NDM-1 [16, 18]. Wykazano również, że NDM-17 i NDM-21 mają taką samą aktywność karbapenemazy jak NDM -5 [17, 19]. Sugeruje to, że substytucje mogą mieć znaczący wpływ na aktywność enzymu, mimo że nie znajdują się w obrębie miejsca aktywnego, jednak dokładny mechanizm działania zwiększonej aktywności karbapenemazy nie jest znany. Warianty zawierające mutację V88L mają również inne podstawienia, ale nie wykazano żadnej różnicy w wartościach MIC karbapenemów między szczepami wytwarzającymi NDM-5 lub NDM-17 (warianty zawierające V88L) a szczepem produkującym NDM-1 [20]. Stwierdzono również, że substytucje M154L (NDM-4) oraz D130G (NDM-14) także powodują zwiększoną aktywność enzymatyczną. Co ciekawe NDM-8, który zawiera zarówno M154L, jak i D130G, nie wykazuje zwiększonej aktywności karbapenemazy. Warto zauważyć, że pożywki zazwyczaj używane w eksperymentach, takie jak bulion Mueller-Hinton (MH) i LB, są bogate w cynk. Jednakże, w warunkach niedoboru cynku, podstawienia M154L (NDM-4), A233V (NDM-6) oraz E152K (NDM-9) w enzymach NDM zwiększają oporność na cefotaksym poprzez poprawę ich powinowactwa do cynku (M154L) lub ogólną poprawę stabilności tych enzymów (A233V i E152K). Podstawienia D95N (NDM-3) i D130G (NDM-14) zwiększają również oporność na cefotaksym w warunkach głodu cynkowego, jednak mechanizmy nie są znane [21, 22]. Substytucje R264H (NDM-16), M154V (NDM-11) i P28A (NDM-2) nie mają znaczącego wpływu na działanie NDM w warunkach limitujących dostępność jonów cynku. Stwierdzono zatem, że stres spowodowany niedoborem cynku jest głównym czynnikiem

napędzającym ewolucję enzymów NDM [22]. Niestety, wartość MIC karbapenemów przeciwko szczepom wytwarzającym różne warianty NDM nie została określona w warunkach ograniczonego stężenia cynku. Aktywność karbapenemazy nowych wariantów NDM musi być scharakteryzowana za pomocą znormalizowanego testu w warunkach zarówno bogatych w cynk, jak i ograniczających cynk, aby w pełni wyjaśnić fenotypowe znaczenie pojawiania się i ewolucji nowych substytucji.

### 3.2. Plazmidy niosące gen *bla<sub>NDM</sub>*

Chociaż obecność genu *bla<sub>NDM</sub>* została stwierdzona na chromosomach bakteryjnych, zdecydowanie częściej występują one na plazmidach, które odgrywają istotną rolę w ich rozpowszechnianiu. Doniesiono, że *bla<sub>NDM</sub>* jest przenoszony na plazmidach z różnymi typami replikonów. Łącznie wykryto aż 355 plazmidów niosących gen *bla<sub>NDM</sub>*, których sekwencje są całkowicie poznane. Wśród rodziny *Enterobacteriaceae* występuje 20 typów replikonów plazmidów niosących *bla<sub>NDM</sub>*, w tym IncC, IncB/O/K/Z, IncFIA, IncFIB, IncFIC, IncFIII, IncHI1, IncHI2, IncHI3, IncN, IncN2, IncL/M, IncP, IncR, IncT, IncX1, IncX3, IncX4, IncY oraz ColE10 [23]. Wskazuje to na wielokrotne przejęcie genu *bla<sub>NDM</sub>* przez różne plazmidy, co oznacza, że w transferze horyzontalnym *bla<sub>NDM</sub>* pośredniczy wiele plazmidów.

IncX3 wydaje się być najczęstszym rodzajem plazmidu przenoszącego *bla<sub>NDM</sub>*. Plazmidy te charakteryzują się wąskim zakresem gospodarzy i jak dotąd były wykrywane wyłącznie w rodzinie *Enterobacteriaceae*.

## 4. Epidemiologia szczepów *Klebsiella pneumoniae* New Delhi

Po początkowym odkryciu NDM-1 w szczepie wyizolowanym od pacjenta w Szwecji wcześniej hospitalizowanego w New Delhi w 2008 roku [3], kolejne badania ujawniły powszechne występowanie *bla<sub>NDM-1</sub>* na półwyspie indyjskim, w tym w Indiach, Pakistanie i Bangladeszu [23]. Od tego czasu wykazano, że szczepy NDM-pozytywne są obecne na całym świecie, co potwierdzają wyniki badań epidemiologicznych prowadzonych przez większość krajów.

Światowy program nadzoru SMART zebrał aż 103 960 izolatów z rodziny *Enterobacteriaceae* w 55 krajach w latach 2008-2014 i wykazał, że 290 szczepów (0,28% wszystkich szczepów) było dodatnich pod względem obecności NDM, co sugeruje stosunkowo niską częstość występowania. W programie SMART częstość występowania szczepów pozytywnych pod względem NDM znacznie się różniła w poszczególnych krajach: do 5,01% w Zjednoczonych Emiratach Arabskich, 6,15% w Egipcie, 6,22% w Indiach i 6,26% w Serbii [24]. Potwierdza to obserwację, że szczepy NDM-pozytywne występują częściej w Azji Południowej, na Bałkanach, w Afryce Północnej i na Bliskim Wschodzie. Wysoki wskaźnik występowania szczepów NDM-pozytywnych na Bliskim Wschodzie najprawdopodobniej wynika z częstych migracji ludności na subkontynent indyjski. INFORM jest kolejnym międzynarodowym badaniem, w którym zebrano 38 266 izolatów z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz 8010 szczepów *P. aeruginosa* z 40 krajów w latach 2012-2014. Proporcje szczepów dodatnich pod względem NDM wynosiły 0,19% (72/38 266) u rodziny *Enterobacteriaceae* oraz 0,04% (3/8,010) u szczepów *P. aeruginosa*, co potwierdza niską częstość występowania szczepów NDM-pozytywnych, ujawnioną

w projekcie SMART. Niestety, częstość występowania szczepów NDM-dodatnich w poszczególnych krajach nie została podana w tym badaniu [25]. Poza globalnymi programami nadzoru SMART i INFORM, istnieje bardzo niewiele odpowiednio zaprojektowanych badań na dużą skalę, które miałyby na celu określenie prawdziwego rozpowszechnienia genu *bla<sub>NDM</sub>* u danego gatunku lub rodzaju bakterii. W wyniku badań przeprowadzonych w Pakistanie stwierdzono, że 18,5% hospitalizowanych pacjentów w dwóch szpitalach wojskowych jest nosicielami NDM-dodatnich szczepów z rodziny *Enterobacteriaceae* [26]. W Chinach przeprowadzono badanie 1162 klinicznych izolatów *Enterobacteriaceae* i *Acinetobacter* spp. różnego pochodzenia, które doniosły, że 3,9% z nich było NDM-pozytywne. Odsetek szczepów NDM-dodatnich wśród rodziny *Enterobacteriaceae* nie został obliczony, ponieważ dokładna liczba izolatów *Enterobacteriaceae* poddawana analizie nie została podana [27]. Aby dokładnie kontrolować zmiany w częstości występowania szczepów pozytywnych pod względem NDM niezbędne są dalsze badania na dużą skalę, w szczególności na szczepach wyizolowanych po 2014 r.

Według globalnego programu nadzoru SMART *bla<sub>NDM</sub>* jest trzecim najczęściej występującym genem kodującym karbapenemazy i stanowi 19,42% dodatnich wyników obecności karbapenemazy. Częściej występującymi genami są *bla<sub>KPC</sub>* (53,18%) oraz warianty genu *bla<sub>OXA-48</sub>* (20,09%) [24]. W Chinach, które nie zostały włączone do programu SMART, 31% z przebadanych 1105 szczepów *Enterobacteriaceae* opornych na karbapenemy było dodatnich pod względem NDM [28]. Badanie EuSCAPE w Europie ujawniło, że 7,7% opornych na karbapenemy *Klebsiella pneumoniae* oraz 10,3% szczepów *E. coli* opornych na karbapenemy było dodatnich pod względem NDM [29].

Oprócz próbek klinicznych genu *bla<sub>NDM</sub>* wykryto również w ściekach szpitalnych w kilku krajach, w tym w Chinach [30, 31], Indiach [32] i Libanie [33]. Niektóre szczepy NDM-dodatnie odzyskane ze ścieków szpitalnych należą do rodziny *Enterobacteriaceae* [32, 33], co może odzwierciedlać jelitowe przenoszenie szczepów NDM-dodatnich wśród populacji w warunkach szpitalnych. Jednakże, szczepy różnych gatunków *Acinetobacter* dodatnich pod względem obecności NDM zostały również wyizolowane ze ścieków szpitalnych [30, 31]. Na podstawie tego można stwierdzić, że ścieki mogą być rezerwuarem szczepów będących nosicielami genu *bla<sub>NDM</sub>*. Powiązania między ściekami szpitalnymi a rozprzestrzenianiem się *bla<sub>NDM</sub>* nie zostały jeszcze potwierdzone i wymagają dalszych badań. Niemniej jednak ścieki szpitalne powinny być odpowiednio oczyszczane zgodnie z istniejącymi wytycznymi i przepisami [34].

## 5. Rozprzestrzenianie się szczepów NDM-pozytywnych a turystyka

Gwałtowne rozprzestrzenianie się szczepów NDM-pozytywnych od jego początkowego pojawienia się w Indiach na wszystkie kontynenty jest w znacznym stopniu związane z globalnym rozwojem turystyki. Pierwsze odkrycia genu *bla<sub>NDM-1</sub>* w Indiach, Pakistanie i Wielkiej Brytanii wykazały, że prawie wszystkie przypadki ich izolacji w Wielkiej Brytanii były związane z wcześniejszymi podróżami pacjentów na subkontynent indyjski [23]. Po pierwszym raporcie częstość występowania przypadków NDM gwałtownie wzrosła, przy czym kraje w regionie śródziemnomorskim w Europie

odnotowały największy wzrost [35]. Szczegółowe badanie pierwszych zgłoszonych przypadków NDM w Europie wykazało, że 57% wszystkich przypadków było związanych z wcześniejszą hospitalizacją na subkontynencie indyjskim lub na Bałkanach [36]. Pierwsze doniesienie o epidemii w Europie miało miejsce we Włoszech w 2011 roku. Gen  $bla_{NDM-1}$  wykryto zarówno w szczepach klinicznych *Klebsiella pneumoniae*, jak i *Escherichia coli* wyizolowanych od pacjentów w szpitalu w Bolonii, przy czym pierwszy szczep pochodził od pacjenta wcześniej hospitalizowanego w New Delhi w Indiach [37]. Ten nagły wybuch epidemii sprawił, że Włochy do roku 2017 osiągnęły jeden z najwyższych wskaźników występowania szczepów NDM-pozytywnych w Europie [29]. Do 2014 r. Grecja zgłaszała utrzymujące się przypadki zakażeń szpitalnych wywołanych przez szczepy *K. pneumoniae* typu 11 (ST11) niosące gen  $bla_{NDM-1}$  [38], uważane za nabyte po raz pierwszy przez podróże do regionu wschodnich Bałkanów. Międzynarodowe podróże były również przyczyną przemieszczania się szczepów NDM-pozytywnych do Ameryki Północnej, co doprowadziło do pojawienia się przenoszącego  $bla_{NDM-1}$  *P. aeruginosa* ST654 [39], jak również przypadków przenoszenia tego genu przez *E. coli* i *K. pneumoniae* [40]. Bezpośrednie podróże z Indii, a następnie Iranu, były również związane z pierwszymi przypadkami izolacji szczepów NDM-pozytywnych w Stanach Zjednoczonych [41-43].

Międzynarodowe podróże są ważnym czynnikiem predysponującym do kolonizacji przewodu pokarmowego przez szczepy NDM-pozytywne, zwłaszcza w przypadku hospitalizacji w tamtejszych placówkach ochrony zdrowia. Przeprowadzono szereg wysokiej jakości badań, które pokazują, że podróż do regionów endemicznych, takich jak Indie i Azja Południowo-Wschodnia, prowadzi do znacznego poziomu kolonizacji jelit przez bakterie niosące geny  $\beta$ -laktamazy o rozszerzonym spektrum (ESBL) [44-46]. Jednak do tej pory przeprowadzono tylko jedno badanie oceniające ryzyko bezobjawowej kolonizacji przez bakterie przenoszące  $bla_{NDM-1}$  podczas podróży [47].

## 6. Podsumowanie

Bakterie *Klebsiella pneumoniae* New Delhi stanowią ważną grupę patogenów odpowiedzialnych za zakażenia szpitalne. Ze względu na bogaty profil czynników wirulencji występujący powszechnie u bakterii z gatunku *Klebsiella pneumoniae*, a także ich zdolność do formowania biofilmu są one szczególnie niebezpieczne u osób z obniżoną odpornością. Gen kodujący metalo- $\beta$ -laktamazę – enzym warunkujący oporność na karbapenemy ( $bla_{NDM}$ ) oraz zjawisko horyzontalnego transferu genów czyni te szczepy wyjątkowo niebezpiecznymi w aspekcie epidemiologicznym i klinicznym.

Szczepy NDM-pozytywne cały czas rozprzestrzeniają się na całym świecie pomimo usilnych starań i pozostają ogromnym wyzwaniem dla współczesnej medycyny, przez co są znaczącym zagrożeniem dla zdrowia publicznego. Szerokie rozpowszechnienie genów  $bla_{NDM}$  jest w dużej mierze zależne od niosących go plazmidów, zwłaszcza typu IncX3. Bakterie NDM-pozytywne nieustannie ewoluują, aby wytworzyć nowe warianty metalo- $\beta$ -laktamaz, dzięki czemu niektóre z nich wykazują zwiększoną aktywność karbapenemazy.

Żadne leczenie ukierunkowane na NDM nie zostało obecnie zatwierdzone do stosowania klinicznego, chociaż wiele nowych czynników o różnych mechanizmach działania jest w trakcie badań lub jest w trakcie opracowywania.

Ostateczny sukces walki z NDM oprócz opracowania skutecznych środków przeciwdrobnoustrojowych opiera się również na kontroli zakażeń oraz zwiększenia środków ostrożności w placówkach opieki zdrowotnej, w celu ograniczenia rozprzestrzeniania się tych szczepów oraz występowania epidemii.

## Literatura

1. El Fertas-Aissani R., et al., *Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of Klebsiella pneumoniae strains isolated from different clinical specimens*, Pathologie Biologie, 61(5), 2013, s. 209-216.
2. Highsmith A.K., Jarvis W.R., *Klebsiella pneumoniae: selected virulence factors that contribute to pathogenicity*, Infection Control & Hospital Epidemiology, 6(2), 1985, s.75-77.
3. Yong D., Toleman M.A., Giske C.G., Cho H.S., Sundman K., Lee K., Walsh T.R., *Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, bla<sub>NDM-1</sub>, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in Klebsiella pneumoniae sequence type 14 from India*, Antimicrobial agents and chemotherapy, 53(12), 2009, s. 5046-5054.
4. Wu W., Feng Y., Tang G., Qiao F., McNally A., Zong Z., *NDM metallo- $\beta$ -lactamases and their bacterial producers in health care settings*, Clinical microbiology reviews, 32(2), 2019.
5. Bush K., *The ABCD's of  $\beta$ -lactamase nomenclature*, Journal of Infection and Chemotherapy, 19(4), 2013, s. 549-559.
6. Ambler R.P., et al., *A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases*, Biochemical Journal, 276, 1991, s. 269-272.
7. Palzkill T., *Metallo- $\beta$ -lactamase structure and function*, Ann N Y Acad Sci, 1277(1), 2003, s. 91-104.
8. Bush K., Jacoby G.A., *Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases*, Antimicrob Agents Chemother, 54(3), 2010, s. 969-976.
9. Mojica M.F., Bonomo R.A., Fast W., *B1-metallo-  $\beta$ -lactamases: where do we stand?*, Curr Drug Targets, 17(9), 2016, s. 1029-1050.
10. Kim Y., Cunningham M.A., Mire J., Tesar C., Sacchettini J., Joachimiak A., *NDM-1, the ultimate promiscuous enzyme: substrate recognition and catalytic mechanism*, FASEB Journal, 27(5), 2013, s. 1917-1927.
11. Zhang H., Hao Q., *Crystal structure of NDM-1 reveals a common  $\beta$ -lactam hydrolysis mechanism*, FASEB Journal, 25(8), 2011, s. 2574-2582.
12. King D., Strynadka N., *Crystal structure of New Delhi metallo-  $\beta$ - lactamase reveals molecular basis for antibiotic resistance*, Protein Science, 20(9), 2011, s. 1484-1491.
13. Gonzalez L.J., Bahr G., Nakashige T.G., Nolan E.M., Bonomo R.A., Vila A.J., *Membrane anchoring stabilizes and favors secretion of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase*, Nature Chemical Biology, 12(7), 2016, s. 516-522.
14. Crowder M.W., Spencer J., Vila A.J., *Metallo-  $\beta$ -lactamases: novel weaponry for antibiotic resistance in bacteria*, Accounts of chemical research, 39(10), 2006, s. 721-728.
15. Bahr G., Vitor-Horen L., Bethel C.R., Bonomo R.A., Gonzalez L.J., Vila A.J., *Clinical evolution of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM) optimizes resistance under Zn(II) deprivation*, Antimicrobial Agents Chemotherapy, 62(1), 2018, s. 9-17.
16. Hornsey M., Phee L., Wareham D.W., *A novel variant, NDM-5, of the New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase in a multidrug-resistant Escherichia coli ST648 isolate recovered from*

- a patient in the United Kingdom, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 55(12), 2011, s. 5952-5954.
17. Liu Z., Wang Y., Walsh T.R., Liu D., Shen Z., Zhang R., Yin W., Yao H., Li J., Shen J., *Plasmid-mediated novel bla<sub>NDM-17</sub> gene encoding a carbapenemase with enhanced activity in a sequence type 48 Escherichia coli strain*, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 61(5), 2017, s. 3-16.
  18. Liu Z., Li J., Wang X., Liu D., Ke Y., Wang Y., Shen J., *Novel variant of New Delhi metallo-β-lactamase, NDM-20, in Escherichia coli*, *Front Microbiology*, 9, 2018, s. 248.
  19. Liu L., Feng Y., McNally A., Zong Z., *bla<sub>NDM-21</sub>, a new variant of bla<sub>NDM</sub> in an Escherichia coli clinical isolate carrying bla<sub>CTX-M-55</sub> and rmtB*, *J Antimicrobial Chemotherapy*, 73(9), 2018, s. 2336-2339.
  20. Cheng Z., Thomas P.W., Ju L., Bergstrom A., Mason K., Clayton D., Miller C., Bethel C.R., VanPelt J., Tierney D.L., Page R.C., Bonomo R.A., Fast W., Crowder M.W., *Evolution of New Delhi metallo-β-lactamase (NDM) in the clinic: effects of NDM mutations on stability, zinc affinity, and mono – zinc activity*, *Journal of Biological Chemistry*, 293(32), 2018, s. 12606-12618.
  21. Nordmann P., Boulanger AE, Poirel L., *NDM-4 metallo-β-lactamase with increased carbapenemase activity from Escherichia coli*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(4), 2012, s. 2184-2186.
  22. Bahr G., Vitor-Horen L., Bethel C.R., Bonomo R.A., Gonzalez L.J., Vila A.J., *Clinical evolution of New Delhi metallo-β-lactamase (NDM) optimizes resistance under Zn(II) deprivation*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62(1), 2018, s. 9-17.
  23. Kumarasamy K.K., Toleman M.A., Walsh T.R., Bagaria J., Butt F., Balakrishnan R., Chaudhary U., Doumith M., Giske C.G., Irfan S., Krishnan P., Kumar A.V., Maharjan S., Mushtaq S., Noorie T., Paterson D.L., Pearson A., Perry C., Pike R., Rao B., Ray U., Sarma J.B., Sharma M., Sheridan E., Thirunarayan M.A., Turton J., Upadhyay S., Warner M., Welfare W., Livermore D.M., Woodford N., *Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study*, *Lancet Infectious Diseases*, 10(9), 2010, s. 597-602.
  24. Karlowsky J.A., Lob S.H., Kazmierczak K.M., Badal R.E., Young K., Motyl M.R., Sahn D.F., *In vitro activity of imipenem against carbapenemase – positive Enterobacteriaceae isolates collected by the SMART global surveillance program from 2008 to 2014*, *Journal of Clinical Microbiology*, 55(6), 2017, s. 1638-1649.
  25. Kazmierczak K.M., Rabine S., Hackel M., McLaughlin R.E., Biedenbach D.J., Bouchillon S.K., Sahn D.F., Bradford P.A., *Multiyear, multinational survey of the incidence and global distribution of metallo-β-lactamase – producing Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(2), 2016, s. 1067-1078.
  26. Perry J.D., Naqvi S.H., Mirza I.A., Alizai S.A., Hussain A., Ghirardi S., Orega S., Wilkinson K., Woodford N., Zhang J., Livermore D.M., Abbasi S.A., Raza M.W., *Prevalence of faecal carriage of Enterobacteriaceae with NDM-1 carbapenemase at military hospitals in Pakistan, and evaluation of two chromogenic media*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(10), 2011, s. 2288-2294.
  27. Hu X., Xu X., Wang X., Xue W., Zhou H., Zhang L., Ma Q., Zhao R., Li G., Li P., Zhang C., Shi Y., Wang J., Jia L., Hao R., Wang L., Zou D., Liu X., Qiu S., Song H., Sun Y., *Diversity of New Delhi metallo-β-lactamase-producing bacteria in China*, *International Journal of Infectious Diseases*, 55, 2017, s. 92-95.
  28. Zhang R., Liu L., Zhou H., Chan E.W., Li J., Fang Y., Li Y., Liao K., Chen S., *Nationwide surveillance of clinical carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) strains in China*, *EBioMedicine*, 19, 2017, s. 98-106.

29. Grundmann H., et al., *Occurrence of carbapenemase – producing Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli in the European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study*, The Lancet Infectious Diseases, 17(2), 2017, s. 153-163.
30. Zong Z., Zhang X., *bla<sub>NDM-1</sub>-carrying Acinetobacter johnsonii detected in hospital sewage*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 68(5), 2013, s. 1007-1010.
31. Zhang C., et al., *Higher isolation of NDM-1 producing Acinetobacter baumannii from the sewage of the hospitals in Beijing*, PLoS One, 8(6), 2014, s. 57.
32. Khan A.U., Parvez S., *Detection of bla<sub>NDM-4</sub> in Escherichia coli from hospital sewage*, Journal of Medical Microbiology, 63(10), 2014, s. 1404-1406.
33. Daoud Z., Farah J., Sokhn E.S., El Kfoury K., Dahdouh E., Masri K., Afif C., Abdel-Massih R.M., Matar G.M., *Multidrug-resistant Enterobacteriaceae in Lebanese hospital wastewater: implication in the One Health Concept*, Microbial Drug Resistance, 24(2), 2018, s.166-174.
34. Carraro E., Bonetta S., Bonetta S., *Hospital wastewater: existing regulations and current trends in management*, Springer, Cham, 2017.
35. Canton R., et al., *Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe*, Clinical Microbiology and Infection, 18(5), 2012, s. 413-431.
36. Struelens M.J., Monnet D.L., Magiorakos A.P., O'Connor F.S., Giesecke J., *New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing Enterobacteriaceae: emergence and response in Europe*, Eurosurveillance, 2010.
37. Gaibani P., Ambretti S., Berlingeri A., Cordovana M., Farruggia P., Panico M., Landini M.P., Sambri V., *Outbreak of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in northern Italy, July to August 2011*, Eurosurveillance, 16(47), 2011, s. 20-27.
38. Voulgari E., Gartzonika C., Vrioni G., Politi L., Priavali E., Levidiotou-Stefanou S., Tsakris A., *The Balkan region: NDM-1-producing Klebsiella pneumoniae ST11 clonal strain causing outbreaks in Greece*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 69(8), 2014, s. 2091-2097.
39. Mataseje L.F., Peirano G., Church D.L., Conly J., Mulvey M., Pitout J.D., *Colistin-nonsusceptible Pseudomonas aeruginosa sequence type 654 with bla<sub>NDM-1</sub> arrives in North America*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 60(3), 2016, s.1794-1800.
40. Peirano G., Ahmed-Bentley J., Fuller J., Rubin J.E., Pitout J.D., *Travel – related carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Alberta, Canada: the first 3 years*, Journal of Clinical Microbiology, 52(5), 2014, s. 1575-1581.
41. Doi Y., O'Hara J.A., Lando J.F., Querry A.M., Townsend B.M., Pasculle A.W., Muto C.A., *Co-production of NDM-1 and OXA-232 by Klebsiella pneumoniae*, Emerging Infectious Diseases, 20(1), 2014, s. 163-165.
42. Lee C.-S., Vasoo S., Hu F., Patel R., Doi Y., *Klebsiella pneumoniae ST147 coproducing NDM-7 carbapenemase and RmtF 16S rRNA methyltransferase in Minnesota*, Journal of Clinical Microbiology, 52(11), 2014, s. 4109-4110.
43. Li J.-J., Munoz-Price L.S., Spychala C.N., DePascale D., Doi Y., *New Delhi metallo-β-lactamase-1-producing Klebsiella pneumoniae*, Emerging Infectious Diseases, 22(4), 2016, s. 744-746.
44. McNulty C.A.M., Lecky D.M., Xu-McCrae L., Nakiboneka-Ssenabulya D., Chung K.T., Nichols T., Thomas H.L., Thomas M., Alvarez-Buylla A., Turner K., Shabir S., Manzoor S., Smith S., Crocker L., Hawkey P.M., *CTX-M ESBL-producing Enterobacteriaceae: estimated prevalence in adults in England in 2014*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 73(5), 2018, s. 1368-1388.

45. Arcilla M.S., et al., *Import and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae by international travellers (COMBAT study): a prospective, multicentre cohort study*, The Lancet Infectious Diseases, 17(1), 2017, s. 78-85.
46. Kantele A., Laaveri T., Mero S., Vilkkumäki K., Pakkanen S.H., Ollgren J., Antikainen J., Kirveskari J., *Antimicrobials increase travelers' risk of colonization by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae*, Clinical Infectious Diseases, 60(6), 2015, s. 837-846.
47. Ruppe E., Armand-Lefevre L., Estellat C., El-Mniai A., Boussadia Y., Consigny P.H., Girard P.M., Vittecoq D., Bouchaud O., Pialoux G., Esposito-Farese M., Coignard B., Lucet J.C., Andremont A., Matheron S., *Acquisition of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae by healthy travellers to India, France, February 2012 to March 2013*, Eurosurveillance, 19(14), 2014.

## Charakterystyka oporności *Klebsiella pneumoniae* New Delhi na karbapenemy

### Streszczenie

Bakterie *Klebsiella pneumoniae* New Delhi, posiadające gen oporności na karbapenemy ( $bla_{NDM}$ ) zostały po raz pierwszy wyizolowane w 2008 roku w Szwecji od pacjenta wcześniej hospitalizowanego w Indiach. Bakterie te szybko rozprzestrzeniają się po całym świecie, a od 2011 roku występują również w Polsce. Stanowią one wysokie ryzyko epidemiologiczne, ponieważ gen oporności na karbapenemy przekazywany jest pomiędzy bakteriami poprzez horyzontalny transfer genów, a międzynarodowe podróże dodatkowo sprzyjają migracji szczepów NDM-pozytywnych. Badania mające na celu ułatwienie różnicowania genetycznego tych szczepów oraz ich charakterystykę są zatem niezwykle istotne. Praca miała na celu charakterystykę oporności szczepów *Klebsiella pneumoniae* New Delhi na karbapenemy, z uwzględnieniem budowy, funkcjonowania oraz różnych wariantów enzymu za nią odpowiedzialnego.

Słowa kluczowe: *Klebsiella pneumoniae*, NDM (New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase),  $bla_{NDM}$ , metallo- $\beta$ -laktamazy

## Characterization of carbapeneme resistance in *Klebsiella pneumoniae* New Delhi

### Abstract

*Klebsiella pneumoniae* New Delhi bacteria, which have the carbapeneme resistance gene ( $bla_{NDM}$ ) were first isolated in 2008 in Sweden from a patient previously hospitalized in India. These bacteria are rapidly spreading all over the world, and since 2011 they also occur in Poland. They represent a high epidemiological risk because the carbapenem resistance gene is passed between bacteria through horizontal gene transfer, and international travel additionally promotes the migration of NDM-positive strains. Therefore studies aimed at facilitating the genetic differentiation of these strains and their characteristics are extremely important. The aim of this study was the characterization of the nature of *Klebsiella pneumoniae* New Delhi resistance against carbapenems, including structure, function and different variants of the enzyme responsible for it.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, NDM (New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase),  $bla_{NDM}$ , metallo- $\beta$ -lactamases



## Rola stresu oksydacyjnego w starzeniu się drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

### 1. Wprowadzenie

Jednym z głównych, wciąż nie do końca zrozumianych procesów jest starzenie się organizmów żywych. Ogólnie można powiedzieć, że starzenie jest zjawiskiem nieuniknionym, a jego powszechność sugeruje, że złożone biologiczne procesy będące podłożem tego procesu są podobne u wszystkich organizmów, zarówno jednokomórkowych, jak i wyższych, w tym ludzi. Podstawowa definicja starzenia zakłada, że zachodzące wraz z wiekiem zmiany w organizmie oraz akumulacje uszkodzeń w komórkach powodują zaburzenie jej metabolizmu, co w konsekwencji prowadzi do zaprzestania dalszych podziałów komórki (limit Hayflicka) oraz zaburzenia prawidłowej funkcji wszystkich jej komponentów [1,2]. Proces ten jest na tyle złożony, iż ciężko jest go jednoznacznie definiować. Dodatkowo jak pokazują badania ostatnich lat, wiele czynników endogennych i egzogennych może determinować starzenie [3]. W związku z tym zaproponowano kilka teorii starzeniowych, które w różny sposób usiłują wytłumaczyć nam ten proces, niestety jak do tej pory żadna z nich nie jest w stanie jasno przedstawić i wyjaśnić wszystkich aspektów tego zjawiska [4].

Jedną z najstarszych i jednocześnie najbardziej znanych wydaje się być teoria wolnorodnikowa (teoria stresu oksydacyjnego). Opublikowana w 1956 roku przez Denhama Harmana teoria zakładała, iż główną przyczyną starzenia się organizmów żywych jest akumulacja uszkodzonych makrocząsteczek powstałych w wyniku działalności reaktywnych form tlenu (RFT) [5]. RFT są atomami bądź cząsteczkami, które w swojej budowie posiadają atomy tlenu cechujące się obecnością co najmniej jednego niesparowanego elektronu. Do grupy tej zaliczane są także: nadtlenuk wodoru, tlen singletowy oraz ozon, które pomimo braku niesparowanego elektronu wyróżniają się obecnością specyficznego wiązania  $O^3/4O$ . Nietypowa budowa chemiczna tych związków determinuje ich wysoką reaktywność, co poniekąd zmusza je do łączenia się z innymi cząsteczkami w celu oddania wolnego elektronu. Niestety, tymi molekułami są zazwyczaj niezbędne do życia komórki białka, DNA oraz lipidy. Następnym szkodliwego działania RFT są trwałe zmiany struktury tych makrocząsteczek, upośledzenie pełnionych przez nie funkcji lub całkowita utrata zdolności biologicznej [6]. Harman postulował również, iż głównym organellum komórkowym odpowiedzialnym za powstawanie RFT są mitochondria, które determinują tempo starzenia się komórek postmitotycznych [7].

Od wielu lat drożdże pączkujące *Saccharomyces cerevisiae* są jednym z modeli w badaniach RFT i ich wpływu na starzenie, a także stanowią dalszą podstawę do dalszych badań tego zjawiska u wyższych eukariontów. Co więcej, te jednokomórkowe grzyby w znacznym stopniu przyczyniły się do poznania wielu

---

<sup>1</sup> mateuszmolon@univ.rzeszow.pl, Zakład Biochemii i Biologii Komórki, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Rzeszowski.

mechanizmów chroniących komórki przed szkodliwym działaniem reaktywnych form tlenu [8]. Główną linią obrony komórki jest enzymatyczny system antyoksydacyjny, w skład którego wchodzi białka neutralizujące, tj: katalaza, peroksydaza glutationowa oraz dysmutaza ponadtlenkowa. System ten wspomagają antyoksydanty drobnocząsteczkowe (m.in. witamina E i C, glutation, koenzym Q) odpowiedzialne za nieswoiste reakcje, które powodują inaktywację RFT. Wraz ze starzeniem się komórki mechanizmy te działają coraz mniej sprawnie [9].

Teoria stresu oksydacyjnego Harmana na przestrzeni lat zyskała wielu zwolenników, jak i przeciwników. Nawet dziś, brak jest jednoznacznych wyników, które wskazywałyby, iż to RFT w głównej mierze determinują starzenie, choć większość z nich podkreśla, że stres oksydacyjny jest w stanie ściśle oddziaływać na komórki, wywołując wiele niepożądanych zmian metabolicznych mających istotny wpływ na długość ich życia.

Celem niniejszego rozdziału jest przedstawienie najnowszego stanu wiedzy na temat stresu oksydacyjnego i jego roli w starzeniu komórkowym. Jako model badań wykorzystano drożdże pączkujące *Saccharomyces cerevisiae*.

## 2. RFT i stres oksydacyjny

W toku ewolucji organizmy wykształciły doskonały sposób wykorzystywania tlenu w celu pozyskiwania energii. Proces ten nazywany oddychaniem tlenowym. Najogólniej można powiedzieć, że polega on na utlenianiu szeregu substancji organicznych w cytozolu i mitochondriach, czego konsekwencją jest uwolnienie energii, w postaci ATP, niezbędnej do przeprowadzania wielu procesów metabolicznych zachodzących w komórce.

W trakcie oddychania mitochondrialnego, również u drożdży *S. cerevisiae*, może dojść do „wycieku” elektronów z łańcucha oddechowego podczas redukcji tlenu. W ten sposób uwalniany zostaje głównie anionorodnik ponadtlenkowy  $O_2^{\cdot-}$ , zaliczany do reaktywnych form tlenu (RFT) [10]. Produkty reakcji wzbudzenia lub redukcji tlenu, tj.: nadtlenek wodoru, rodnik hydroksylowy oraz anionorodnik ponadtlenkowy są cząsteczkami o wiele bardziej reaktywnymi niż sam tlen w stanie podstawowym. Wspomniana redukcja może zachodzić jedno- lub dwuelektronowo, a w niektórych przypadkach bezpośrednio w reakcji czteroelektronowej [11]. Badania z ostatnich lat wykazały zdolność ingerencji RFT w różne procesy fizjologiczne zachodzące w komórkach, m.in. funkcję sygnalizacyjną stresu powstałego w wyniku uszkodzeń struktur komórkowych. Jednak przekroczenie produkcji RFT ponad biologiczną zdolność do ich szybkiego zmiatania i neutralizacji ma niekorzystny wpływ na fizjologię komórki, a wynikające z tego uszkodzenia oksydacyjne silnie korelują ze starzeniem się [12, 13]. Warto zwrócić uwagę na fakt, że drożdże należą do fakultatywnych anaerobów, a do oddychania tlenowego dochodzi u nich po obniżeniu stężenia w środowisku wzrostu fermentowalnych źródeł węgla.

## 3. Drożdże *S. cerevisiae* jako organizm modelowy

Drożdże piekarnicze *S. cerevisiae* mimo upływu lat są nadal szeroko stosowanym modelem w badaniach gerontologicznych, a badania przeprowadzone na drożdżach dostarczyły wielu danych na temat mechanizmów molekularnych towarzyszących

starzeniu. Ważny z punktu widzenia poznawczego był fakt pełnego sekwencjonowania genomu *S. cerevisiae*. Co więcej, wykazano, że wiele białek drożdży jest homologicznych do białek wyższych eukariontów, w tym ludzi [14]. Nie dziwi więc fakt, iż te jednokomórkowe organizmy eukariotyczne są wykorzystywane w szeregu badań cytotoksyczności oraz do analizy procesów biochemicznych zachodzących podczas stresu oksydacyjnego. Drożdże są także modelem do badania funkcji mitochondriów w trakcie starzenia się, dzięki ich szybkiemu wzrostowi. Wysoce rozwinięta genetyka oraz dostępność stosunkowo prostych metod wprowadzania zmian genetycznych w dowolnym momencie na chromosomie, jak i również w mtDNA to dodatkowy atut tego modelu. Ponadto w przypadku komórek drożdży możliwa jest analiza mutantów, w których zablokowana została możliwość oddychania tlenowego. Ważną rolę odegrały również mutanty delecyjne pozbawione możliwości syntezy głównych enzymów antyoksydacyjnych, tj. dysmutaza ponadtlenkowa [15].

Na przestrzeni lat dla drożdży *Saccharomyces cerevisiae* zaproponowane zostały dwa odmienne modele starzenia, które w znacznym stopniu przyczyniają się do badania zjawiska starzenia się komórek, również wyższych eukariontów. W klasycznym ujęciu model starzenia replikacyjnego (RLS) określa potencjał reprodukcyjny komórek aktywnych mitotycznie, z kolei model starzenia chronologicznego (CLS) przedstawia długość życia komórek w fazie postmitotycznej [16].

#### **4. Źródła RFT w komórce**

Warto wspomnieć, iż nie istnieje takie zjawisko jak pojedynczy stres oksydacyjny. Można powiedzieć, że w zależności od generowanych RFT w komórce wyróżnić możemy różne formy tego stresu. Wykazały to badania wpływu różnych RFT na mutanty delecyjne *S. cerevisiae*. W analizowaniu procesów zwłaszcza tak wielopłaszczyznowych, jak starzenie, niezbędne jest określenie, dokładnie które z RFT są zaangażowane w to zjawisko. Błędne zatem jest poleganie na jednej z form, która pełniłaby rolę ogólnego utleniacza. Co ważne, późniejsze reakcje pomiędzy wolnymi rodnikami wytwarzają wtórne RFT [17].

##### **4.1. Mitochondrium – fabryka energii i RFT**

Mitochondria są cytoplazmatycznymi organellami odpowiedzialnymi za oddychanie komórkowe. Ich podstawowe zadanie to przeprowadzenie fosforylacji oksydacyjnej z pomocą łańcucha oddechowego. Główną rolę odgrywają tutaj cztery enzymatyczne kompleksy oraz syntaza ATP, dzięki której utworzony zostaje główny nośnik energii w komórce, czyli ATP. O tym, jak ważnym organellum komórkowym są mitochondria świadczyć może fakt, iż wiele ich defektów prowadzi do tzw. chorób mitochondrialnych. Silna korelacja występuje również pomiędzy zaburzeniami funkcji mitochondriów a chorobami neurodegeneracyjnymi, tj. Parkinson czy Alzheimer [18, 19].

Mitochondrialny łańcuch transportu elektronów jest bazowym miejscem powstawania RFT w komórce. Poprzez pełnione przez mitochondria funkcje oddechowe, jak i fakt, że to w nich znajduje się najwyższe stężenie tlenu, są one uważane za centrum indukujące komórkowy stres oksydacyjny. RFT będące produktami ubocznymi oddychania tlenowego w mitochondrium powstają głównie na poziomie kompleksu I oraz III transportu elektronów, a główny z nich to rodnik ponadtlenkowy [20].

W przypadku drożdży występuje wyłącznie kompleks III, jednakże równoważniki redukujące NADH wprowadzone do łańcucha oddechowego za pomocą białek Nde1 lub Nde2, mogą również być zdolne do wytwarzania rodnika ponadtlenkowego. Co ciekawe, topologia produkcji RFT dla kompleksu I i III jest odmienna. Te wytwarzane przez kompleks I skierowane zostają głównie do macierzy mitochondrialnej, z kolei RFT powstałe w kompleksie III zostają również przetransportowane do przestrzeni międzybłonowej. To zróżnicowanie przekłada się na różne skutki reaktywnych form tlenu w zależności od miejsca powstania [21].

Mitochondrialne DNA odgrywa zasadniczą rolę w inicjowaniu i utrzymywaniu starzenia. RFT powstające w mitochondrium uszkodzają mtDNA, który z kolei powoduje powstawanie nieprawidłowych białek wchodzących w skład kompleksów oddechowych. Mutacje te w efekcie powodują składanie uszkodzonych kompleksów, które produkują jeszcze więcej RFT. Zjawisko to określa się mianem hipotezy błędnego koła [22].

Zmiany w mitochondriach od dawna uważane są za potencjalne czynniki starzenia się. Biorąc pod uwagę, że akumulacja uszkodzonych mitochondriów jest powszechnym znakiem rozpoznawczym starzenia się, zrozumienie tego zjawiska jest niezbędne dla interwencji przeciwstarzeniowych [23].

#### 4.2. Oksydazy NADPH i ich rola w produkcji RFT

Pomimo iż to w mitochondrialnych kompleksach oddechowych wytwarzany jest największy odsetek RFT, istnieją inne enzymy spoza mitochondrium zaangażowane w to zjawisko. Enzymy, o których mowa to głównie oksydazy NADPH (NOX), które w znaczny sposób wpływają na różnorodne procesy fizjologiczne zachodzące w komórce [24]. Drożdże *S. cerevisiae* nie posiadają genów odpowiedzialnych za syntezę NOX. Niemniej jednak, u tych organizmów występuje specyficzna ramka odczytu ORF (ang. *open reading frame*), kodująca homologiczną względem wyższych eukariontów oksydazę zależną od NADPH zlokalizowaną w retikulum endoplazmatycznym. Enzym ten wytwarza nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ), a jego nadekspresja prowadzi do wytwarzania ROS powodującego apoptozę zależną od białka Yca1 [25]. Badania wykazały ciekawą korelację pomiędzy NOX oraz mitochondrium, mianowicie organelle te mogą być celem działania RFT powstających przez oksydazy NADPH, ale także RFT powstałe w łańcuchu oddechowym wydają się w pewnych warunkach stymulować NOX. Sugeruje się, że zjawisko to może dodatkowo potęgować efekt „błędnego koła” podczas stresu oksydacyjnego [26].

#### 4.3. Funkcja peroksysomów, a powstawanie RFT

Peroksysomy charakteryzują się szerokim zakresem aktywności enzymatycznej w komórce, które w dużym stopniu wpływają na jej metabolizm. Wraz z mitochondriami są niezbędne do zachowania prawidłowej homeostazy RFT. Około 35% tlenu występującego w komórce wykorzystują peroksysomy. Mimo liczego występowania w różnych komórkach i tkankach ich uniwersalną funkcją jest utlenianie kwasów tłuszczowych oraz degradacja  $H_2O_2$  przez zawarty w nich enzym – katalazę [27].

Peroksysomy są o wiele bardziej dynamicznymi organellami niż dotychczas uważano. Badania sprzed kilku lat pokazały, iż w zależności od rodzaju i siły czynnika

indukującego, który pochodzi ze środowiska zewnętrznego zmianie może ulegać liczba tych organelli w komórce, ich wielkość czy morfologia [28]. Mając na uwadze szerokie spektrum reakcji, w które zaangażowane są peroksysomy i ich sztanarową funkcję utleniania kwasów tłuszczowych niezbędna jest efektywna kontrola stanu tego organellum, gdyż są one zarówno zmiataczami, jak i generatorami RFT w komórkach. Ponadto oksydazy uczestniczące w katabolizmie aminokwasów czy utlenianiu poliamin stanowią dodatkowe źródło RFT w peroksysomach. Nie dziwi więc fakt, że zaburzenia w prawidłowym ich działaniu w znacznym stopniu przyczyniają się do powstawania stresu oksydacyjnego oraz przedwczesnego starzenia [29].

Pączkujące drożdże rozkładają kwasy tłuszczowe jedynie w peroksysomach poprzez  $\beta$ -oksydację, co dokładnie oznacza usunięcie z karboksylowego końca kwasu dwóch atomów węgla. Reakcja ta zostaje zapoczątkowana redukcją  $O_2$  do  $H_2O_2$  z pomocą acylo-CoA, a produkt końcowy acetylo-CoA jest przekształcany w acetylokarnitynę i transportowany do mitochondriów, gdzie zostaje wykorzystany w cyklu Krebsa. Wykazano, że w przypadku tego organizmu dodanie do hodowli  $H_2O_2$  aktywuje także katalazę peroksysomalną, co dodatkowo przemawia za funkcją tego organellum w detoksykacji RFT. Co ciekawe, aktywność peroksydazy glutationowej Gpx-1, która również pełni funkcję antyoksydacyjną, jest wymagana w biogenezie i formowaniu się peroksysomów. Wykazano również, że w zależności od zastosowanych warunków wzrostu, niedobór peroksysomalnej katalazy moduluje długość życia w modelu CLS. Wreszcie, ingerencja w podziały peroksysomalne również mogą wydłużać życie komórek drożdży. Reasumując, utrzymanie w komórce funkcjonalnych peroksysomów wydaje się być istotne w determinowaniu długowieczności [30-32].

#### **4.4. Modyfikacje białek w retikulum endoplazmatycznym jako źródło RFT**

Retikulum endoplazmatyczne (RE) będące środowiskiem zwijania się białek jest obok mitochondriów i peroksysomów kolejnym organellum wytwarzającym RFT. Generowane są one podczas oksydacyjnych modyfikacji struktury białek, głównie podczas tworzenia wiązań disiarczkowych. Poprzez działalność oksydoreduktazy Ero1 oraz izomerazy Pdi1, tlen działa jako końcowy akceptor elektronów w efekcie czego powstaje  $H_2O_2$ . Ponadto wykazano, iż stan niedotlenienia powoduje zachwianie homeostazy RE potęgując tym samym stres oksydacyjny [33]. Należy nadmienić, iż glutation jest głównym buforem redoks w retikulum endoplazmatycznym, co w połączeniu z jego właściwościami determinuje RE jako przedział będący najbardziej utlenianym w komórce [34].

Powstający w RE, jak i w innych organellach  $H_2O_2$  może ulec przekształceniom do najbardziej niebezpiecznego rodnika hydroksylowego  $\cdot OH$ , który natychmiastowo reaguje z wszystkimi składnikami komórki. Rodnik powstaje w reakcji Fentona, która to katalizowana jest przez zredukowane jony metali, tj.  $Fe^{2+}$ . Gdy w środowisku reakcji obecne są związki lub cząsteczki, które mogą zredukować  $Fe^{3+}$  do  $Fe^{2+}$  (L-askorbinian,  $O_2^{\cdot -}$ ), reakcja ulega zaostreniu. Dlatego też mechanizmy odpowiedzialne za prawidłową równowagę jonową metali głównie Fe i Cu, odgrywają istotną rolę w obronie antyoksydacyjnej komórki, minimalizując powstawanie RFT [35].

## 5. Uszkodzenia komórkowe spowodowane RFT

Utlenianie makrocząstek prowadzi do ich inaktywacji i osłabienia zdolności do prawidłowego pełnienia swoich funkcji. Uszkodzenia lipidów, białek oraz co najważniejsze DNA, prowadzi w efekcie do zaburzenia homeostazy komórki, przyspieszenia procesu starzenia, a nawet jej przedwczesnej śmierci.

### 5.1. Utlenianie białek

Utlenianie białek definiuje się jako kowalencyjną modyfikację białka przez ROS. W wyniku tego oddziaływania może nastąpić rozerwanie łańcuchów polipeptydowych, modyfikacja reszt aminokwasowych oraz powstanie wiązań krzyżowych, zarówno w obrębie tego samego, jak i kilku łańcuchów polipeptydowych [36]. Wykazano, iż najwyższą wrażliwość na działanie reaktywnych form tlenu przejawiają: tyrozyna, tryptofan, cysteina oraz metionina. W efekcie oddziaływania rodnika hydroksylogowego na peptydy tworzą się karbonylowane białka, efektem czego jest zmniejszenie lub całkowite zatracenie ich zdolności katalitycznych. Akumulacja utlenionych białek prowadzi do formowania się agregatów o dużej masie cząsteczkowej. Są słabymi substratami również dla proteasomu, co dodatkowo zmniejsza zdolności komórki do ich degradacji. Wykazano, że wysokie stężenie agregatów białkowych jest związane z różnymi chorobami człowieka, takimi jak miażdżyca, choroba Alzheimer'a, a także ma wpływ na starzenie [37].

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stymuluje odwracalne utlenianie grup tiolowych co w konsekwencji prowadzi do powstania disiarczków lub kwasu sulfenowego, który w wyniku dalszego utleniania może nieodwracalnie zostać przekształcony do kwasów sulfinowego oraz sulfonowego. Uszkodzenia oksydacyjne białek prowadzą w efekcie do obniżonej aktywności biologicznej oraz zaburzenia homeostazy komórkowej [38].

Pączkujące drożdże *S. cerevisiae* na drodze ewolucji wykształciły system zależny od białka Sir2, który zachowuje agregaty karbonylowanych białek w przedziałach komórek macierzystych podczas zachodzącej mitozy zamkniętej. Dzięki temu mechanizmowi komórki potomne nie dziedziczą tych uszkodzeń i charakteryzują się pełnym potencjałem reprodukcyjnym. Warto nadmienić, że *SIR2* zaangażowany jest w regulację długości życia co potwierdziły wcześniejsze badania [39]. Dzięki drożdżom wykazano również, iż na poziom RFT ma wpływ dostępność jonów żelaza w komórce, gdzie poziom karbonylowanych białek jest znacznie wyższy w mutantach pozbawionych białka Yfh1 odpowiedzialnego za magazynowanie żelaza. Co ciekawe ferrytyna L, której funkcją jest magazynowanie żelaza u ludzi może w pewnym stopniu zastępować brak białka drożdżowego u mutantów delecyjnych *yfh1Δ*, a obserwowany efekt to znaczny spadek poziomu karbonylacji białek oraz wydłużanie RLS [40]. Utlenianymi białkami mogą być również enzymy antyoksydacyjne, m.in. dysmutaza ponadtlenkowa, co poprzez ich inaktywację determinuje niższą zdolność zmiatania RFT. Również w mutantach, w których dokonano dysrupcji genów kodujących czynniki transkrypcyjne *YAP1* oraz *SKN7*, będących jednocześnie regulatorami odpowiedzi na stres oksydacyjny, odnotowano wzrost poziomu białek karbonylowanych [41].

## 5.2. Peroksydacja lipidów

Peroksydacja lipidów jest zjawiskiem uszkodzania błon biologicznych i lipoprotein. Zakotwiczone w błonie wielonienasycone kwasy tłuszczowe PUFA (ang. *polyunsaturated fatty acids*) są celem RFT, głównie rodnika hydroksylowego. Produkty peroksydacji lipidów (wodoronadtlenki lipidowe) prowadzą do tworzenia innych reaktywnych pochodnych, powodujących wtórne uszkodzenia oksydacyjne wszystkich biocząsteczek komórkowych. Prowadzą również do zmian właściwości fizycznych błon biologicznych, między innymi obniżają hydrofobowość wnętrza lipidowego oraz generują aberracje organizacji podwójnej warstwy lipidowej. W efekcie dochodzi do zaburzenia przepuszczalności błon biologicznych w wyniku zahamowania aktywności białek transportujących [42].

Naturalnie w przypadku drożdży *S. cerevisiae* PUFA nie są syntetyzowane. Jednak, jak wykazały badania, drożdże mogą wbudowywać wielonienasycone kwasy tłuszczowe w swoje błony biologiczne, jeśli dodane zostaną do pożywki. Po ekspozycji na stres oksydacyjny, w przypadku tych komórek również dochodzi do zjawiska peroksydacji lipidów [43].

## 5.3. Uszkodzenia DNA

Powszechnie uważa się, że oksydacyjne uszkodzenia materiału genetycznego są najistotniejsze dla procesu starzenia się komórek. RFT mogą oddziaływać z DNA powodując negatywne w skutkach pęknięcia nici, modyfikację zasad azotowych czy indukować powstawanie wiązań poprzecznych. Badania wykazały, że w przypadku komórek człowieka w ciągu doby dochodzi do ok. 10000 uszkodzeń spowodowanych aktywnością RFT. Mimo iż komórki w toku ewolucji wykształciły liczne mechanizmy naprawczy, wiele z tych uszkodzeń kumuluje się, czego efektem mogą być różne mutacje genetyczne [44].

Jak wspomniano wcześniej, najwięcej RFT powstaje w mitochondriach. Nic więc dziwnego, że najbardziej narażone na działanie RFT jest mitochondrialne DNA (mtDNA). Co więcej, nie jest ono chronione tak jak jądrowe DNA białkami histonowymi [45]. Wyniki badań z ostatnich lat wykazały jednak, że mitochondria posiadają sprawnie działający mechanizm naprawczy polegające na wycinaniu zasad, BER (ang. *base excision repair*) [46].

Spośród wszystkich uszkodzeń to pęknięcia obu nici DNA odgrywają najważniejszą rolę w starzeniu komórki, gdyż sygnalizowane są one jako tzw. miejsca uszkodzeń DNA związanych ze starzeniem (SDF; ang. *senescence-associated DNA damage foci*). W efekcie komórka stymuluje kinazę ATM, która poprzez fosforylację białka p53 dokonuje jego aktywacji i całkowitego zatrzymania cyklu komórkowego [47].

## 6. Stres oksydacyjny, RFT i starzenie

Aktualnie w badaniach starzeniowych nad wyższymi eukariontami prym wiodą hodowle linii komórkowych, głównie ludzkich lub mysich fibroblastów. Mimo to, w drugiej kolejności wykorzystuje się organizmy prostsze w hodowli, ulegające łatwym modyfikacjom genetycznym i jednocześnie mogące szybko się starzeć. Do tych organizmów wliczane są właśnie drożdże *S. cerevisiae*. Od momentu pojawienia się teorii wolnorodnikowej Harmana naukowcy starają się tłumaczyć korelacje

pomiędzy RFT a procesem starzenia również z wykorzystaniem tego modelowego organizmu [48].

Wzrost wewnątrzkomórkowego stresu oksydacyjnego jest obserwowany zarówno w chronologicznie, jak i replikacyjnie starzejących się komórkach drożdży, również przy braku aktywności zewnętrznych stresorów [49]. Ponadto te same białka podatne na utlenianie w wyniku działania RFT występują w obydwu modelach. Mimo obserwacji wykazujących gromadzenie się karbonylowanych białek oraz innych charakterystycznych markerów starzenia w komórkach starzejących się, nie wykazano jednoznacznych dowodów potwierdzających ich główną rolę w tym zjawisku [50]. Analizy mutantów, których delecje wpływają zarówno na RLS, jak i CLS udowodniły zaangażowanie się funkcji oddechowych w obu formach starzenia. Inne analizy wykazały także, iż komórki stare chronologicznie gromadzą czynniki, które istotnie mogą ograniczyć zdolność reprodukcyjną, co uwidacznia korelację pomiędzy obydwoma modelami starzenia [51].

Jak już wspomniano, komórki potomne drożdży nie dziedziczą uszkodzonych przez RFT białek od komórek macierzystych, w co zaangażowany jest, m.in. gen *SIR2* oraz funkcjonalny cytoskielet aktynowy [39]. Dodatkowo, młode komórki wykazują zwiększoną aktywność katalazy oraz genów odpowiedzialnych za naprawę, co przyczynia się do zwalczania uszkodzeń [52]. Późniejsze badania wykazały również, że wzmożona aktywność aktyny może zmniejszać poziom RFT i wydłużać życie komórek [53].

Zbyt intensywna ekspozycja na RFT może spowalniać lub zatrzymać cykl komórkowy. Jest to odpowiedź komórki, która w pierwszej kolejności stara się naprawić powstałe uszkodzenia. Wspomniana odpowiedź polega głównie na sygnalizacji stresu oksydacyjnego oraz inhibicji ekspresji genów cyklu mitotycznego. W zależności od stopnia uszkodzenia, komórka może ponownie wejść w cykl, lub przejść na szlak apoptozy. Postuluje się, że zaprzestanie cyklu komórkowego, również tego spowodowanego RFT jest typowym markerem starzenia się drożdży [54].

Możliwość stosunkowo łatwych manipulacji w genomie drożdżowym umożliwiła konstruowanie mutantów, dzięki którym na przestrzeni lat przeanalizowano wiele genów, które niejako łączą zjawisko starzenia ze stresem oksydacyjnym. Dzięki temu wykazano między innymi, iż usunięcie genu *SOD1* i zwiększenie ekspozycji na tlen prowadziło do skracania długości życia drożdży, z kolei nadekspresja katalazy i dysmutazy wykazywała pozytywny wpływ na długość życia mutantów [55, 56]. Jednak zaangażowanie przeciwutleniaczy, tj. koenzym Q10 czy  $\alpha$ - tokoferol skraca replikacyjną długość życia komórek *S. cerevisiae* [57]. Pierwotnie postulowano także, iż niektóre mutanty charakteryzujące się zwiększoną żywotnością są odporne na działanie RFT [58]. Jak wykazują nowsze badania, stwierdzenie to może okazać się błędne, zwłaszcza w przypadku analiz w modelu RLS [59].

Jednym z pierwszych genów długowieczności zidentyfikowanych podczas analiz mutantów odpornych na stres oksydacyjny był *SIR4*. Kilka lat później wykazano również istotną rolę genu *SIR2* w regulacji starzenia [60, 61]. Inne badania potwierdziły wydłużanie życia komórek drożdży w modelu RLS poprzez delecję genu *UTH1*, odpowiedzialnego za indukcję apoptozy oraz reakcję komórki na stres oksydacyjny [62]. Znaczenie białka Uth1 dla długowieczności może opierać się również na jego



wpływie na morfologię mitochondriów, co dodatkowo może umacniać w przekonaniu, iż organelle te są silnie powiązane ze starzeniem [63]. Sugerowano, że wadliwa aktywność mitochondriów może w dużym stopniu przyczyniać się do indukowania stresu oksydacyjnego w starych komórkach, jednak zarówno wysoki poziom RFT, jak i karbonylowanych białek wykrywany jest w komórkach drożdży, które wykonały minimum dziesięć cykli pączkowań [57, 39]. Zaskakujące okazały się również wyniki badań przeprowadzonych z zastosowaniem inhibitorów fosforylacji oksydacyjnej, gdzie *m*-Chlorofenylohydrazon cyjanku karbonylu (CCCP) oraz dinitrofenol (DNP) wykazały odmienne działanie na komórki drożdży. CCCP powodował wzrost RFT oraz skracanie replikacyjnej długości życia, z kolei DNP zmniejszał ilość RFT i wydłużał życie [64, 65]. Błędnie zatem przypuszczano, iż zatrzymanie łańcucha oddechowego miało zapobiegać powstawaniu RFT. Pewne jest jednak, że heterogeniczność stresu oksydacyjnego w populacji z pewnością może się przyczyniać do nierównomiernego starzenia się komórek [57].

## 7. Podsumowanie

Tlen jest pierwiastkiem niezbędnym do życia, lecz nie można zapomnieć o jego ciemniejszej stronie, jaką jest powstawanie RFT. Istnieje wiele źródeł odpowiedzialnych za powstawanie RFT w komórkach. Do najważniejszych zaliczamy mitochondria, w których powstają w trakcie oddychania tlenowego. Istnieją jednak inne źródła indukujące stres oksydacyjny w komórce, które w znacznym stopniu przyczyniają się do starzenia. Mowa tu o działalności enzymatycznej oksydaz NOX, modyfikacji białek w retikulum endoplazmatycznym czy utlenianiu kwasów tłuszczowych przez peroksysomy.

Jak wykazały badania z zastosowaniem mutantów drożdżowych, prawidłowe funkcjonowanie zarówno mitochondriom, jak i peroksysomów jest niezbędne dla odpowiedniego stanu redoks komórki, a jakiegokolwiek zaburzenia w pełnionych przez nie funkcjach sprzyjają powstawaniu stresu oksydacyjnego. Nadal jednak, mimo wielu badań nie można jednoznacznie stwierdzić, czy wzmożone generowanie RFT przez te organelle są główną przyczyną starzenia.

Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* w dużym stopniu przyczyniły się do poszerzenia aktualnej wiedzy na temat starzenia się organizmów eukariotycznych, jak również uszkodzeń spowodowanych przez RFT. W komórkach dochodzi do ciągłego utleniania białek, w skład których wchodzi również enzymy antyoksydacyjne. Peroksydacja lipidów powoduje zmiany przepuszczalności błon biologicznych oraz wtórną produkcję RFT. Ponadto silne oddziaływanie RFT na DNA może powodować mutacje, które mogą w efekcie końcowym być śmiertelne dla komórek drożdży. Jednak jak wykazano, uszkodzenia makrocząsteczek i ich akumulacja nie ma negatywnego wpływu na komórki potomne w modelu replikacyjnego starzenia.

Dzięki przeprowadzonym badaniom z zastosowaniem drożdży *Saccharomyces cerevisiae* udało się zidentyfikować wiele genów odpowiedzialnych za regulację długości życia. Niestety, naukowcy często nie otrzymują jednoznacznych wyników, jak w przypadku badań z zastosowaniem przeciwutleniaczy czy inhibitorów łańcucha oddechowego. Pokazuje to, jak skomplikowana i wielopłaszczyznowa jest zależność powstawania RFT i starzenia się komórek, a jej pełne zrozumienie wymaga

w przyszłości wnikliwych analiz. Z punktu widzenia poznawczego ważne mogą okazać się dokładniejsze analizy zależności między poszczególnymi organellami w komórce, szczególnie pomiędzy ER i mitochondrium oraz ich wzajemnego stymulowania się do wytwarzania RFT. Tego typu analizy mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia, jak RFT wpływają na fizjologię starzejącej się komórki. Warte uwagi mogą okazać się również zmiany stanu redoks poszczególnych kompartmentów w starzejącej się komórce. Nadal więc poszukiwana będzie odpowiedź na pytanie, czy RFT są czynnikami powodującymi starzenie, a może naturalnym następstwem tego zjawiska, a sam model drożdżowy może z pewnością przyczynić się do skutecznego testowania hipotez związanych z teorią wolnorodnikową.

## Literatura

1. Hayflick L., *The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains*, Experimental Cell Research, 37, 1965, 614-636.
2. Kirkwood T.B., *Understanding the odd science of aging*, Cell, 120, 2005, 437-447.
3. Ivanova D.G., Yankova T.M., *The free radical theory of aging in search of a strategy for increasing life span*, Folia Medica, 55, 2013, 33-41.
4. Medvedev Z.A., *An attempt at a rational classification of theories of ageing*, Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society, 65, 1990, 375-398.
5. Harman D., *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*, The Journals of Gerontology, 11, 1956, 298-300.
6. Bolisetty S., Jaimes E.A., *Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology*, International Journal of Molecular Sciences, 14, 2013, 6306-6344.
7. Harman D., *The biologic clock: the mitochondria?*, Journal of the American Geriatrics Society, 20, 1972, 145-714.
8. Jamieson D.J., *Oxidative Stress Responses of the Yeast Saccharomyces cerevisiae*, Yeast, 14, 1998, 1511-1527.
9. Gałęcka E., Mrowicka M., Malinowska K., Gałęcki P., *Wybrane substancje nieenzymatyczne uczestniczące w procesie obrony przed nadmiernym wytwarzaniem wolnych rodników*, Polski Merkuriusz Lekarski, 25, 2008, 269-272.
10. Boveris A., Cadenas E., *Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria*, [w:] Oberley L.W., (red.), *Superoxide dismutases*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1982, 15-30.
11. Strzyżewski K., Pioruńska-Stolzmann M., *Historia wolnorodnikowej teorii starzenia się*, Nowiny Lekarskie, 76, 2007, 193-194.
12. Bratic A., Larsson N.G., *The role of mitochondria in ageing*, Journal of Clinical Investigation, 123, 2013, 951-957.
13. Barja G., *Updating the mitochondrial free radical theory of aging: an integrated view, key aspects, and confounding concepts*, Antioxid Redox Signal, 19, 2013, 1420-1445.
14. Karathia H., Vilaprinio E., Sorribas A., Alves R., *Saccharomyces cerevisiae as a Model Organism: A Comparative Study*, Plos One, 6, 2011, e16015.
15. Harris N., Bachler M., Costa V., Mollapour M., Moradas-Ferreira P., Piper P.W., *Overexpressed Sod1p acts either to reduce or to increase the lifespans and stress resistance of yeast, depending on whether it is Cu(2+)-deficient or an active Cu,Zn-superoxide dismutase*, Aging Cell, 4, 2005, 41-52.
16. Longo V.D., Shadel G.S., Kaerberlein M., Kennedy B., *Replicative and chronological aging in Saccharomyces cerevisiae*, Cell Metabolism, 16, 2012, 18-31.
17. Thorpe G.W., Fong C.S., Alic N., Higgins V.J., Dawes I.W., *Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-*

- stress-response genes*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101, 2004, 6564-6569.
18. Chinnery P.F., Schon E.A., *Mitochondria*, Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry, 74, 2003, 1188-1199.
  19. Greaves L.C., Reeve A.K., Taylor R.W., Turnbull D.M., *Mitochondrial DNA and disease*, The Journal of Pathology, 226, 2012, 274-286.
  20. Ivanova D.G., Yankova T.M., *The free radical theory of aging in search of a strategy for increasing life span*, Folia Medica, 55, 2013, 33-41.
  21. Muller F.L., Liu Y., and Van Remmen H., *Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane*, Journal of Biological Chemistry, 279, 2004, 49064-49073.
  22. Krishnan K.J., Reeve A.K., Samuels D.C., Chinnery P.F., Blackwood J.K., Taylor R.W., Wanrooij S., Spelbrink J.N., Lightowlers R.N., Turnbull D.M., *What causes mitochondrial DNA deletions in human cells?*, Nature Genetics, 40, 2008, 275-279.
  23. Lopez-Otin C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G., *The hallmarks of aging*, Cell, 153, 2013, 1194-1217.
  24. Drummond G.R., Selemidis S., Griendling K.K., Sobey C.G., *Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets*, Nature Reviews Drug Discovery, 10, 2011, 453-471.
  25. Rinnerthaler M., Büttner S., Laun P., Heeren G., Felder T.K., Klinger H., Weinberger M., Stolze K., Grousl T., Hasek J., Benada O., Frydlova I., Klocker A., Simon-Nobbe B., Jansko B., Breitenbach-Koller H., Eisenberg T., Gourlay C.W., Madeo F., Burhans W.C., Breitenbach M., *Yno1p/Aim14p, a NADPH-oxidase ortholog, controls extramitochondrial reactive oxygen species generation, apoptosis, and actin cable formation in yeast*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109, 2012, 8658-63.
  26. Drummond G.R., Selemidis S., Griendling K.K., Sobey C.G., *Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets*, Nature Reviews Drug Discovery, 10, 2011, 453-471.
  27. Nordgren M., Fransen M., *Peroxisomal metabolism and oxidative stress*, Biochimie, 98, 2014, 56-62.
  28. Lodhi I.J., Semenkovich C.F., *Peroxisomes: a nexus for lipid metabolism and cellular signaling*, Cell Metabolism, 19, 2014, 380-392.
  29. Cipolla C.M., Lodhi I.J., *Peroxisomal dysfunction in age-related diseases*, Trends in Endocrinology and Metabolism, 28, 2017, 297-308.
  30. Kawalek A., Lefevre S.D., Veenhuis M., van der Klei I.J., *Peroxisomal catalase deficiency modulates yeast lifespan depending on growth conditions*, Aging, 5, 2013, 67-83.
  31. Ohdate T., Inoue Y., *Involvement of glutathione peroxidase 1 in growth and peroxisome formation in Saccharomyces cerevisiae in oleic acid medium*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids, 1821, 2012, 1295-1305.
  32. Lefevre S.D., Kumar S., van der Klei I.J., *Inhibition of peroxisome fission, but not mitochondrial fission, increases yeast chronological lifespan*, Cell Cycle, 14, 2015, 1698-1703.
  33. Tu B.P., Weissman J.S., *Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences*, Journal of Cell Biology, 164, 2004, 341-346.
  34. Schafer F.Q., Buettner G.R., *Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple*, Free Radical Biology and Medicine, 30, 2001, 1191-1212.

35. Tan S.X., Teo M., Lam Y.T., Dawes I.W., Perrone G.G., *Cu, Zn superoxide dismutase and NADP(H) homeostasis are required for tolerance of endoplasmic reticulum stress in Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular Biology of the Cell*, 20, 2009, 1493-1508.
36. Ponczek M.B., Wachowicz B., *Odziaływanie reaktywnych form tlenu i azotu z białkami*, *Postępy Biochemii*, 51, 2005, 140-145.
37. Choi J., Rees H.D., Weintraub S.T., Levey A.I., Chin L.S., Li L., *Oxidative modifications and aggregation of Cu,Zn-superoxide dismutase associated with Alzheimer and Parkinson diseases*, *Journal of Biological Chemistry*, 280, 2005, 11648-11655.
38. Rodacka A., Gerszon J., Puchała M., *Biologiczne znaczenie oksydacyjnych modyfikacji reszt cysteinowych w białkach na przykładzie dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego*, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* (online), 68, 2014, 280-290.
39. Aguilaniu H., Gustafsson L., Rigoulet M., Nyström T., *Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis*, *Science*, 299, 2003, 1751-1753.
40. Desmyter L., Dewaele S., Reekmans R., Nystrom T., Contreras R., Chen C., *Expression of the human ferritin light chain in a frataxin mutant yeast affects ageing and cell death*, *Experimental Gerontology*, 39, 2004, 707-15.
41. Costa V.M., Amorim M.A., Quintanilha A., Moradas-Ferreira P., *Hydrogen peroxide-induced carbonylation of key metabolic enzymes in Saccharomyces cerevisiae: the involvement of the oxidative stress response regulators Yap1 and Skn7*, *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 2002, 1507-15.
42. Morano K.A., Grant C.M., Moye-Rowley W.S., *The response to heat shock and oxidative stress in Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*, 190, 2012, 1157-95.
43. Ruenwai R., Neiss A., Laoteng K., Vongsangnak W., Dalfard A.B., Cheevadhanarak S., Petranovic D., Nielsen J., *Heterologous production of polyunsaturated fatty acids in Saccharomyces cerevisiae causes a global transcriptional response resulting in reduced proteasomal activity and increased oxidative stress*, *Biotechnology Journal*, 6, 2011, 343-56.
44. Freitas A.A., de Magalhaes J.P., *A review and appraisal of the DNA damage theory of ageing*, *Mutation Research*, 728, 2011, 12-22.
45. Alexeyev M.F., *Is there more to aging than mitochondrial DNA and reactive oxygen species?*, *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 276, 2009, 5768-5787.
46. Gredilla R., *DNA damage and base excision repair in mitochondria and their role in aging*, *Journal of Aging Research*, 2011, 2010, 257093.
47. Chalissery J., Jalal D., Al-Natour Z., Hassan A.H., *Repair of Oxidative DNA Damage in Saccharomyces cerevisiae*, *DNA Repair (Amst)*, 51, 2017, 2-13.
48. Kaeberlein M., Burtner C.R., Kennedy B.K., *Recent developments in yeast aging*, *PLOS Genetics*, 3, 2007, e84.
49. Herker E., Jungwirth H., Lehmann K.A., Maldener C., Frohlich K.U., Wissing S., Buttner S., Fehr M., Sigrist S., Madeo F., *Chronological aging leads to apoptosis in yeast*, *Journal of Cell Biology*, 164, 2004, 501-507.
50. Muller F.L., Lustgarten M.S., Jang Y., Richardson A., Van Remmen H., *Trends in oxidative aging theories*, *Free Radical Biology and Medicine*, 43, 2007, 477-503.
51. Laun P., Rinnerthaler M., Bogengruber E., Heeren G., Breitenbach M., *Yeast as a model for chronological and reproductive aging – a comparison*, *Experimental Gerontology*, 41, 2006, 1208-1212.
52. Erjavec N., Nystrom T., *Sir2p-dependent protein segregation gives rise to a superior reactive oxygen species management in the progeny of Saccharomyces cerevisiae*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 2007, 10877-10881.

53. Liu B., Larsson L., Caballero A., Hao X., Oling D., Grantham J., Nystrom T., *The polarisome is required for segregation and retrograde transport of protein aggregates*, Cell, 140, 2010, 257-267.
54. Jing Y., Ziwei W., Xili L., Hao L., Qi O., *Yeast replicative aging leads to permanent cell cycle arrest in G1 effectuated by the start repressor Whi5*, <https://doi.org/10.1101/353664>, 2018.
55. Nestelbacher R., Laun P., Vondrakova D., Pichova A., Schuller C., Breitenbach M., *The influence of oxygen toxicity on yeast mother cell-specific aging*, Experimental Gerontology 35, 2000, 63-70.
56. Dai D.F., Santana L.F., Vermulst M., Tomazela D.M., Emond M.J., MacCoss M.J., Gollahon K., Martin G.M., Loeb L.A., Ladiges W.C., Rabinovitch P.S., *Overexpression of catalase targeted to mitochondria attenuates murine cardiac aging*, Circulation, 119, 2009, 2789-2797.
57. Lam Y.T., Aung-Htut M.T., Lim Y.L., Yang H., Dawes I.W., *Changes in reactive oxygen species begin early during replicative aging of Saccharomyces cerevisiae cells*, Free Radical Biology and Medicine, 50, 2011, 963-970.
58. Lin Y.J., Seroude L., Benzer S., *Extended life-span and stress resistance in the Drosophila mutant methuselah*, Science, 282, 1998, 943-946.
59. Mesquita A., Weinberger M., Silva A., Sampaio-Marques B., Almeida B., Leao C., Costa V., Rodrigues F., Burhans W.C., Ludovico P., *Caloric restriction or catalase inactivation extends yeast chronological lifespan by inducing H2O2 and superoxide dismutase activity*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107, 2010, 15123-15128.
60. Kennedy B.K., Austriaco N.R., Jr, Zhang J., Guarente L., *Mutation in the silencing gene SIR4 can delay aging in S. cerevisiae*, Cell, 80, 1995, 485-496.
61. Guarente L., *SIR2 and aging – the exception that proves the rule*, Trends in Genetics, 17, 2001, 391-392.
62. Camougrand N., Grelaud-Coq A., Marza E., Priault M., Bessoule J.J., Manon S., *The product of the UTH1 gene, required for Bax-induced cell death in yeast, is involved in the response to rapamycin*, Molecular Microbiology, 47, 2003, 495-506.
63. Leadsham J.E., Sanders G., Giannaki S., Bastow E.L., Hutton R., Naeimi W.R., Breitenbach M., Gourlay C.W., *Loss of cytochrome c oxidase promotes RAS-dependent ROS production from the ER resident NADPH oxidase, Yno1p, in yeast*, Cell Metabolism, 18, 2013, 279-86.
64. Stockl P., Zankl C., Hutter E., Unterluggauer H., Laun P., Heeren G., Bogengruber E., Herndler-Brandstetter D., Breitenbach M., Jansen-Durr P., *Partial uncoupling of oxidative phosphorylation induces premature senescence in human fibroblasts and yeast mother cells*, Free Radical Biology and Medicine, 43, 2007, 947-958.
65. Barros M.H., Bandy B., Tahara E.B., Kowaltowski A.J., *Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Biological Chemistry, 279, 2004, 49883-49888.

## Rola stresu oksydacyjnego w starzeniu się drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

### Streszczenie

Starzenie jest zjawiskiem powszechnym i nieuniknionym u wszystkich organizmów żywych. Ten wielopłaszczyznowy proces prowadzi w efekcie do gromadzenia się wielu uszkodzeń w komórce, zmniejszenia zdolności naprawczych czy upośledzenia funkcji głównych organelli. Konsekwencją tych wydarzeń jest zatrzymanie cyklu komórkowego, a ostatecznie skierowanie komórki na drogę apoptozy.

Jedną z najstarszych i nadal dyskutowanych teorii starzeniowych jest przedstawiona w 1956 roku przez Denhama Harmana teoria wolnorodnikowa, według której uszkodzenia makrocząsteczek spowodowane

działalnością reaktywnych form tlenu (RFT) i ich akumulacja w komórce są głównym determinantem starzenia. Od lat drożdże *Saccharomyces cerevisiae* są dogodnym modelem w badaniach wpływu stresu oksydacyjnego i RFT na komórkę oraz proces starzenia. Wysoka homologia względem wyższych eukariontów, możliwość analizy wyników z dwóch odmiennych modeli starzenia, tj. Replikacyjnego i chronologicznego czy w pełni poznany genom, który dodatkowo może podlegać łatwym modyfikacjom to z pewnością cechy, które przemawiają za dalszym stosowaniem tego modelowego organizmu. Dzięki badaniom z wykorzystaniem właśnie drożdży wykazano, że mitochondria w znacznym stopniu przyczyniają się do starzenia komórek, gdyż są głównym miejscem produkcji RFT. Jednak źródeł tych w komórce jest o wiele więcej niż do tej pory przypuszczano, gdyż RFT mogą powstawać również jako produkt uboczny podczas modyfikacji oksydacyjnej białek czy paradoksalnie nawet podczas działalności antyoksydacyjnej katalazy peroksyosomalnej. Uszkodzenia spowodowane działalnością RFT dotyczą makrocząstek, tj. białek, lipidów oraz najcenniejszego dla komórki DNA. Reakcje oksydacyjne mogą prowadzić do karbonylowania białek, które z kolei mogą tworzyć agregaty trudne do usunięcia przez komórkę. Co ciekawe, w przypadku drożdży agregaty te nie są dziedziczone przez komórki potomne, co ukazuje nam, iż nie są one głównym czynnikiem starzeniowym u tych organizmów. Z kolei pęknięcia obu nici DNA spowodowane działalnością RFT są sygnalizowane jako uszkodzenia związane ze starzeniem, czego efektem jest zatrzymanie cyklu komórkowego. Analizy mutantów delecyjnych *S. cerevisiae* wykazały silną korelację pomiędzy starzeniem a uszkodzeniami spowodowanymi RFT w obydwu modelach starzeniowych. Mimo to nadal otrzymywane są sprzeczne wyniki, w efekcie czego nie można stwierdzić jednoznacznie, że to właśnie działalność RFT jest w głównej mierze odpowiedzialna za starzenie się komórek. Dlatego też tematyka ta wymaga z pewnością dalszych analiz w przyszłości. Pewne jest jednak, że drożdże *S. cerevisiae* mogą w dużym stopniu przyczynić się do rozwiązania odwiecznej zagadki, jaką jest starzenie się komórek i całego organizmu.

Słowa kluczowe: drożdże, stres oksydacyjny, reaktywne formy tlenu, starzenie

## The role of oxidative stress in the aging of *Saccharomyces cerevisiae* yeast

### Abstract

Aging is a phenomenon universal and inevitable for all living organisms. This multi-layered process effectively leads to accumulation of cellular damage, reduction of the cell's repair capability or impairment of the function of the main organelles. As a consequence, the cell cycle is stopped and the cell apoptosis pathway is activated.

One of the earliest – and still debatable – theories of aging is the free radical theory proposed by Denham Harman in 1956. According to that theory, the damage to macromolecules caused by reactive oxygen species (ROS) and accumulation of the damage in the cell are the main determinants of aging. For many years, the *Saccharomyces cerevisiae* yeast has been a convenient model in studies of impact that oxidative stress and ROS have on the cell and the aging process. A high degree of homology with higher eukaryotes, possibility to analyse the results from two different aging models, i.e. the replicative and the chronological model, and the fully sequenced genome, which may be easily modified, are undoubtedly the properties that justify further use of the *S. cerevisiae* yeast as a model organism. Studies with the use of yeast have shown that mitochondria vastly contribute to cell aging as they are the main producer of ROS. However, there are more ROS production sites in the cell than it has been expected so far because ROS may also be generated as a side product during oxidative protein modification or even during anti-oxidative activity of peroxisomal catalase. The damage caused by ROS affects macromolecules, i.e. protein, lipids and the most valuable cellular DNA. Oxidative reactions may lead to protein carbonylation, which in turn may create aggregates that are hard to remove by the cell. Interestingly, in the case of yeast these aggregates are not inherited by the daughter cells, which suggests that they are not the main aging factors in *Saccharomyces cerevisiae*. On the other hand, DNA strand fractures caused by ROS are signalled as aging related damage and result in cell cycle cessation. Analysis of the *S. cerevisiae* deletion mutants showed a strong correlation between aging and damage caused by ROS in both aging models. However, there are still conflicting results with regard to ROS contribution to aging, and thus it is impossible to state with sufficient certainty that ROS activity is chiefly responsible for cell aging. The issue undoubtedly requires further analysis. Nevertheless, it is clear that the *S. cerevisiae* yeast may significantly contribute to the solving of the age-long enigma of aging of cells and multicellular organisms.

Keywords: yeast, oxidative stress, reactive oxygen species, aging

# Wykorzystanie drożdży pączkujących *Saccharomyces cerevisiae* w badaniach nad wpływem restrykcji kalorycznej na aktywność metaboliczną i starzenie komórek

## 1. Wprowadzenie

Pierwsze doniesienie naukowe wskazujące pozytywny wpływ restrykcji kalorycznej na długość życia pochodzi z początku XX wieku. W 1917 roku Osborne i in. opublikowali wyniki badań, w których wykazali, że zmniejszenie spożycia pokarmu przez szczury spowodowało ich wzrost i wydłużyło życie [1]. Jednak dopiero kiedy w 1935 roku McCay i in. przeprowadzili podobny eksperyment, a uzyskane wyniki wyraźnie pokazały, że znaczne ograniczenie spożycia pokarmu przez szczury, w momencie odsadzenia od matki lub wkrótce po odstawieniu od piersi, spowodowało przedłużenie życia, badacze z całego świata zaczęli interesować się wpływem restrykcji kalorycznej na długość życia [2]. Od tego czasu przeprowadzono wiele badań z wykorzystaniem różnych organizmów modelowych. Zaobserwowano, że restrykcja kaloryczna zwiększa zarówno średnią, jak i maksymalną długość życia nie tylko u szczurów, ale także wielu innych gatunków, w tym drożdży, zwierząt bezkręgowych, ryb, myszy, chomików i psów [3].

## 2. Modele starzeniowe drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

Modelem wciąż chętnie wykorzystywanym do badań nad wpływem restrykcji kalorycznej na metabolizm są drożdże piekarnicze *Saccharomyces cerevisiae*. Co najmniej kilka argumentów przemawia na korzyść wyboru właśnie tego organizmu modelowego. Po pierwsze drożdże *S. cerevisiae* szybko rozmnażają się bezpłciowo przez pączkowanie, są proste i tanie w hodowli, a ich obserwacja nie jest skomplikowana. Co więcej, badania prowadzone z wykorzystaniem tych jednokomórkowców nie budzą dylematów etycznych, a także są bezpieczne i nieszkodliwe dla środowiska. Dodatkowo genom *S. cerevisiae* został w pełni zsekwencjonowany, a wiele genów *S. cerevisiae* posiada swojego homologa w komórkach wyższych organizmów eukariotycznych [4]. Jednakże najważniejszym argumentem wspierającym słuszność wyboru drożdży piekarniczych jako modelu do badań nad wpływem restrykcji kalorycznej są opracowane dla tego organizmu dwa akceptowalne modele starzenia. Jako jednokomórkowy organizm modelowy, pączkujące drożdże *S. cerevisiae* pozwalają na odrębne badanie zarówno starzenia mitotycznego, jak i postmitotycznego. Te dwa modele starzenia określane są odpowiednio jako model starzenia replikacyjnego (RLS – ang. *replicative lifespan*) oraz model starzenia chronologicznego (CLS – ang.

---

<sup>1</sup> karolina.stepien89@interia.pl, Zakład Biochemii i Biologii Komórki, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Rzeszowski.

<sup>2</sup> Zakład Biochemii i Biologii Komórki, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Rzeszowski.

*chronological lifespan*) [5]. RLS określa liczbę wyprodukowanych komórek córek, jaką w trakcie swojego życia jest w stanie wyprodukować komórka „matka”. Zakłada się, że badanie RLS daje nam wiedzę na temat procesów starzenia komórek aktywnych mitotycznie [6]. Z kolei CLS definiowany jest jako czas, w którym pojedyncza komórka drożdży może utrzymać żywotność w stanie spoczynkowym, a jednocześnie zachować zdolność do ponownego wejścia w cykl komórkowy po odpowiedniej stymulacji. Przyjmuje się, że CLS dostarcza informacji na temat regulacji długości życia dla komórek post-mitotycznych organizmów wyższych Eukariota [7].

### 3. Restrykcja kaloryczna u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

Wpływ restrykcji kalorycznej na żywotność drożdży *S. cerevisiae* był szeroko badany w obu modelach starzenia. Najczęstszą postacią restrykcji kalorycznej stosowaną u drożdży jest zmniejszenie początkowego stężenia glukozy w pożywce hodowlanej z 2% do 0,5% (restrykcja umiarkowana) lub do 0,05% (restrykcja drastyczna). Restrykcja kaloryczna poprzez redukcję glukozy lub wzrost w nieulegającym fermentacji źródle węgla powoduje wiele zmian fizjologicznych w komórkach drożdży, które zaproponowano jako podstawę wydłużenia zarówno RLS, jak i CLS [8].

### 4. Związek pomiędzy restrykcją kaloryczną, długowiecznością, oddychaniem mitochondrialnym, a aktywacją Sir2

Jedne z pierwszych badań nad restrykcją kaloryczną w modelu drożdżowym sugerowały, że restrykcja kaloryczna zwiększa RLS ze względu na wzrost tempa oddychanie mitochondrialne przy niskim poziomie glukozy. Wspierając tę hipotezę badacze wykazali, że nadekspresja *HAP4* będącego katalityczną podjednostką systemu transkrypcyjnego HAP2/3/4/5, który pozytywnie kontroluje biogenezę mitochondriów i przesuwa metabolizm w kierunku oddychania, zwiększa RLS [9]. Lin i in. w swoich badaniach zaproponowali, że wydłużenie życia przez restrykcję kaloryczną wymaga zależnej od NAD deacetylazy histonowej, czyli białka Sir2 i jednego z dwóch głównych szlaków syntezy NAD. Według badaczy restrykcja kaloryczna powoduje represję rekombinacji w rDNA, spowalniając w ten sposób tworzenie toksycznych pozachromosomalnych kółek rDNA [10]. Zarówno restrykcja kaloryczna, jak i nadekspresja *HAP4* indukują wzrost stosunku NAD<sup>+</sup>/NADH, który służy do aktywacji Sir2, czyli deacetylazy histonowej zależnej od NAD, która pośredniczy w wyciszaniu rDNA, zmniejszając wytwarzanie kółek rDNA. Zgodnie z tym modelem, zależne od Sir2 wydłużenie RLS można osiągnąć przez nadekspresję dwóch składników wahadłowego mitochondrialnego transportu NADH tj. dehydrogenazy jabłczanowej (*Mdh1*) i aminotransferazy asparaginianowej (*Aat1*). W swoich badaniach Easlon i in. wykazali jednak, że nadekspresja zarówno *MDH1*, jak i *AAT1* nie synergizuje z wydłużeniem życia indukowanym restrykcją kaloryczną. Co więcej, wykazali także, że delecja obu genów jednocześnie (*mdh1Δ aat1Δ*) blokuje wydłużenie życia za pośrednictwem restrykcji kalorycznej, a także zapobiega charakterystycznemu zmniejszeniu poziomów NADH w puli cytozolowej sugerując tym samym, że transfer jabłczanu-asparaginianu odgrywa istotną rolę w aktywacji dalszych celów restrykcji kalorycznej, takich jak Sir2 [11]. Alternatywny model aktywacji Sir2 w restrykcji



kalorycznej zaproponowali Medvedik i in. Wykazali oni, że restrykcja kaloryczna może hamować szlak mTOR oraz czynniki transkrypcyjne Msn2/4, zwiększając jednocześnie poziom nikotynoamidazy Pnc1, a tym samym aktywując Sir2 przez obniżenie poziomu jego inhibitora, nikotynamidu [12]. Jednakże znaczenie Sir2 w przedłużeniu życia w warunkach restrykcji kalorycznej zostało zakwestionowane, ponieważ uzyskane przez różne zespoły badawcze wyniki nie były powtarzalne dla wszystkich badanych szczepów. Porównanie wpływu restrykcji kalorycznej dla szczepów BY4742 oraz PSY316 wykazało, że ani zwiększone tempo oddychania komórkowego, ani zwiększony poziom białka Sir2 nie są wymagane do osiągnięcia długowieczności w modelu replikacyjnego starzenia oraz że nikotynamid hamuje wydłużenie RLS w restrykcji kalorycznej poprzez mechanizm niezależny od Sir2 [13]. Uważa się, że akumulacja pozachromosomalnych kółek rDNA jest specyficzna dla starzenia się drożdży, a aktywacja Sir2 reprezentuje mechanizm zapobiegający tworzeniu się kółek rDNA. Reisen i Morgan wykazali jednak, że restrykcja kaloryczna nie wpływa na poziom wyciszania rDNA, lecz raczej zmniejsza poziom wewnętrznej rekombinacji DNA w loci rDNA, w sposób niezależny od Sir2 [14]. Jednakże Lin i Guarente podsumowując w swej pracy doniesienia naukowe argumentują, że niezależnie od Sir2 i niezależnie od oddychania tlenowego wydłużenie życia drożdży *Saccharomyces cerevisiae* hodowanych w warunkach restrykcji kalorycznej może po prostu reprezentować alternatywny mechanizm. Być może dzięki temu niepoznanemu jeszcze mechanizmowi restrykcja kaloryczna może wydłużać życie w pewnych warunkach, w szczególności, że szlak zależny od Sir2 jest ważniejszy w warunkach umiarkowanej restrykcji kalorycznej (0,5% glukozy), podczas gdy szlak niezależny od Sir2 jest ważniejszy przy drastycznej restrykcji kalorycznej (0,05% glukozy) [15].

## **5. Wpływ restrykcji kalorycznej na konserwowane ścieżki sygnałowe mTOR, PKA i Sch9 u drożdży *Saccharomyces cerevisiae***

Podobnie jak wszystkie komórki eukariotyczne, drożdże ewoluowały, aby odpowiednio reagować na sygnały odżywcze ze swojego środowiska poprzez konserwowane ewolucyjnie ścieżki sygnałowe. Te konserwowane czynniki sygnalizacyjne odpowiedzi odżywczej obejmują trzy ważne kinazy: mechanistyczny cel rapamycyny (mTOR, kodowany przez geny TOR1 i TOR2 w drożdżach), aktywowaną przez AMP kinazę białkową A (PKA, kodowaną przez geny TPK1, TPK2 i TPK3 geny) i homolog kinazy rybosomalnej S6, Sch9. Te trzy kinazy oddziałują we wciąż niezupełnie zrozumiałej sieci, aby skoordynować regulację dalszych procesów w odpowiedzi na sygnały żywieniowe i inne sygnały środowiskowe. Dalsze procesy obejmują regulację cyklu komórkowego, translację mRNA, syntezę i degradację białek, metabolizm i funkcję mitochondriów oraz różne czynniki odpowiedzi na stres [16]. Istnieją mocne dowody potwierdzające rolę tych szlaków sygnałowych zarówno w wydłużeniu CLS, jak i RLS. Restrykcja kaloryczna zmniejsza aktywność mTOR, PKA i Sch9, w obu modelach starzenia, a mutacje prowadzące do utraty funkcji w tych kinazach są wystarczające do osiągnięcia długowieczności [17-19]. Uważa się, że mTOR działa zarówno w górę, jak i równoległe do PKA, podczas gdy Sch9 działa na ścieżce równoległej do PKA i mTOR. Kaerberlein i in. wykazali, że restrykcja kaloryczna komórek *tor1Δ* oraz *sch9Δ* nie zwiększyła znacząco długości życia tych mutantów, co

wskazuje, że podobnie jak PKA, Sch9 i TOR są celami restrzykcyjnej kalorycznej w drożdżach [19]. Co więcej, w jednej z wcześniejszych prac również Kaerberlein z zespołem wykazali, że zarówno wzrost przy niskim stężeniu glukozy, jak i mutacje skutkujące zmniejszoną aktywnością PKA, zwiększają żywotność szczepów z dodatkową delecją genu *FOB1* [19, 20]. Usunięcie *TOR1* lub usunięcie *SCH9* spowodowało również addytywny wzrost długości życia w połączeniu z usunięciem *FOB1*. Długa żywotność komórek *sch9Δfob1Δ* oraz *tor1Δfob1Δ* nie była dalej zwiększana w warunkach restrzykcyjnej kalorycznej. Eksperymenty te sugerują zatem, że zmniejszona aktywność kinaz wrażliwych na składniki odżywcze Sch9 i mTOR w odpowiedzi na restrzykcję kaloryczną powoduje zwiększenie długości życia replikacyjnego w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* [19]. Także badania prowadzone w modelu chronologicznego starzenia pokazują, że restrzykcja kaloryczna wydłuża CLS wpływając na konserwowane szlaki zależne od mTOR, PKA i Sch9. Interwencje genetyczne, takie jak delecja *tor1Δ*, *sch9Δ* lub *ras2Δ*, działają w sposób zbliżony do restrzykcyjnej kalorycznej. Mutacje te wydają się działać poprzez te same mechanizmy co restrzykcja kaloryczna, ale ich wpływ na CLS nie jest tak silny w porównaniu z restrzykcją kaloryczną [21]. Wszystkie te interwencje wywołują wzrost oddychania mitochondrialnego i adaptacyjnego sygnalizowania stresu oksydacyjnego podczas wzrostu, obejmującego zwiększone poziomy nadtlenu wodoru [22]. Bonawitz i in. wykazali, że delecja genu *TOR1* przedłuża chronologiczny okres życia u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, głównie na skutek zwiększenia oddychania mitochondrialnego poprzez zwiększoną translację kodowanych przez mtDNA podjednostek kompleksu fosforylacji oksydacyjnej. Ponadto stwierdzili oni, że delecja *TOR1* opóźnia starzenie niezależnie od dysmutazy ponadtlenkowej *Sod2* [23]. Niezależnie od tego, oddychanie mitochondrialne jest niezbędne dla wydłużenia CLS w warunkach restrzykcyjnej kalorycznej lub na skutek delecji genu *TOR1*, ponieważ ich działanie jest zniesione przez interwencje genetyczne i farmakologiczne, które eliminują oddychanie tlenowe podczas wzrostu. Ocampo i in. wykazali, że restrzykcja kaloryczna prowadzi do zwiększonej częstotliwości oddychania mitochondrialnego podczas wzrostu. Jednakże, chociaż szczepy hodowane w warunkach obniżonego stężenia glukozy osiągają fazę stacjonarną w podobnym czasie do komórek podczas wzrostu w warunkach kontrolnych, to po osiągnięciu fazy stacjonarnej częstotliwość oddychania mitochondrialnego radykalnie spada. Ta obserwacja sugeruje, że program przebudowy metabolicznej, który rozpoczyna się od wejścia komórek hodowanych w warunkach restrzykcyjnej kalorycznej do fazy stacjonarnej, zmienia wymóg oddychania podczas chronologicznego starzenia się. Zgodnie z tym efektem farmakologiczne hamowanie oddychania w hodowlach w warunkach restrzykcyjnej kalorycznej podczas fazy stacjonarnej nie wpływa na CLS. Zatem choć zarówno restrzykcja kaloryczna, jak i delecja genu *TOR1* wzmacniają oddychanie mitochondrialne podczas wzrostu, ich wpływ na oddychanie w fazie stacjonarnej jest inny. Komórki rosnące w warunkach restrzykcyjnej kalorycznej są więc mniej zależne od oddychania mitochondrialnego podczas fazy stacjonarnej niż komórki *tor1Δ*, zgodnie z założeniem, że hamowanie *TOR1* jest tylko jednym z mechanizmów przyczyniających się do wpływu restrzykcyjnej kalorycznej na CLS [24]. W ostatnim czasie badacze zainteresowali się także interakcjami między dostępnością glukozy, pH cytozolu (pHc), które u drożdży

*S. cerevisiae* kontroluje wzrost i reaguje na dostępność składników odżywczych oraz centralnym szlakiem sygnalizacji składników odżywczych cAMP zależnym od PKA w modelu chronologicznego starzenia. W swoich badaniach Dolz-Edo i in. donoszą, że obecność wysokiego stężenia glukozy podczas fazy wzrostu zwiększała zakwaszenie po wyczerpaniu glukozy, poprzez modulację aktywności PKA. To aktywnie kontrolowane obniżenie pHc korelowało ze zmniejszonym przetrwaniem w fazie stacjonarnej. Podczas gdy zmiany w aktywności PKA wpływały zarówno na zakwaszenie, jak i przeżycie, ukierunkowane manipulowanie pHc wykazało, że zakwaszenie cytozolowe obniżało PKA. Zatem restrykcja kaloryczna kontroluje przeżycie drożdży w fazie stacjonarnej przez PKA i pH cytozolu [25].

## 6. Podsumowanie

Biorąc pod uwagę złożone zmiany fizjologiczne związane z restrykcją kaloryczną u drożdży można stwierdzić, że uzyskane do tej pory wyniki badań wyraźnie wskazują na istotne znaczenie restrykcji kalorycznej w wydłużaniu życia drożdży *Sacharomyces cerevisiae* zarówno w modelu replikacyjnego, jak i chronologicznego starzenia, a względne znaczenie poszczególnych efektorów restrykcji kalorycznej zależy od specyficznych warunków eksperymentalnych. Ponadto różne komponenty warunkujące wyższą przeżywalność w warunkach restrykcji kalorycznej nakładają się na siebie. Na przykład, hamowanie mTOR lub Sch9 zwiększa oddychanie mitochondrialne, a także indukuje czynniki transkrypcyjne odpowiedzi stresowej, które mogą zwiększyć odporność na śmierć komórkową indukowaną zakwaszeniem [17, 22, 23]. Ponadto chronologiczne starzenie prowadzi do zmniejszenia RLS, co sugeruje podstawowe podobieństwa mechaniczne między mitotyczną i postmitotyczną długością życia w tej samej komórce eukariotycznej [26]. Poza ścieżkami i mechanizmami opisanymi powyżej być może w wydłużeniu RLS lub CLS w warunkach restrykcji kalorycznej zaangażowanych jest więcej dodatkowych genów oraz procesów. Przypuszcza się, że w wydłużanie życia drożdży *S. cerevisiae* w warunkach restrykcji kalorycznej mogą być zaangażowane czynniki przebudowy chromatyny, utrzymanie poziomów komórkowych ATP, autofagia i homeostaza lipidów czy replikacja rDNA. Jednakże określenie związku każdego z nich z ustalonymi mechanizmami długowieczności i ze sobą nawzajem w warunkach restrykcji kalorycznej nadal wymaga dodatkowych badań [16]. Opracowanie jednolitego modelu restrykcji kalorycznej dla drożdży *S. cerevisiae* wbrew pozorom nie jest prostym zadaniem. Czynniki komplikującymi w tej kwestii są różnice w warunkach hodowli między laboratoriami, a także zastosowanie różnych tel genetycznych badanych szczepów [21]. Oczywiście jest, że genotyp odgrywa główną rolę w sposobie, w jaki komórki drożdży reagują na restrykcję kaloryczną. Niektóre genotypy wykazują wyraźnie przedłużenie życia komórek drożdży w warunkach restrykcji kalorycznej, inne nie wykazują różnic w długości życia, a w niektórych dochodzi wręcz do skrócenia długości życia w warunkach restrykcji kalorycznej. Dlatego też określenie różnych mechanizmów wydłużania długości życia w przypadku różnych szczepów drożdży *S. cerevisiae* w warunkach restrykcji kalorycznej nadal wymaga dalszych badań [27]. Jednak chociaż potrzebne są dalsze badania w celu określenia dokładnych mechanizmów, dzięki którym restrykcja kaloryczna wydłuża żywotność w obu

modelach starzenia się drożdży *S. cerevisiae*, wiele z tych mechanizmów wydaje się być konserwowanych także u wielokomórkowych eukariontów [3]. W ostatnich latach zachęteni dotychczasowymi wynikami badań nad wpływem restrykcji kalorycznej na starzenie naukowcy, podjęli także pierwsze próby badania tego zjawiska u ludzi. Zgromadzone dane z badań klinicznych wskazują, że restrykcja kaloryczna u ludzi powoduje niektóre z tych samych adaptacji metabolicznych i molekularnych, które, jak wykazano, poprawiają zdrowie i opóźniają gromadzenie się uszkodzeń molekularnych w innych modelach długowieczności. Między innymi udało się wykazać, że restrykcja kaloryczna u ludzi łagodzi wiele czynników metabolicznych i hormonalnych, które biorą udział w patogenezie cukrzycy typu 2, chorób sercowo-naczyniowych i nowotworów [28].

## Literatura

1. Osborne T.B., Mendel L.B., Ferry L., *The effect of retardation of growth upon the breeding period and duration of life in rats*, Science, 45, 1917, 294-295.
2. McCay C.M., Crowell M.F., Maynard L.A., *The effect of retarded growth upon the length of life and upon the ultimate body size*, The Journal of Nutrition, 10, 1935, 63-79.
3. Masoro E.J., *Overview of caloric restriction and ageing*, Mechanisms of Ageing and Development, Sep126(9), 2005, 913-22.
4. Karathia H., Vilaprinyo E., Sorribas A., Alves R., *Saccharomyces cerevisiae as a Model Organism: A Comparative Study*, PLoSOne, 6(2), 2011, e16015.
5. Longo V.D., Shadel G.S., Kaerberlein M., Kennedy B., *Replicative and chronological aging in Saccharomyces cerevisiae*, Cell Metabolism, 16, 2012, 18-31.
6. Steinkraus K.A., Kaerberlein M., Kennedy B.K., *Replicative aging in yeast: the means to the end*, Annual Review of Cell and Developmental Biology, 24, 2008, 29-54.
7. Fabrizio P., Longo V.D., *The chronological life span of Saccharomyces cerevisiae*, Aging Cell, 2, 2003, 73-81.
8. Wu Z., Liu S.Q., Huang D., *Dietary restriction depends on nutrient composition to extend chronological lifespan in budding yeast Saccharomyces cerevisiae*, PLoS One, May 17, 8(5), 2013, e64448.
9. Lin S.J., Kaerberlein M., Andalis A.A., Sturtz L.A., Defossez P.A., Culotta V.C., Fink G.R., Guarente L., *Calorie restriction extends Saccharomyces cerevisiae lifespan by increasing respiration*, Nature, Jul 18, 418(6895), 2002, 344-8.
10. Lin S.J., Defossez P.A., Guarente L., *Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in Saccharomyces cerevisiae*, Science, Sep 22, 289(5487), 2000, 2126-8.
11. Easlon E., Tsang F., Skinner C., Wang C., Lin S.J., *The malate-aspartate NADH shuttle components are novel metabolic longevity regulators required for calorie restriction-mediated life span extension in yeast*, Genes & Development, 22, 2008, 931-944.
12. Medvedik O., Lamming D.W., Kim K.D., Sinclair D.A., *MSN2 and MSN4 link calorie restriction and TOR to sirtuin-mediated lifespan extension in Saccharomyces cerevisiae*, PLoS Biology, 5, 2007, e261.
13. Kaerberlein M., Hu D., Kerr E.O., Tsuchiya M., Westman E.A., Dang N., Fields S., Kennedy B.K., *Increased life span due to calorie restriction in respiratory – deficient yeast*, PLoS Genetics, 1, 2005, e69.
14. Riesen M., Morgan A., *Calorie restriction reduces rDNA recombination independently of rDNA silencing*, Aging Cell, 8, 2009, 624-632.
15. Lin S.J., Guarente L., *Increased life span due to calorie restriction in respiratory – deficient yeast*, PLoS Genetics, 2, 2006, e33. author reply e34.

16. Kapahi P., Kaerberlein M., Hansen M., *Dietary restriction and lifespan: Lessons from invertebrate models*, Ageing Research Reviews, Oct 39, 2017, 3-14.
17. Fabrizio P., Pozza F., Pletcher S.D., Gendron C.M., Longo V.D., *Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast*, Science, 292, 2001, 288-290.
18. Powers R.W. 3rd, Kaerberlein M., Caldwell S.D., Kennedy B.K., Fields S., *Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling*, Genes & Development, 20, 2006, 174-184.
19. Kaerberlein M., Powers R.W. 3rd, Steffen K.K., Westman E.A., Hu D., Dang N., Kerr E.O., Kirkland K.T., Fields S., Kennedy B.K., *Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients*, Science, 310, 2005, 1193-1196.
20. Kaerberlein M., Kirkland K.T., Fields S., Kennedy B.K., *Sir2-independent life span extension by calorie restriction in yeast*, PLoS Biology, Sep 2(9), 2004, e296.
21. Ruetenik A., Barrientos A., *Dietary restriction, mitochondrial function and aging: from yeast to humans*, Biochimica et Biophysica Acta, Nov1847(11), 2015, 1434-47.
22. Pan Y., *Mitochondria, reactive oxygen species, and chronological aging: a message from yeast*, Experimental Gerontology, Nov 46(11), 2011, 847-52.
23. Bonawitz N.D., Chatenay-Lapointe M., Pan Y., Shadel G.S., *Reduced TOR signaling extends chronological life span via increased respiration and upregulation of mitochondrial gene expression*, Cell Metabolism, 5, 2007, 265-277.
24. Ocampo A., Liu J., Schroeder E.A., Shadel G.S., Barrientos A., *Mitochondrial respiratory thresholds regulate yeast chronological life span and its extension by caloric restriction*, Cell Metabolism, 16, 2012, 55-67.
25. Dolz-Edo L., van der Deen M., Brul S., Smits G.J., *Caloric restriction controls stationary phase survival through Protein Kinase A (PKA) and cytosolic pH*, Aging Cell, Jun18(3), 2019, e12921.
26. Ashrafi K., Sinclair D., Gordon J.I., Guarente L., *Passage through stationary phase advances replicative aging in Saccharomyces cerevisiae*, Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A., 96, 1999, 9100-9105.
27. Schleit J., Johnson S.C., Bennett C.F., Simko M., Trongtham N., Castanza A., Hsieh E.J., Moller R.M., Wasko B.M., Delaney J.R., Sutphin G.L., Carr D., Murakami C.J., Tocchi A., Xian B., Chen W., Yu T., Goswami S., Higgins S., Holmberg M., Jeong K.S., Kim J.R., Klum S., Liao E., Lin M.S., Lo W., Miller H., Olsen B., Peng Z.J., Pollard T., Pradeep P., Pruett D., Rai D., Ros V., Singh M., Spector B.L., Vander Wende H., An E.H., Fletcher M., Jelic M., Rabinovitch P.S., MacCoss M.J., Han J.D., Kennedy B.K., Kaerberlein M., *Molecular mechanisms underlying genotype-dependent responses to dietary restriction*, Aging Cell, 12, 2013, 1050-1061.
28. Most J., Tosti V., Redman L.M., Fontana L., *Calorie restriction in humans: An update*, Ageing Research Reviews, Oct 39, 2017, 36-45.

## **Wykorzystanie drożdży pączkujących Saccharomyces cerevisiae w badaniach nad wpływem restrykcyj kalorycznej na aktywność metaboliczną i starzenie komórek**

### **Streszczenie**

Badania nad wpływem restrykcyj kalorycznej na organizmy żywe trwają nieprzerwanie od początków XX wieku. Jednym z organizmów modelowych wykorzystywanym do badań nad wpływem restrykcyj kalorycznej są drożdże piekarnicze *Saccharomyces cerevisiae*. Opracowane dla tego organizmu dwa modele starzenia, związane z replikacyjną oraz chronologiczną długością życia, oraz fakt, że genom *S. cerevisiae* został w pełni zsekwencjonowany, a wiele genów tego jednokomórkowca posiada swego homologa u wyższych *Eukariota* sprawia, że wyniki uzyskane w badaniach z wykorzystaniem *S. cerevisiae* można z powodzeniem odnieść do wyższych organizmów wielokomórkowych. Dotychczasowe badania

pozwołyły stwierdzić, że restrykcja kaloryczna ma pozytywny wpływ na komórki drożdży *S. cerevisiae* wydłużając ich żywotność w obu modelach starzenia. Pierwsze badania sugerowały, że wydłużenie życia przez restrykcję kaloryczną wymaga zależności od NAD deacetylazy histonowej, czyli białka Sir2. Jednakże znaczenie Sir2 w przedłużeniu życia w warunkach restrykcji kalorycznej zostało w ostatnim czasie zakwestionowane, ponieważ uzyskane przez kolejne zespoły badawcze wyniki nie były powtarzalne dla wszystkich badanych szczepów. Obecnie badacze skłaniają się ku hipotezie, że wydłużenie życia drożdży *S. cerevisiae* hodowanych w warunkach restrykcji kalorycznej reprezentuje alternatywny, niezależny od Sir2 mechanizm, który wciąż jednak pozostaje niewyjaśniony. Wiele prac naukowcy poświęcili także na badanie wpływu restrykcji kalorycznej na konserwowane ścieżki sygnałowe tj. mTOR, PKA i Sch9. Wykazano, że restrykcja kaloryczna zmniejsza aktywność mTOR, PKA i Sch9, w obu modelach starzeniowych, a mutacje prowadzące do utraty funkcji w tych kinazach są wystarczające do przedłużenia długości życia *S. cerevisiae*. Obecnie poszukuje się innych genów oraz szlaków, które potencjalnie mogłyby być zaangażowane w wydłużanie życia drożdży *S. cerevisiae* w warunkach restrykcji kalorycznej. Mimo bardzo licznych doniesień naukowych na temat wpływu restrykcji kalorycznej na długość życia drożdży *S. cerevisiae* tematyka ta wciąż wymaga dalszych badań i stanowi wyzwanie dla współczesnych naukowców.

Słowa kluczowe: restrykcja kaloryczna, *Saccharomyces cerevisiae*, starzenie

## **The *Saccharomyces cerevisiae* yeast as a model for studies of the impact of calorie restriction on metabolic activity and aging**

### **Abstract**

Studies on the impact of calorie restriction on living organisms have been conducted since the beginning of the 20th century. One of the model organisms used in such studies are the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Factors such as two models of aging of the *S. cerevisiae* yeast depending on the replicative or the chronological length of life, the yeast's fully sequenced genome and homologues with higher eukaryotes contribute to translatability of the results obtained from studies on *S. cerevisiae* to higher multicellular organisms. So far the research has shown that calorie restriction has positive impact on the *S. cerevisiae* yeast cells extending lives of the cells in both aging models. Initial studies suggested that extension of life by calorie restriction requires NAD-dependent histone deacetylase, or the Sir2 protein. However, the significance of Sir2 for the extension of life under calorie restriction conditions were challenged as the results obtained by subsequent research teams were not repeatable for all tested strains. Nowadays researchers tend to support the hypothesis that prolongation of the life of the *S. cerevisiae* yeast cultured in calorie restriction conditions represents an alternative mechanism independent of Sir2; however, the mechanism has not yet been fully explained. There have been many studies on the impact of calorie restriction on the conserved signalling pathways, i.e. mTOR, PKA and Sch9. It has been demonstrated that calorie restriction reduces the activity of mTOR, PKA and Sch9 for both aging models, and that mutations leading to the loss of function in those kinases are sufficient for extending the length of life of *S. cerevisiae*. Other genes and pathways that may potentially be involved in prolongation of the life of the *S. cerevisiae* yeast under the calorie restriction conditions are still being sought. Despite numerous scientific reports on the impact of caloric restriction on the length of life of *S. cerevisiae*, the issue requires further research and poses a challenge to the scientists of today.

Keywords: caloric restriction, *Saccharomyces cerevisiae*, aging

## Azole w terapii grzybic – charakterystyka i mechanizmy oporności

### 1. Wstęp

Grzybice są schorzeniami bardzo powszechnymi. Wg szacunkowych danych na grzybice choruje ponad miliard ludzi [1]. Mimo to przez wiele lat rozwój badań nad preparatami przeciwgrzybiczymi przebiegał w cieniu badań nad lekami przeciwbakteryjnymi. Dostępnych jest tylko pięć klas związków przeciwgrzybiczych, natomiast wśród środków przeciwbakteryjnych można wyróżnić ponad dwadzieścia różnych grup. Najczęściej stosowanymi środkami przeciwgrzybiczymi, szczególnie w leczeniu miejscowych zakażeń grzybiczych, są znane od lat 40. ubiegłego wieku leki z grupy azoli [2]. Zgodnie z danymi przedstawionymi przez Centers for Medicare & Medicaid Services, w Stanach Zjednoczonych w latach 1991-2009 znalazły się one na ok. 74 mln recept. W ciągu 18 lat pacjenci w USA wydali na leki azolowe ok. 2,7 mld dolarów [3]. Azole są skuteczne względem większości grzybów patogennych dla człowieka. Ponadto, niektóre wykazują działanie przeciwbakteryjne i przeciwprzywrotniakowe [4]. Najczęściej stosowanymi azolami w terapii grzybic są: flukonazol, itraconazol, worykonazol, posakonazol, klotrimazol oraz ketokonazol [3]. Są to leki pierwszego wyboru w profilaktyce i leczeniu grzybic. Obecnie azole uważa się za najskuteczniejsze syntetyczne leki przeciwgrzybicze [5], chociaż coraz częściej zauważa się wyraźną tendencję do obniżenia wrażliwości i pojawianie się szczepów opornych na tę grupę leków.

Celem pracy jest opis leków z grupy azoli, z uwzględnieniem ich struktury i mechanizmu działania oraz wskazanie procesów, które warunkują oporność grzybów na te leki.

### 2. Budowa i klasyfikacja leków azolowych

Azole są heterocyklicznymi aromatycznymi związkami organicznymi, zawierającymi przynajmniej jeden atom azotu [6]. Są związkami chemicznymi uzyskanymi na drodze syntetycznej. Dzieli się je na imidazole i triazole. Podział ten wynika z różnic w liczbie atomów azotu w pierścieniu azolowym. Imidazole zawierają 2 atomy azotu w pierścieniu, natomiast triazole – 3 atomy azotu [7, rysunek 1].

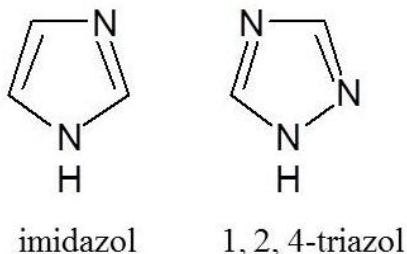
<sup>1</sup> m.siemieniuk@uwb.edu.pl, Zakład Cytobiochemii, Instytut Biologii, Wydział Biologiczno-Chemiczny, Uniwersytet w Białymstoku, www. uwb.edu.pl.

<sup>2</sup> ewagrabowska5@o2.pl, Zakład Cytobiochemii, Instytut Biologii, Wydział Biologiczno-Chemiczny, Uniwersytet w Białymstoku, www. uwb.edu.pl.

<sup>3</sup> urszula.czyzewska@uwb.edu.pl, Zakład Cytobiochemii, Instytut Biologii, Wydział Biologiczno-Chemiczny, Uniwersytet w Białymstoku, www. uwb.edu.pl

<sup>4</sup> a.zambrzycka@uwb.edu.pl, Zakład Cytobiochemii, Instytut Biologii, Wydział Biologiczno-Chemiczny, Uniwersytet w Białymstoku, www. uwb.edu.pl.

<sup>5</sup> atyl@uwb.edu.pl, Zakład Cytobiochemii, Instytut Biologii, Wydział Biologiczno-Chemiczny, Uniwersytet w Białymstoku, www. uwb.edu.pl.

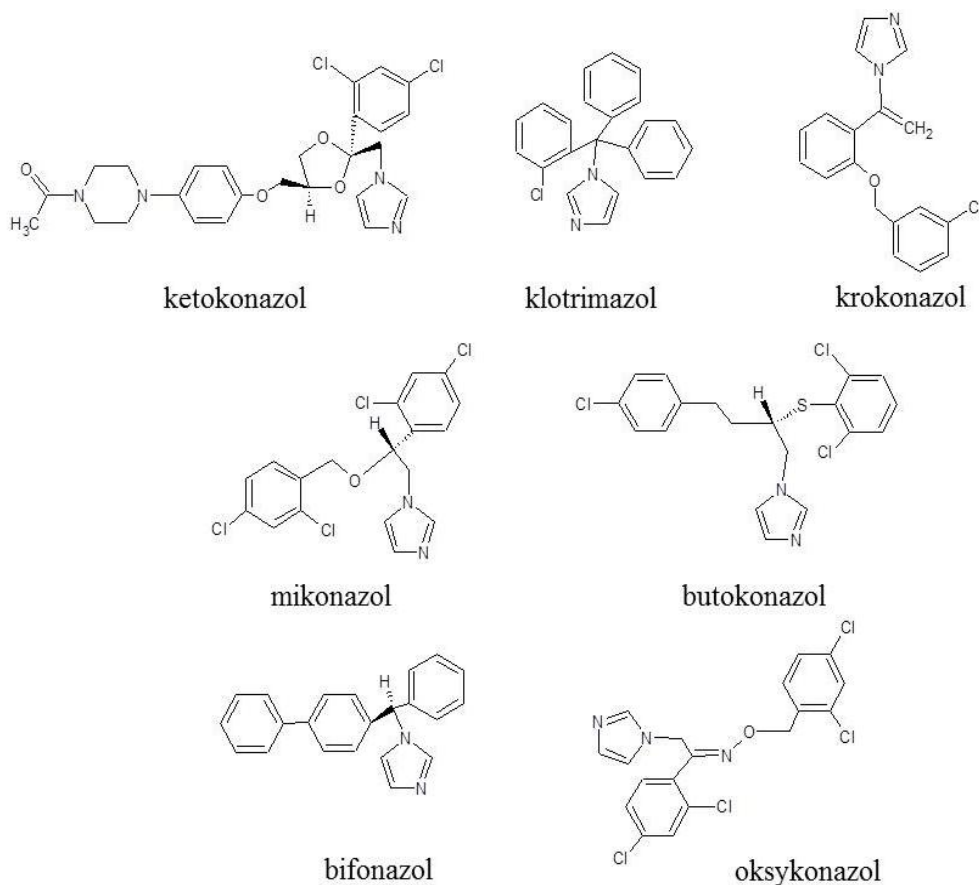


Rysunek 1. Chemiczna struktura pierścieni azolowych imidazoli i triazoli [opracowanie własne]

## 2.1. Charakterystyka pochodnych imidazolowych

Imidazole wykazują szeroki zakres działania, który obejmuje większość grzybów patogennych. Należą do nich takie związki jak klotrimazol, bifonazol, mikonazol, ketokonazol, oksykonazol, krokonazol i butokonazol [rysunek 2]. Większość imidazoli stosowana jest w postaci łatwo rozpuszczalnych azotanów [7]. Są one dostępne w różnych postaciach farmaceutycznych m.in. w postaci kremów, maści, zasypek, płynów, tabletek i globulek dopochwowych. Klotrimazol jest stosowany w miejscowym leczeniu grzybicy stóp, łupieżu, grzybicy skóry gładkiej wywołanych przez *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Candida albicans* lub *Malassezia furfur* [8, 9]. Z kolei podobny w strukturze do klotrimazolu – bifonazol jest używany, wtedy gdy czynnikiem etiologicznym zakażenia są *Dermatophytes*, *Malassezia furfur* oraz *Aspergillus spp.* [4]. Mikonazol z pochodnymi mają podobny zakres działania do bifonazolu i klotrimazolu. Są stosowane głównie miejscowo w postaci kremów, pudrów lub globulek dopochwowych [7]. Kolejnym lekiem z grupy imidazoli jest ketokonazol, który może być podawany doustnie lub powierzchniowo w leczeniu grzybic skóry, włosów i paznokci wywołanych przez dermatofity i drożdżaki (dermatomikozy, łupież pstry, przewlekłe kandydozy błon śluzowych, drożdżycę jamy ustnej i przewodu pokarmowego, przewlekłe nawracające drożdżycę pochwy) i grzybic układowych (kandydoza, histoplazmoza, blastomikoza, kokcydiodomikoza) [10]. Gatunki grzybów, które zwalcza ketokonazol to: *Blastomyces dermatidis*, *Candida spp.*, *Coccidioides immitis*, *Epidermophyton floccosum*, *Histoplasma capsulatum*, *Malassezia spp.*, *Microsporum canis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Aspergillus spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Sporothrix schenckii*, a także pierwotniaki oraz niektóre bakterie Gram-dodatnie. Podobnie szeroki zakres działania ma oksykonazol, który działa grzybobójczo, a w dużych stężeniach grzybobójczo. Skuteczność oksykonazolu została potwierdzona w badaniach *in vitro* względem *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton menta-grophytes*, *Trichophyton rubrum* oraz *Malassezia farfur*. Następnym imidazolem jest krokonazol stosowany miejscowo w postaci kremu na grzybice wywołane przez drożdżaki i dermatofity. Skutecznie działa również w leczeniu łupieżu pstrego. Butokonazol natomiast jest używany w leczeniu kandydozy pochwy oraz sromu i wykazuje działanie przeciwgrzybicze podobne do ketokonazolu [4].





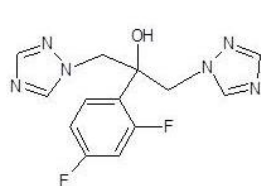
Rysunek 2. Wzory strukturalne wybranych imidazoli, opracowanie własne na podstawie [4]

## 2.2. Charakterystyka pochodnych triazolowych

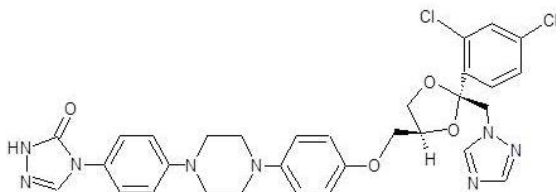
Związki triazolowe cechują się szerszym spektrum działania w porównaniu z imidazolami. Są również bezpieczniejsze niż pochodne imidazolowe, ponieważ wykazują większe powinowactwo do 14- $\alpha$ -demetylasy lanosterolu – docelowego enzymu blokowanego przez azole podczas inwazji patogenu. Cechują się lepszą biodostępnością po podaniu doustnym oraz lepszymi właściwościami farmakodynamicznymi [11]. Przedstawicielami leków należących do grupy triazoli są itrakonazol, flukonazol, worykonazol i posakonazol [rysunek 3].

Itrakonazol powstał w wyniku modyfikacji cząsteczki ketokonazolu, w której pierścień imidazolowy został zastąpiony triazolowym. Otrzymano w ten sposób związek, który wykazał kilkukrotnie silniejsze działanie przeciwgrzybicze od ketokonazolu [7]. Itrakonazol wykazuje szeroki zakres działania i jest stosowany zarówno w leczeniu grzybic układowych, jak i powierzchniowych. Jest skuteczny w leczeniu grzybic paznokci, ponieważ przenika warstwy zrogowaciałe naskórka i gromadzi się w keratynie paznokci. Itrakonazol pomaga także w leczeniu łupieżu pstrego oraz grzybiczych zakażeń narządów płciowych [4]. Jest aktywny względem *Candida*

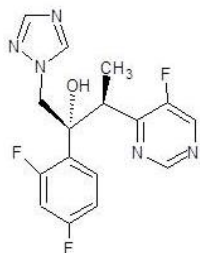
*albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Blastomyces dermatidis*, *Coccidioides immitis* oraz *Histoplasma capsulatum* [12]. Kolejnym lekiem z grupy triazoli jest flukonazol, który jest bardzo dobrze rozpuszczalny w wodzie. Może być podawany zarówno dożylnie, jak i doustnie. Flukonazol jest dobrze tolerowanym azolem dlatego jako pochodna triazolowa, należy do najpowszechniej stosowanych doustnych leków przeciwgrzybiczych. W jego spektrum działania znajdują się głównie grzyby z rodzaju *Candida*, z wyjątkiem gatunków opornych na ten lek, tj. *Candida krusei*. Oporne na flukonazol są również *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. oraz *Mucorales* [12]. Jednym z najnowszych leków z grupy triazoli jest worykonazol, który można traktować jako pochodną flukonazolu, ponieważ jeden pierścień triazolowy zastąpiono tu pierścieniem 5-fluoropirymidynowym. Jest on stosowany miejscowo, dożylnie oraz doustnie [7]. Udowodniona została skuteczność worykonazolu wobec szczepów *Acremonium* spp, *Alternaria* spp., *Cladophialophora* spp. i *Histoplasma capsulatum*. W badaniach klinicznych wykazano skuteczność worykonazolu wobec gatunków z rodzaju *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* i *C. tropicalis* oraz *Aspergillus*, w tym *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. nidulans*, a także szczepów *Fusarium* i *Scedosporium*, w tym *S. apiospermum* i *S. prolificans*. W związku z tym jest aktywny względem grzybów opornych na flukonazol [13]. Kolejnym, stosunkowo nowym lekiem azolowym jest posakonazol – triazol drugiej generacji. Posakonazol wykorzystuje się w leczeniu ciężkich infekcji grzybiczych niewrażliwych na inne leki, w tym amfotrycynę B lub u pacjentów źle tolerujących inne leki przeciwgrzybicze. Stwierdzono, że posakonazol wykazuje aktywność wobec *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Blastomyces dermatidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Mucorales* [2]. Posakonazol działa też na *Candida* spp. oporne na flukonazol lub itrakonazol, *Aspergillus fumigatus* oporne na itrakonazol, worykonazol, amfoterycynę B oraz na *Cryptococcus neoformans* i *Zygomycetes* spp. oporne na flukonazol. Okazało się również, że posakonazol silniej hamuje demetylację steroli w błonie komórkowej grzyba niż poprzednie generacje leków azolowych [10]. Do grupy triazoli należą także rawukonazol, albakonazol i izawukonazol, które są obecnie przedmiotem badań klinicznych i nie zostały jeszcze wprowadzone na rynek farmaceutyczny [11].



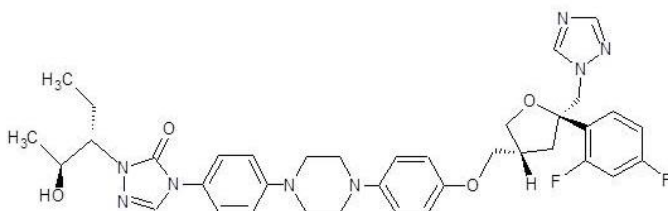
flukonazol



itrakonazol



worykonazol

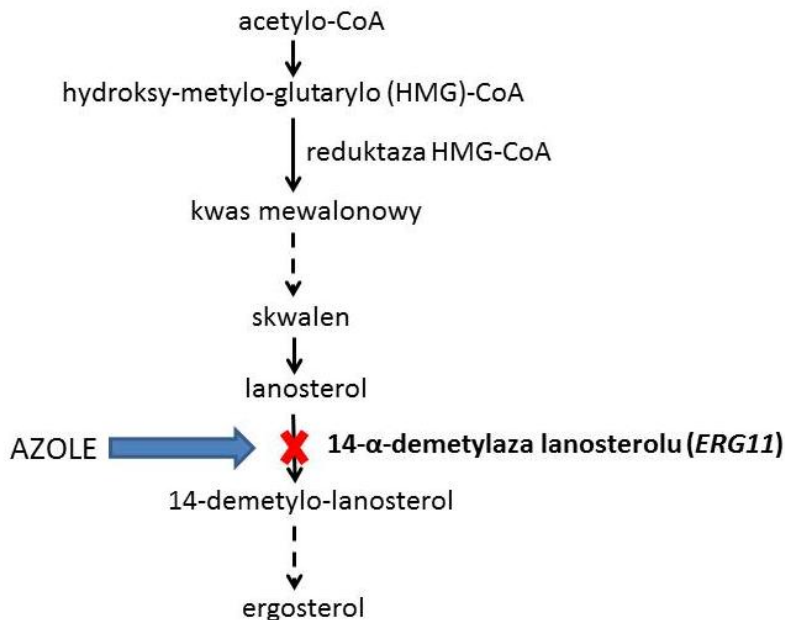


posakonazol

Rysunek 3. Wzory strukturalne wybranych triazoli, opracowanie własne na podstawie [4]

### 2.3. Przeciwgrzybiczy mechanizm działania azoli

Przeciwgrzybiczy mechanizm działania wszystkich azoli opiera się na hamowaniu grzybowego cytochromu P450 z rodziny 51 (CYP51 lub 14- $\alpha$ -demetylaza lanosterolu), który jest niezbędny do biosyntezy ergosterolu, czyli głównego sterolu błony komórkowej grzybów [14]. Atom azotu z cząsteczki azolu wiąże się z żelazem hemu cytochromu P450 hamując demetylację lanosterolu [rysunek 4]. Wskutek tego zawartość ergosterolu w błonie komórkowej grzyba zmniejsza się oraz dochodzi do kumulacji destabilizującego błonę produktu pośredniego – 14- $\alpha$ -metylo-3,6-diolu [4]. Zmiany w zawartości ergosterolu wpływają na płynność i integralność błony komórkowej grzyba. Zmieniają także aktywność związanych z błoną enzymów np. syntazy chitynowej [14]. Następstwem są zaburzenia czynności błony komórkowej i zahamowanie wzrostu komórek grzybów. W efekcie działania azoli komórki grzybów wolniej się namnażają i stają się bardziej podatne na fagocytozę [4]. Kumulacja w komórkach grzybów 14- $\alpha$ -metylo-3,6-diolu powoduje ponadto hamowanie transformacji morfogenetycznej drożdżaków do formy strzępkowej i uszkodzenia fosfolipidów błony komórkowej [15]. Ostatecznym rezultatem działania azoli jest liza komórek i śmierć grzyba [14].



Rysunek 4. Mechanizm hamowania syntezy ergosterolu przez azole w mewalonowym szlaku syntezy steroli, opracowanie własne na podstawie [16]

X – miejsce hamowania syntezy ergosterolu

### 3. Mechanizmy oporności grzybów na azole

Grzyby, jako mikroorganizmy, które poddawane są działaniu leków stanowiących swego rodzaju czynnik selekcyjny, mogą wykształcić brak wrażliwości wobec stosowanych leków. Zjawisko to może wynikać ze świadomego działania ludzi (stosowanie leków w trakcie zwalczania infekcji), jak również w wyniku niekontrolowanego wprowadzania związków grzybobójczych do środowiska [17, 18]. Nawet niewielkie stężenia leków w środowisku, w dłuższej perspektywie, mogą stanowić czynnik selekcyjujący szczepy odporne z ogólnej puli genowej.

Wrażliwość grzybów poddanych działaniu związków toksycznych zależy głównie od braku lub obecności szlaku metabolicznego wrażliwego na dany lek, jak również ilości struktur odpowiadających za jego pobieranie, transportowanie, metabolizm czy akumulację [19]. To, jaki mechanizm oporności zostanie uruchomiony, zależy głównie od czynnika, którym działamy na komórki. Wiele mechanizmów jest wspólnych dla wszystkich obecnie dostępnych grup leków. Wśród głównych mechanizmów, które leżą u podłoża oporności na związki azolowe, można wymienić obecność transporterów wielolekowych (na terenie cytoplazmy, w błonie komórkowej czy w mitochondriach), takich jak transportery typu ABC (transportery I-rzędowe, energia pozyskiwana na drodze hydrolizy ATP) oraz typu MFS (transportery II-rzędowe, energia pozyskiwana z gradientu stężeń protonów przechodzących w poprzek błony komórkowej). Ponadto, grzyby mogą zwiększać biosyntezę enzymu docelowego dla leku (np. 14- $\alpha$ -demetylasy lanosterolu), modyfikować cel działania leku, zmieniać

strukturę barier otaczających komórkę (zmniejszona zawartość ergosterolu, reorientacja lub maskowanie tego związku czy zmiany zawartości steroli w błonie komórkowej), jak również mogą one tworzyć biofilmy [20-23]. Ponadto, wykazano zwiększoną oporność grzybów na działanie azoli w wyniku modyfikacji ekspresji wybranych genów, przykładowo *ERG3* [17]. Nadmienić należy, że niektóre z wymienionych mechanizmów oporności u grzybów pojawić się mogą nie tylko w kontakcie z lekami, ale również jako efekt naturalnych strategii obronnych wobec związków produkowanych przez bakterie czy inne organizmy zajmujące tę samą niszę ekologiczną [19].

### 3.1. Nadekspresja genów oraz zmiany genetyczne

Nadekspresja dotyczy szerokiej gamy genów. Przede wszystkim wyróżnić można nadekspresję genów kodujących cel działania leków, genów kodujących transportery błonowe, jak również genów kodujących czynniki transkrypcyjne wpływające na ekspresję innych genów. Przykładem jest nadekspresja genu *ERG11* u *Candida* spp. (u rodzaju *Aspergillus* – *CYP51A*), kodującego 14- $\alpha$ -demetylazę lanosterolu. Dzięki temu zjawisku możliwe jest pojawienie się mniejszej podatności grzybów na działanie azoli. Jest to zjawisko, które w dużej mierze odpowiada za oporność krzyżową (flukonazol i itraconazol) [24, 25]. Podwyższenie poziomu biosyntezy enzymu docelowego dla leku powoduje bezpośrednie zmniejszenie efektu terapeutycznego i konieczność zwiększenia dawki danego leku. Nadekspresja genów dotyczy zarówno białek enzymatycznych, jak i transporterów błonowych. Zjawisko to związane jest m.in. z mutacjami w obrębie czynników transkrypcyjnych (*Mrr1* i *Tac1* u *C. albicans*) odpowiadających za regulację transkrypcji transporterów błonowych. Mechanizm ten ma znaczący udział w kształtowaniu oporności *C. parapsilosis* na flukonazol [26]. Zmiany aminokwasów w białku kodowanym przez gen *ERG3* wpływają na ekspresję innych genów, m.in. genów kodujących czynniki transkrypcyjne (*UPC2*, *NDT80*). Wykazano, iż delecje genów odpowiadających za czynniki transkrypcyjne wpływają bezpośrednio na zwiększenie się wrażliwości na azole. W badaniach na *C. parapsilosis* wykazano, iż usunięcie genu *UPC2* u szczepów opornych na te leki, zmniejszyło ekspresję genów *ERG25*, co w konsekwencji wpłynęło na zwiększenie wrażliwości tych grzybów na azole. Ponadto, delecja genu *NDT80* u badanych drożdży powodowała zwiększenie wrażliwości na niektóre azole oraz znacznie zmniejszała ekspresję genów (*ERG25*, *ERG6*, *ERG2*, *ERG3*, *ERG4*), których produkty są niezbędne w biosyntezie ergosterolu [26].

Plastyczność ekspresji informacji genetycznej jest wykazywana zazwyczaj w wyniku działania czynników stresowych (stres oksydacyjny, wysoka temperatura czy działanie leków grzybobójczych) [27]. Podkreślić należy, że występowanie zmian w obrębie chromosomów wpływa na oporność nie tylko na azole, ale również na inne stresory [28]. Zmiany na poziomie genomu dotyczą utraty heterozygotyczności, zwiększenia liczby chromosomów czy pojawienie się form izochromosomalnych. W efekcie następują zmiany na poziomie ekspresji genów leżących na chromosomach ulegających zmianom [17]. W przypadku *C. albicans* jednym z mechanizmów dotyczących zmian genetycznych jest powstawanie duplikacji lewego ramienia chromosomu 5, wskutek czego następuje duplikacja zlokalizowanych tam genów

(m.in. *ERG11* oraz *TAC1*). Wykazano, iż mutacja ta wpływa na zmniejszenie wrażliwości grzybów na azole [27, 29, 30]. Ciekawym zjawiskiem jest utrata heterozygotyczności (LOH). Dotyczy ona przede wszystkim genów *ERG11*, *TAC1* oraz *MRR1*. W przeprowadzonych badaniach na klinicznych szczepach *C. albicans*, które charakteryzowały się disomią lub monosomią chromosomu 5 wykazano, iż szczepy z mutacją posiadają m.in. niższą zawartość ergosterolu w błonie komórkowej, co wpływało na zwiększoną wrażliwość na flukonazol [28, 31]. U *Cryptococcus neoformans* zaobserwowano korelację zwiększenia oporności na azole dzięki zjawisku disomii chromosomu 1 oraz 4. Na chromosomach tych zlokalizowane są geny *ERG11* oraz *AFR1* (kodujący transporter ABC). Ponadto, oporność wielolekowa u tych grzybów może wystąpić wskutek duplikacji całych chromosomów [28, 32].

### 3.2. Transportery błonowe

Transportery błonowe pełnią ważną funkcję w budowaniu się oporności na antymikotyki. Białka te posiadają właściwości sekrecyjne, dzięki którym związki działające grzybobójczo usuwane są z komórki do środowiska. Zjawisko to znane jest od ponad 30 lat, a przez wielu uważane jest za najbardziej znaczące w kwestii budowania lekooporności [19, 27, 33]. Mechanizm działania transporterów błonowych opisywany jest na podstawie 3 modeli. Pierwszy z nich zakłada wyrzucanie leków z cytoplazmy poprzez por fazy wodnej (*ang. aqueous pore model*), drugi model zakłada transport antymikotyków, zanim ich cząsteczki przenikną do cytoplazmy (model flipazy, *ang. flippase model*; przeniesienie ich z wewnętrznej do zewnętrznej warstwy błony komórkowej). Zasada mechanizmu działania trzeciego modelu bazuje na hydrofobowych właściwościach cząsteczek leku. Są one transportowane do cytoplazmatycznej warstwy błony komórkowej i stamtąd „wysysane” przez białka, które następnie wyrzucają cząsteczki na zewnątrz. Ten model określa się mianem „molekularnego odkurzacza” (*ang. hydrophobic vacuum cleaner model*) [21]. Obecnie przyjmuje się, że wszystkie 3 modele są prawdziwe oraz że wobec jednego leku transport na zewnątrz komórki może przebiegać na jeden, lub więcej sposobów [21]. Za transportery biorące udział w budowaniu się oporności na leki, uznaje się białka ABC oraz MFS. W badaniach wykonanych na drożdżach wykazano obecność ponad 30 genów transporterów ABC. Ze względu na podobieństwo sekwencji, białka ABC, stwierdzone u *S. cerevisiae*, podzielono na 6 podrodzin: YEF3, PDR, MDR, MRP/CFTR, RLI, ALDP [21, 23]. Białkami, które odpowiadają za zjawisko lekooporności, są m.in. te należące do podrodziny PDR (*ang. pleiotropic drug resistance*). Wśród nich wyróżniono przede wszystkim transporter Pdr5p, kodowany przez gen *PDR5*. Jest to pierwsze zidentyfikowane białko transportowe u *S. cerevisiae*, które jest homologiczne do ludzkiego białka Mdr1p [21, 23]. Zakres substratowy tych zlokalizowanych w błonie komórkowej transporterów jest bardzo szeroki, obejmuje on detergenty, jonofory, fungicydy, antybiotyki, jak również leki przeciwnowotworowe. Co więcej, badania wykazały, że gen *PDR5* nie jest niezbędny komórkom do życia, jednak jego brak może powodować o wiele wyższą wrażliwość na różnego typu inhibitory. Uznaje się, iż poziom tego białka w komórce ma duży wpływ na oporność grzybów na azole [23].

Pierwszym białkiem z grupy transporterów błonowych typu ABC u *C. albicans*, które zidentyfikowano u szczepów patogennych było białko Cdr1p. Wśród substratów

przenoszonych przez tę pompę są między innymi syntetyczne związki grzybobójcze, takie jak ketokonazol, itraconazol czy flukonazol. Białko to kodowane jest przez gen *CDR1*. Budowa tej cząsteczki jest podobna do białka Pdr5p u *S. cerevisiae*, jednak oba gatunki reagują w różny sposób na powielenie lub podzielenie genu czy delecję części łańcucha polipeptydowego białka [23].

Drugą, ważną grupą transporterów, które odgrywają rolę w kształtowaniu oporności, jest grupa białek MFS. Najlepiej poznanym do tej pory transporterem tej grupy jest białko Atr1p odpowiadające za pojawienie się oporności na amino triazol u *S. cerevisiae* [23]. Nie posiadają one zdolności hydrolizy ATP [21, 23]. U *C. albicans* wyróżnia się obecnie ponad 120 różnych transporterów, z czego w kształtowaniu lekooporności na azole największe znaczenie mają transportery Cdr1 i Cdr2 (transportery I-rzędowe), oraz Mdr1 (transportery II-rzędowe). W przypadku *C. glabrata* na ponad 50 obecnie znanych transporterów, przyjmuje się, że jedynie trzy biorą udział w ograniczaniu podatności na te leki (CgCdr1, CgCdr2, CgSnq2) [27]. U *Aspergillus fumigatus* ekspresja genów kodujących białka ABC zwiększa się w wyniku kontaktu z azolami (np. geny *AfuMDR1*, *AfuMDR2*, odpowiadające za syntezę transporterów błonowych). U niektórych mutantów *A. fumigatus* zaobserwowano regulację stężenia itraconazolu w komórkach dzięki transporterom kodowanym przez gen *AfuMDR3* [28].

### 3.3. Zmiany strukturalne 14- $\alpha$ -demetylazy lanosterolu

Zmiana struktury enzymów, które są celem działania leków, są często spotykanym mechanizmem oporności. W wyniku tego białko jest zmodyfikowane tak, aby katalizowało odpowiednią reakcję przy jednoczesnym ograniczeniu powinowactwa do leku [23]. Zmiany strukturalne dotyczą substytucji aminokwasów. W zależności od gatunku, jak również szczepu, zmiany te dotyczą różnych miejsc cząsteczki enzymu. U szczepów *Candida*, które wykazywały oporność na azole, wykazano obecność około 140 substytucji. Najczęściej wykazywaną zmianą u *C. albicans* są substytucje w pobliżu miejsca przyłączającego hem (R467K i G464S) [34]. W przypadku *A. fumigatus* wykazano obecność ponad 30 mutacji w obrębie genu *CYP51A*. Najczęstsze substytucje u tych grzybów wykazano w obrębie kodonu 54 oraz kodonu 220 substytucje. Badania wskazują, iż miejsca te wpływają na oporność wobec wielu azoli, ze względu na niemożliwość przyłączania się do nich cząsteczek antymikotyków [34]. Co ciekawe, u niektórych grzybów obok mutacji w obrębie genu *ERG11*, przy badaniach oporności na leki stwierdza się również nadekspresję genów kodujących transportery błonowe [28]. Ponadto zaobserwowano korelację poziomu oporności grzybów ze spektrum działania antymikotyku. Im węższe spektrum, tym silniej wykazywana jest oporność na leki [28].

### 3.4. Tworzenie biofilmów

Tworzenie biofilmów jest jednym z mechanizmów zmniejszania się podatności grzybów na antymikotyki. Struktura ta charakteryzuje się przede wszystkim wielowarstwowością, różnymi właściwościami metabolicznymi grzybów w przekroju pionowym, jak również wydzielaniem szeregu związków chemicznych, określanych mianem matrix zewnątrzkomórkowego, którego skład może mieć znaczenie dla

wrażliwości biofilmu na antybiotyki [28]. Ponadto, określona struktura biofilmu pozwala na kontrolę ekspresji genów w populacji komórek [35]. Analizy oporności biofilmu grzybowego wyraźnie wskazują na mniejszą wrażliwość tych struktur na leki w porównaniu do komórek nietworzących biofilmu [35]. Główną przyczyną zwiększonej oporności na leki grzybów tworzących biofilm, jest wydzielanie przez nie związków zewnątrzkomórkowych. Ich główną rolą jest zwiększenie przyczepności biofilmu do podłoża, jak również ochrona przed działaniem czynników zewnętrznych oraz zmniejszenie utraty wody czy składników odżywczych [36]. Martix zewnątrzkomórkowa pełni znaczącą funkcję przede wszystkim w kształtowaniu oporności na polieny oraz echinokandyny, jednak może również mieć znaczenie w zmniejszającej się podatności grzybów na azole oraz inne antymikotyki. Obecnie uznaje się, iż wrażliwość biofilmu na działanie leków zależy głównie od składu chemicznego (bogactwo polimerów glukanu zatrzymuje cząsteczki leku nie pozwalając na przemieszczenie ich do wnętrza komórek [17, 35]). Oprócz mechanicznego utrudnienia dostępu leków do komórek grzybów, tworzenie biofilmu indukuje ekspresję genów kodujących transportery błonowe. Badania wskazują, że rola tych transporterów w budowaniu oporności na antymikotyki może być znacząca w początkowej fazie wzrostu biofilmu, natomiast z czasem maleje [36]. Kolejną cechą, która ma wpływ na zwiększenie oporności grzybów w biofilmie, jest zagęszczenie komórek. Wykazano zależność zmniejszenia podatności na leki wraz ze wzrostem zagęszczenia [36]. Wykazano to u szczepów *C. albicans*, u których nastąpiła delecja receptorów CDR1, CDR2 oraz MDR1 [37]. Odporność biofilmu wobec stosowanego leku związana jest również z właściwościami komórek leżących wewnątrz wielowarstwowej struktury biofilmu (ang. *persisters*). Określane są one jako komórki nieaktywne, wykazujące wysoką tolerancję na antymikotyki [32]. Uznaje się, że formy te mogą stanowić początek nowych kolonii w przypadku, kiedy bardziej wrażliwe struktury poddadzą się działaniu leków [38]. Oporność grzybów w biofilmie zależy również od nadekspresji genów kodujących enzymy biorące udział w biosyntezie ergosterolu, jak również punktowych mutacji w ich obrębie. Nadekspresja w wyniku kontaktu z azolami dotyczyć może genów ERG25 oraz ERG11, jednak wskazuje się również rolę genu ERG3 w budowaniu oporności na te leki [35].

### 3.5. Odpowiedź na stres

Komórki grzybowe, jak każde inne są podatne na stres, w związku z tym wykształciły mechanizmy odpowiadające za zmniejszenie jego wpływu na wzrost i przeżywalność. Tolerancja na stres jest kolejnym czynnikiem zmniejszania się podatności na antymikotyki. W wyniku działa szeregu czynników stresogennych (zmiany temperatury, zmiany osmotyczne, wolne rodniki) aktywowane są różnorakie szlaki sygnałowe. Za jeden z kluczowych w aspekcie lekooporności uznaje się szlak MAPK. Wpływa on na rozwój struktury biofilmu [35]. Związkiem, który pełni dużą funkcję w odporności biofilmu na stres, jest kalcyneuryna, białko enzymatyczne, które posiada właściwości fosfatazy serynowo-treoninowej. Po połączeniu się kalcyneuryny z kalmoduliną i jonami wapnia powstaje kompleks uaktywniający fosfatazy [35, 39]. Z odpowiedzią na stres u grzybów związane są również białka szoku cieplnego (Hsp). Obecnie dużą rolę przypisuje się białku Hsp90, które w wyniku działania stresora odpowiada za transport, składanie oraz dojrzewanie ważnych białek wewnątrzkomór-



kowych [40]. Głównymi mechanizmami aktywowanymi w odpowiedzi na stres związany z aktywnością leków azolowych, są: działanie białek Hsp (w szczególności białka Hsp90), szlak związany z kalcyneuryną, synteza białek Sgt1 i kinaz białkowych C, TOR (kinaza białkowa treoninowo-serynowa, cel rapamycyny) oraz KDAC (deacetylaza lizynowa) [28, 29]. Ponadto, u *C. neoformans* wykazano, że na zmniejszenie skutków działania azoli mają wpływ m.in. szlaki obejmujące działanie ATPaz [29]. Białka szoku cieplnego odpowiadają za utrzymywanie stabilności homeostazy komórki oraz biorą udział w prawidłowym fałdowaniu innych białek w celu uzyskania aktywnej metabolicznie konformacji. Ponadto, są w stanie w ograniczonym zakresie przywracać prawidłową strukturę uszkodzonym białkom, jak również odgrywają rolę w degradowaniu nieaktywnych polipeptydów [41]. Białko Hsp90 odpowiada przede wszystkim za utrzymanie prawidłowej struktury kinaz białkowych, jak również aktywności czynników transkrypcyjnych [41], co może wpływać na zmniejszenie się podatności grzybów na działanie azoli.

#### 4. Podsumowanie

Azole stanowią dużą grupą syntetycznych leków powszechnie stosowanych w walce z grzybicami powierzchniowymi i układowymi. Dzieli się na imidazole i triazole. Mechanizm działania tych leków polega na hamowaniu 14- $\alpha$ -demetylazy lanosterolu, co uniemożliwia syntezę podstawowego składnika błony komórkowej grzybów – ergosterolu. W wyniku zahamowania 14- $\alpha$ -demetylazy lanosterolu następuje nagromadzenie w komórce zmetylowanych steroli, które powodują destabilizację błony komórkowej i w konsekwencji śmierć komórki.

Azole są zwykle lekami pierwszego wyboru w profilaktyce i leczeniu infekcji grzybiczych. Jednak powszechność ich stosowania, długoterminowy charakter leczenia, nawrotowość chorób powodowanych przez grzyby czy grzybobstatyczne działanie np. względem *Candida spp.* spowodowało selekcję opornych na azole genotypów.

Lekooporność na azole może być warunkowana obecnością transporterów wielolekowych, takich jak transportery typu ABC oraz typu MFS. Zwiększoną oporność grzybów na działanie azoli wykazano również w wyniku zwiększenia syntezy 14- $\alpha$ -demetylazy lanosterolu lub modyfikacji jej struktury, zmiany struktury błony komórkowej czy utworzenia biofilmu. Ponadto, grzyby mogą zwiększać ekspresję niektórych genów, np. *ERG3* (kodującego dysmutazę) lub *ERG11* (kodującego 14- $\alpha$ -demetylazę lanosterolu).

Wzrastająca oporność grzybów na dostępne antymikotyki, w tym azole skłaniają do poszukiwania nowych środków przeciwgrzybiczych oraz do udoskonalania obecnie stosowanych preparatów. Jedną z możliwości jest łączenie znanych środków przeciwgrzybiczych z innymi związkami chemicznymi w celu uzyskania silniejszego działania mieszaniny w stosunku do tych substancji stosowanych osobno. Strategia ta pozwala na obniżenie dawki substancji czynnych w stosowanym leku przy jednoczesnym utrzymaniu ich terapeutycznego działania na skutecznym poziomie. Takie podejście umożliwia minimalizację efektów ubocznych stosowanych środków przeciwgrzybiczych, a także przyczynia się do łatwiejszej eliminacji szczepów opornych na leki stosowane osobno. Taką możliwość stwarza np. oksytiamina będąca antywitaminą tiaminy (witaminy B<sub>1</sub>), która wykazuje antyproliferacyjną aktywność względem *Malassezia pachydermatis* [42, 43]. Część ta nie była dotychczas wykorzystywana w praktyce medycznej. Ponadto wyniki oceny wrażliwości szczepów

*M. pachydermatis* na oksytiaminę w połączeniu z ketokonazolem wskazały na wysoki synergizm działania tych związków. Przeprowadzone eksperymenty z zastosowaniem mieszaniny obu tych związków wykazały, że taki sam efekt bólczy można uzyskać przy dużo niższych stężeniach, w porównaniu do tych czynników działających osobno [44].

Skuteczność i szerokie spektrum działania leków azolowych sprawiają, że trudno sobie wyobrazić terapię przeciwgrzybiczą bez użycia tych związków. Warto jednak pracować nad bezpieczną i równie skuteczną alternatywą dla tych leków poszukując związków wpływających na zwiększenie efektywności azoli i w konsekwencji zmniejszeniu ich terapeutycznych dawek.

## Literatura

1. Bongomin F., Gago S., Oladele R., Denning D., *Global and multi-national prevalence of fungal diseases – estimate precision*, Journal of Fungi, 3, 2017, 57.
2. Sheehan D., Hitchcock Ch., Sibley C., *Current and Emerging Azole Antifungal Agents*, Clinical Microbiology Reviews, 12, 1999, 40-79.
3. Desai V.C.A., Cavanaugh T.M., Kelton C.M.L., Guo J.J., Heaton P.C., *Trends in the Utilization of Spending on and Prices for Outpatient Antifungal Agents in US Medicaid Programs: 1991-2009*, Clinical Therapeutics, 34, 2012, 2118-2131.
4. Szymańska M., Baranowski A., Plachta D., *Przegląd preparatów najczęściej stosowanych w leczeniu chorób grzybiczych*, Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Warszawie, 1, 2007, 1-12.
5. Staniszewska M., Bondaryk M., Kowalska M., Magda U., Łuka M., Ochal Z., Kurzątkowski W., *Patogeneza i leczenie zakażeń Candida spp.*, Postępy Mikrobiologii, 53, 2014, 229-240.
6. Eicher T., Hauptmann S., Speicher A., *The Chemistry of Heterocycles*, WILEY-VCH, 2003.
7. Zejc A., Gorczyca M., *Chemia leków*, PZWL, Warszawa 2008.
8. Owens J.N., Skelley J.W., Kyle J.F., *The fungus among us: an antifungal review*, US Pharmacist, 35, 2010, 44-56.
9. Crowley P.D., Gallagher H.C., *Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future*, Journal of Applied Microbiology, 117, 2014, 611-617.
10. Maleszka R., Adamski Z., *Leki przeciwgrzybicze w codziennej praktyce lekarskiej*, Przewodnik lekarza, 4, 2001, 48-56.
11. Mast N., Zheng W., Stout C.D., Pikuleva I.A., *Antifungal Azoles: Structural Insights into Undesired Tight Binding to Cholesterol-Metabolizing CYP46A1*, Molecular Pharmacology, 84, 2013, 86-94.
12. Nett J.E., Andes D.R., *Antifungal agents: spectrum of activity, pharmacology and clinical indications*, Infectious Disease Clinics of North America, 30, 2016, 51-83.
13. Kosicka K., Nosal P., Główska F.K., *Worykonazol – bezpieczeństwo stosowania oraz wskazania do terapii monitorowanej*, Farmacja Współczesna, 6, 2013, 1-6.
14. Campoy S., Adrio J.L., *Antifungals*, Biochemical Pharmacology, 133, 2017, 86-96.
15. Maertens J.A., *History of the development of azole derivatives*, Clinical Microbiology and Infection, 10, 2004, 1-10.
16. Lupetti A., Danesi R., Campa M., Del Tacca M., Kelly S., *Molecular basis of resistance to azole antifungals*, Trends in Molecular Medicine, 8, 2002, 76-81.
17. Perlin D.S., Rautemaa-Richardson R., Alastruey-Izquierdo A., *The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management*, Fungal Infections, 5, 2017, 1-10.
18. Revie N.M., Iyer K.R., Robbins N., Cowen L.E., *Antifungal drug resistance: evolution, mechanism and impact*, Current Opinion in Microbiology, 45, 2018, 70-76.

19. De Waart M.A, Andrade A.C., Hayashi K., Schoonbeek H.J., Stergiopoulos I., Zwiers L.H., *Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence*, Pest Management Science, 62, 2006, 195-207.
20. Vandeputte P., Ferrari S., Coste A.T., *Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infection*, International Journal of Microbiology, 2012.
21. Łącka I., Wakieć R., *Oporność wielolekowa grzybów*, Postępy Biochemii, 54, 2007, 24-34.
22. White T.C., Marr K.A., Bowden R.A., *Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance*, Clinical Microbiology Review, 11, 1998, 382-402.
23. Jarmuła A., Oblak E., Wawrzycka D., Gutowicz J., *Oporność wielolekowa związana z aktywnym usuwaniem leków z komórek drobnoustrojów*, Postępy Higieny I Medycyny Doświadczalnej, 65, 2011, 216-227.
24. Wiederhold N.P., *Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat*, Infection and Drug Resistance, 10, 2017, 249-259.
25. Sanjoy P., Scott Moye-Rowley W., *Multidrug resistance in fungi: regulation of transporter-encoding gene expression*, Frontiers in Physiology, 5, 2014, 1-14.
26. Branco J., Ola M., Silva R.M., Fonseca E., Gomes N.C., Martins-Cruz C., Silva A.P., Silva-Dias A., Pina-Vaz C., Erraught C., Brennan L., Rodrigues A.G., Butler G., Miranda I.M., *Impact of ERG3 mutations and expression of ergosterol genes controlled by UPC2 and NDT80 in Candida parapsilosis azole resistance*, Clinical Microbiology and Infections, 23, 2017, 575.e1-575.e8.
27. Morio F., Jensen R.H., Le Pape P., Arendrup M.C., *Molecular basis of antifungal drug resistance in yeasts*, International Journal of Antimicrobial Agents, 50, 2017, 599-606.
28. Perlin D.S., Shor E., Zhao Y., *Update on Antifungal Drug Resistance*, Current Clinical Microbiology Reports, 2, 2015, 84-95.
29. Robbins N., Caplan T., Cowen L.E., *Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance*, Annual Review of Microbiology, 71, 2017, 753-775.
30. Selmecki A., Forche A., Berman J., *Genomic plasticity of the human pathogen Candida albicans*, Eukaryotic Cell, 9, 2010, 991-1008
31. Yang F., Kravets A., Bethlendy G., Welle S., Rustchenko E., *Chromosome 5 monosomy of candida albicans controls susceptibility to various toxic agents, including major antifungals*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 57, 2013, 5026-5036.
32. Sinov E. Lee H., Chang Y.C., Kwong-Chung K.J., *Cryptococcus neoformans overcomes stress of azole drugs by formation of disomy in specific multiple chromosomes*, Public Library of Science Pathogens, 6, 2010, e1000848.
33. Vanden Bossche H., Engelen M., Rochette F., *Antifungal agents of use in animal health – chemical, biochemical and pharmacological aspects*, Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 26, 2003, 5-29.
34. Cowen L.E., Sanglard D., Howard S.J., Rogers P.D., Perlin D.S., *Mechanisms of Antifungal Drug Resistance*, Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 5, 2015, 1-22.
35. Ramage G., Rajendran R., Sherry L., Williams C., *Fungal biofilm resistance*, International Journal of Microbiology, 2012, 528521.
36. Taff H.T., Mitchell K.F., Edward J.A., Andes D.R., *Mechanisms of Candida biofilm drug resistance*, Future Microbiology, 8, 2013, 1325-1337.
37. Perumal P., Mekala S., Chaffin W.L., *Role for Cell Density in Antifungal Drug Resistance in Candida albicans biofilms*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51, 2007, 2454-2463.
38. Taff H.T., Mitchell K.F., Edward J.A., Andes D.R., *Mechanism of Candida biofilm drug resistance*, Future Microbiology, 8, 2013, 1-19.
39. Juwadi P.R., Lee S.C., Heitman J., Steinbach W.J., *Calcineurin in fungal virulence and drug resistance: Prospects for harnessing targeted inhibition of calcineurin for an antifungal therapeutic approach*, Virulence, 8, 2017, 186-197.

40. Dzierżanowska D., *Mechanizmy oporności na leki przeciwgrzybiczne*, [w:] Romanowska E. (red.), Zakażenia szpitalne, Wyd. Alfa Medica Press, Bielsko-Biała, 2008, 497-507.
41. Kazula A., Kazula E., *Stymulacja aktywności białek szoku cieplnego jako nowy kierunek terapii*, *Terapia i leki*, 65, 2009, 697-706.
42. Ziółkowska G., Tokarzewski S., Strumiło S., Tylicki A., *Antifungal efficacy of oxythiamine – antivitamin derivative of vitamin B<sub>1</sub>*, *Annales Universitatis Marie Curie-Skłodowska Lublin-Polonia Sectio DD*, 51, 2006, 69-73.
43. Siemieniuk M., Czyżewska U., Strumiło S., Tylicki A., *Thiamine antivitamin – an opportunity of therapy of fungal infections caused by Malassezia pachydermatis and Candida albicans*, *Mycoses*, 59, 2016, 108-116.
44. Siemieniuk M., Sosnowska K., Czerniecki J., Czyżewska U., Winnicka K., Tylicki A., *Oxythiamine improves antifungal activity of ketoconazole evaluated in canine Malassezia pachydermatis strains*, *Veterinary Dermatology*, 29, 2018, 476-e160.

## Azole w terapii grzybic – charakterystyka i mechanizmy oporności

### Streszczenie

Azole stanowią ważną grupę syntetycznych leków powszechnie używanych w terapii przeciwgrzybiczej. Ich szerokie spektrum działania oraz możliwość wykorzystania w wielu postaciach farmaceutycznych pozwala na walkę z większością gatunków chorobotwórczych. Przeciwgrzybiczy mechanizm działania tych leków polega na hamowaniu syntezy ergosterolu – podstawowego składnika błony komórkowej grzybów, co prowadzi do destabilizacji błony komórkowej i śmierci grzyba. Aktualnie azole uważa się za najskuteczniejsze leki przeciwgrzybicze, chociaż coraz częściej odnotowuje się przypadki szczepów opornych. Lekooporność na azole może wynikać z obecności transporterów wielolekowych, takich jak transportery typu ABC oraz MFS. Ponadto, grzyby mogą zwiększać biosyntezę lub modyfikować strukturę enzymu docelowego dla azoli (14- $\alpha$ -demetylasy lanosterolu), zmieniać strukturę barier otaczających komórkę, tworzyć biofilm lub zwiększać ekspresję niektórych genów, np. *ERG11* (kodującego 14- $\alpha$ -demetylazę lanosterolu), *ERG3* (kodującego dysmutazę).

Obecnie trudno wyobrazić sobie terapię przeciwgrzybiczą bez użycia azoli, warto jednak pracować nad nowymi formułami tych leków z wykorzystaniem związków działających synergistycznie. Podejście takie może zwiększyć bezpieczeństwo ich stosowania, nie zmieniając, a nawet poprawiając skuteczność.

Słowa kluczowe: grzyby patogenne, pochodne azolowe, substancje przeciwgrzybicze, biofilm

## Azoles in the treatment of fungal infections – characteristics and mechanisms of resistance

### Abstract

Azoles are an important group of synthetic drugs commonly used in antifungal therapy. Their wide spectrum of activity and possibility of using in many pharmaceutical forms allow to treat the majority of pathogenic species. Mechanisms of antifungal action of these drugs is based on inhibition the synthesis of ergosterol – the basic component of the fungal cell membrane, what leads to the destabilization of the cell membrane and the death of the fungi. Currently, azoles are antifungal drugs, which are considered the most effective, although cases of resistant strains occurrence are increasingly frequent. Drug resistance to azoles might be a result of the presence of multidrug transporters (such as ABC and MFS transporters). Moreover, fungi may increase biosynthesis or modify the structure of the target enzyme for azoles (lanosterol 14- $\alpha$ -demethylase), change the structure of barriers surrounding of the cell, make a biofilm or increase the expression of some genes, e.g. *ERG11* (encoding lanosterol 14- $\alpha$ -demethylase), *ERG3* (encoding dismutase).

Currently, it's difficult to imagine antifungal therapy without using azoles, but it's important to work on new formulas of these drugs using synergistic compounds. It can help to increase the safety of their use without changing or even improving their effectiveness.

Keywords: pathogenic fungi, azoles, antifungal agents, biofilm

# Przeciwdrobnoustrojowa terapia fotodynamiczna

## 1. Wstęp

Zakażenia pochodzenia bakteryjnego, grzybiczego oraz wirusowego są dominującą przyczyną chorób XXI wieku, gdzie liczba zgonów sięga nawet 16 milionów rocznie [1]. Odkrycie antybiotyków było wielkim przełomem w zwalczaniu przyczyn tych zakażeń i przypuszczano, że „cudowne” leki zlikwidują ten problem. Niestety, bakterie, walcząc o przeżycie, wykształciły różne możliwości nabywania lekooporności. Ponadto nadużywanie leków przeciwdrobnoustrojowych, niestosowanie się do zaleceń lekarzy i nienależyta ich aplikacja, przyspieszyła ewolucję mechanizmów lekooporności mikroorganizmów, która stała się poważnym, globalnym problemem [2].

W „walce” z antybiotykami drobnoustroje korzystają z różnorodnych mechanizmów, jakimi są: zaburzenia w systemie transportu antybiotyku do cytoplazmy, modyfikacja miejsca docelowego, aktywny wypływ leku z komórki oraz enzymatyczne niszczenie lub modyfikacja struktury leku [3,4]. Drobnoustroje wytwarzające te mechanizmy nazwano patogenami alarmowymi lub alert-patogenami (ang. *alert-pathogens*). Takie drobnoustroje są odpowiedzialne za szereg zakażeń szpitalnych i potrafią przekazywać informację genetyczną w obrębie tego samego gatunku, jak również między gatunkami. Informacja ta przenoszona jest przy pomocy plazmidów oraz transpozonów [5].

Badania nad szczególnie opornymi szczepami pozwoliły na stworzenie akronimu ESCAPE, który „opisuje” bakterie odpowiedzialne za 2/3 zakażeń szpitalnych, wywoływanych przez: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacteriaceae* [6, 7].

Wzrastająca lekooporność mikroorganizmów, również oportunistycznych, skłoniła naukowców do poszukiwania nowych, nieinwazyjnych oraz tańszych ścieżek przeciwdrobnoustrojowej terapii. Zainteresowano się przeciwdrobnoustrojową terapią fotodynamiczną (aPDT – *antimicrobial photodynamic therapy*) [8]. Ta forma leczenia jest znana od ponad 1000 lat, chętnie stosowana przez takie kraje jak Indie, Egipt czy Chiny. Za pioniera współczesnej terapii fotodynamicznej uważa się studenta medycyny Oscara Raab’a (1900), który w czasie swoich rozważań doktorskich prowadził badania nad wpływem czerwonej akrydyny na hodowlę pantofelków (*Paramecium* spp.) i stwierdził, że połączone działanie tego barwnika i światła skutecznie niszczy ten organizm. Szukając nowych terapii przeciwdrobnoustrojowych, powrócono do tej metody, która znajduje coraz większe możliwości stosowania [9]. Przeciwdrobnoustrojowa terapia fotodynamiczna charakteryzuje się szybkością oraz łatwością, ale co najważniejsze, do tej pory, nie zanotowano przypadku oporności drobnoustrojów na tę formę chemioterapii [10]. Celem poniższej pracy było przedstawienie aspektów przeciwdrobnoustrojowej terapii fotodynamicznej oraz włączenie nanocząstek złota do jej wspomagania.

---

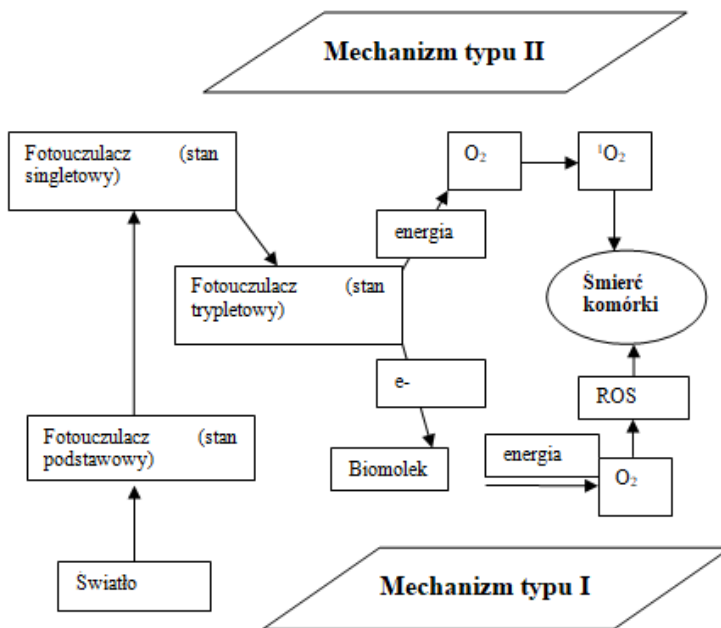
<sup>1</sup> ewelina.wanarska@pwr.edu.pl, Zakład Chemii Medycznej i Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska.

## 2. Mechanizm terapii fotodynamicznej

Do przeprowadzenia reakcji fotodynamicznej wykorzystuje się trzy składniki: fotoczułacz (nietoksyczny barwnik), światło oraz tlen. Ogólna technika terapeutyczna opiera się na uczuleniu komórek mikroorganizmu określonym fotoczułaczem, a następnie narażeniu takiego „układu” na światło o określonej długości fali. Kluczowym elementem jest korelacja długości fali światła z maksimum absorpcji barwnika. Podczas tego procesu powstają reaktywne formy tlenu (*reactive oxygen species* – ROS), głównie tlen singletowy, będący bardzo szkodliwym czynnikiem dla mikroorganizmu [11]. Wymienia się dwa różne mechanizmy (I i II) terapii fotodynamicznej, zależne od stężenia tlenu (rysunek 1) [12].

Mechanizm pierwszy (niskie stężenie tlenu) opiera się na absorpcji fotonu przez fotoczułacz, co powoduje jego przejście ze stanu podstawowego ( $^1P_0$ ) do stanu wzbudzonego ( $^1P^*$ ), a następnie stanu trypletowego ( $^3P^*$ ). Taka forma fotoczułacza jest zdolna do przekazywania elektronu cząsteczkom biologicznym znajdującym się w jego otoczeniu. Następnie nadmiar energii jest przekazywany z biocząsteczek na tlen cząsteczkowy ( $^3O_2$ ), powodując powstanie reaktywnych form tlenu (ROS), głównie tlenu singletowego ( $^1O_2$ ), będącego przyczyną śmierci komórek. Po całym procesie fotoczułacz powraca do stanu podstawowego, będąc przydatnym do następnego cyklu terapii [13,14].

Ścieżka drugiego mechanizmu (wysokie stężenie tlenu) jest krótsza. Po absorpcji fotonu przez fotoczułacz, nadmiar energii jest bezpośrednio przekazywany na cząsteczkę tlenu, powodując powstanie niebezpiecznego tlenu singletowego. Ten mechanizm terapii fotodynamicznej jest uważany za dominujący (tlenowy charakter organizmu ludzkiego) i bardziej skuteczny niż mechanizm pierwszy [13,14].



Rysunek 1. Mechanizmy przeciwdrobnoustrojowej terapii fotodynamicznej (I i II) [9]

Niebezpieczne produkty opisanego procesu prowadzą do: degradacji osłon oraz uszkodzenia struktur komórkowych mikroorganizmów (białka, lipidy, kwasy nukleinowe), zaburzenia szlaków metabolicznych, rozregulowania procesów translacji, transkrypcji oraz replikacji, prowadzących do śmierci komórek. Kluczowym celem takiej terapii jest niszczenie komórek drobnoustrojów przy jednoczesnym braku wpływu na komórki gospodarza [15].

Naukowcy chętnie manipulują „czynnikami” procesu terapii fotodynamicznej. Na tlen można wpłynąć w sposób pośredni, zmieniając jego stężenie. Natomiast fotouczulacze są testowane pod względem zmiany ich chemicznych właściwości lub dąży się do powstania nowej generacji fotouczulaczy, wykorzystując zdobycze nanotechnologii. Dodatkowo, oprócz modyfikowania samego barwnika, operuje się jego otoczeniem, to jest zmianami pH czy temperaturą [9].

### **3. Fotouczulacze**

Wyniki badań prowadzonych w ostatnich latach pokazały, że nie każdy barwnik może być wykorzystany w fototerapii przeciwdrobnoustrojowej. Fotouczulacze powinny mieć kilka ważnych cech. Przede wszystkim powinny być to związki czyste chemicznie. Cząsteczki światłoczułe powinny być trwałe i dobrze rozpuszczalne w wodzie. Nie mogą być toksyczne dla komórek ludzkiego organizmu. Dodatkowo, przy wzbudzeniu światłem, ważnym aspektem jest ich wysoka toksyczność wobec komórek bakteryjnych i jak najmniejszy wpływ na komórki ludzkie. Ważnym elementem jest zdolność do generacji tlenu singletowego i innych wolnych rodników w krótkim czasie [16].

Wymienia się kilka grup fotouczulaczy działających na określone drobnoustroje (tabela 1) [10]. Fenotiazyny, np. błękit metylenowy oraz ortotolidyna są najczęściej wykorzystywane w mechanizmie fotouczulenia typu I. Absorbacja światła o długości fali 600-680 nm pozwala na wykorzystanie ich jako fotouczulaczy. Oba barwniki wykazują aktywność, zarówno w przypadku bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych. Foto-toksyczność tej grupy związków polega na dezintegracji błon komórkowych mikroorganizmów, niszczeniu organelli komórkowych oraz zaburzeniu struktury kwasów nukleinowych [10, 15].

Porfiryny, a szczególnie porfiryny kationowe, na przykład hematoporfiryna, absorbujące światło o długości fali 610-630 nm, są barwnikami chętnie wykorzystywanymi w mechanizmie typu II fototerapii. Dodatkowo naładowane porfiryny mają możliwość przenikania przez osłony komórkowe mikroorganizmu, wykorzystując oddziaływanie z bakteryjnym lipopolisacharydem (LPS) [10, 15, 19].

Chloryny (głównie chloryny kationowe) podobnie jak wyżej wymienione porfiryny, są wykorzystywane w mechanizmie typu II. Absorbujące światło o długości 650-660 nm związki, mają dodatkową zaletę w postaci generowania tlenu singletowego o wysokiej wydajności kwantowej [10, 15].

Ftalocyjaniny, na przykład sulfonowana ftalocyjanina chloro-glinowa, absorbujące światło o zakresie podobnym do porfiryń, są jednymi z najbardziej znanych fotouczulaczy, wykorzystujących II mechanizm. Ftalocyjaniny mają możliwość generacji dużych ilości reaktywnych form tlenu [10, 15].

Ksanteny, na przykład erytrozyna czy róż bengalski, w przeciwieństwie do wyżej wymienionych są anionowymi związkami wykorzystującymi II typ mechanizmu. Absorbują fale światła o długości 480-550 nm. Oprócz generacji tlenu singletowego mają możliwość generowania anionów ponadtlenkowych. Mogą być podawane doustnie, będąc przydatne także w zwalczaniu wirusów [10, 15].

Mechanizm działania kwasu 5-aminolewulinowego opiera się na akumulacji protoporfiryny (PpIX) będącej prekursorem hemu. To właśnie protoporfiryna, akumulowana w komórce, warunkuje aktywność fotouczulającą w obecności światła. Zaletą kwasu jest fakt, iż jest on naturalnym prekursorem fotouczulającym wytwarzanym przez organizm ludzki, wykazującym niską cytotoksyczność. Dodatkowo wytwarzana protoporfiryna jest szybko usuwana z organizmu, a długotrwałe użycie kwasu nie powoduje nadwrażliwości na światło. Proces zachodzi bardzo szybko [10, 17].

Fulereiny działają na zasadzie mechanizmu typu I. Ze względu na brak ładunku, czyste fulereny nie mogą być stosowane do przeciwbakteryjnej terapii. Wykorzystanie tej grupy umożliwia modyfikacja chemiczna po dodaniu cząsteczek amfifilowych [15].

Tabela 1. Fotouczulacze wykorzystywane w terapii przeciwdrobnoustrojowej [10, 15]

Grupa	Fotouczulacz	Bakterie
Fenotiazyny	błękit metylenowy, ortotolidyna	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Porfiryny	porfiryne kationowa	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
Chloryny	chloryna kationowa	<i>Escherichia coli</i>
Ftalocyjaniny	sulfonowana ftalocyjanina chloro-glinowa	<i>Escherichia coli</i>
Ksanteny	róż bengalski, erytrozyna	<i>Escherichia coli</i>
Kwas 5-aminolewulinowy (prekursor)	protoporfiryna IX	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Fulereiny	sól jodku N-metylopirolidyno- C60-fullerenowego	<i>Staphylococcus aureus</i>

#### 4. Źródła światła

Światło jest kolejnym niezbędnym składnikiem przeciwdrobnoustrojowej terapii fotodynamicznej. Zakres długości światła absorbowanego przez fotouczulacze zawiera się w przedziale 630-700 nm, co odpowiada wiązce światła, która może przeniknąć przez tkanki od 0,5 do 1,5 cm. Najkorzystniejszym źródłem światła okazały się być lasery oraz diody emitujące światło (LED) [4]. Zaletami laserów jest wytwarzanie światła o bardzo szerokim zakresie długości od ultrafioletu (fale krótkie) do światła czerwonego (fale długie). Generowana wiązka światła charakteryzuje się monochromatycznością, stabilnością pod kątem kierunku, częstotliwością oraz barwą, w przeciwieństwie do odmiennych, powszechnych niespójnych źródeł światła np. żarówki [12]. Pierwsze lasery jako ośrodek czynny posiadały mieszanek helu oraz neonu, podczas gdy w dzisiejszych czasach chętniej używa się mieszanek arsenku glinu z domieszkami galu, uzyskując pożądaną intensywność emisji światła. LED mają możliwość generowania światła o szerszym spektrum, przy czym są tańsze, ale wytwarzane światło nie posiada tak dobrej jak lasery zdolności penetracji tkanek.



Kluczowym aspektem przy wykorzystaniu tych dwóch źródeł światła jest dobranie odpowiedniej dawki energii, gdzie nieostrożna generacja dużej ilości ciepła (wzrost temperatury) wiąże się z ryzykiem zniszczenia tkanek [13].

## 5. Przeciwdrobnoustrojowy cel terapii fotodynamicznej

Przeciwdrobnoustrojowa terapia fotodynamiczna, jak wspomniano wyżej, ukierunkowana jest na określone struktury komórkowe, takie jak lipidy, białka oraz kwasy nukleinowe. Różnorodnym własności fotouczulaczy (ładunek, wielkość, liofilowość) pozwalają im akumulować się w różnych miejscach komórki.

Zaczynając od lipidów, poprzez liofilowy charakter fotouczulaczy, głównym miejscem osadzenia są zewnętrzne błony komórkowe mikroorganizmów, z czego wynika, iż składniki membran (komponenty lipidowe i białka) są priorytetowym celem aPDT. Generowane reaktywne formy tlenu oraz inne toksyczne rodniki, głównie „skupiają” się na nienasyconych kwasach tłuszczowych, kierując swoje działanie na rozerwanie podwójnych wiązań w łańcuchach acylo-fosfolipidowych. Problemem w tym aspekcie stają się mikroorganizmy, których zewnętrzna błona posiada nasycone kwasy tłuszczowe. Ciekawym odkryciem stała się również wewnętrzna warstwa błony oraz błona cytoplazmatyczna jako cel modyfikacji redoks w obecności pochodnej porfiryny u bakterii *E. coli*. Zmiana stopnia utlenienia lipidów powoduje proces reorganizacji błony plazmatycznej, upłynniając ją, a zatem powodując śmierć komórki [4, 10].

Mechanizmy uszkodzania białek, a co za tym idzie śmierć komórek mikroorganizmów są wciąż nie do końca poznane. Poprzez fakt, iż proteiny występują w dużej ilości w różnych miejscach w komórce (błony komórkowe, cytozol) oraz przez ich charakter liofilowy (tak jak fotouczulacze), powinny być kluczowym celem terapii fotodynamicznej. Dyskusyjną kwestią jest fakt czy wspomniana proteotoksyczność jest przyczyną śmierci komórkowej, ponieważ bakterie doskonale radzą sobie ze stresem proteotoksycznym [9, 15, 20].

Kwasy nukleinowe są również dyskusyjnym celem przeciwdrobnoustrojowej terapii fotodynamicznej. Niektórzy badacze opisują, iż fotouczulacze wiążą się z kwasami, powodując ich modyfikację i w ten sposób zaburzają ich funkcje genetyczne. Z drugiej strony uważa się, iż kwasy nie są celem terapii, ponieważ zaraz po niej następują szybkie procesy naprawcze [9, 15, 20].

Ekspresja pomp wypływowych jest dodatkowym, lecz rzadziej opisywanym, i wciąż kontrowersyjnym celem przeciwdrobnoustrojowej terapii fotodynamicznej. Z jednej strony aPDT nie ma wpływu na mikroorganizmy, które właśnie przy użyciu pomp wypływowych usuwają lub zmniejszają stężenie szkodliwych fotouczulaczy, obniżając skuteczność terapii. Z drugiej strony można pokonać problem poprzez zastosowanie specyficznych inhibitorów pomp wypływowych [9, 15, 21].

## 6. Bariery przeciwdrobnoustrojowej terapii fotodynamicznej

Skuteczność terapii fotodynamicznej zależy od drogi, która musi być pokonana oraz od napotkanych barier komórkowych. Pierwszą barierą stają się lipopolisacharydy (LPS) występujące na powierzchni zewnętrznej błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych. LPS podtrzymuje integralność błony i co za tym idzie, chroni komórkę

przed chemicznymi, fizycznymi oraz elektrostatycznymi bodźcami [21]. Zniszczenie tej struktury powoduje śmierć mikroorganizmu. Błona komórkowa, jak wspomniano wcześniej, jest celem terapii, jednakże przeniknięcie fotouczulacza przez barierę lipopolisacharydową, staje się nie lada wyzwaniem. Pierwszy punkt zaczepienia, jakim jest LPS to doskonały cel dla kationowych cząsteczek fotouczulających. Przeprowadzone badania wobec *P. aeruginosa*, z wykorzystaniem różu bengalskiego oraz błękitu metylenowego, wykazały, że po zastosowaniu terapii fotodynamicznej następowała modyfikacja redoks bakteryjnego LPS. Wykazano także, że wiązanie się kationowych cząsteczek fotouczulających z anionowymi LPS, konkuruje z obecnymi dodatnio naładowanymi  $\text{Ca}^{2+}$  oraz  $\text{Mg}^{2+}$ , a sukces terapii wynikał z delokalizacji tych kluczowych kationów odpowiedzialnych za stabilizację błony [22, 23].

Zewnętrzna błona bakterii Gram-ujemnych, posiadająca hydrofilową powierzchnię oraz lipofilowy rdzeń, staje się poważną barierą dla różnorodnych cząsteczek (zarówno hydro- jak i lipofilowych). Jedynymi cząsteczkami łatwo przechodzącymi przez błonę są cząsteczki amfifilowe. Doskonałość tej bariery zaburza, wcześniej opisana, delokalizacja kluczowych kationów. Osłabienie inicjuje też powstawanie kanałów, ułatwiających samoistne przejście fotouczulaczy do wnętrza komórki. Problem pojawia się w przypadku fotouczulaczy anionowych, gdzie ich przejście wymaga aktywnego transportu, na przykład w obecności białek porynowych, często występujących w zewnętrznej błonie bakterii Gram-ujemnych. W przypadku obojętnych fotouczulaczy, sukces terapii wynika z interakcji z kationowymi biomolekułami [15, 23].

Bakterie Gram-dodatnie także posiadają bariery, które muszą być pokonane przez fotouczulacz. Kwasy lipotejchowe występujące na błonie cytoplazmatycznej oraz teichowe występujące na ścianie, stanowią wstępną blokadę dla fotouczulacza, głównie anionowego. Kationowe fotouczulacze mogą przejść przez warstwę na zasadzie oddziaływań elektrostatycznych. Dejonizacja błony destabilizuje jej strukturę, pozwalając na skuteczne przejście obydwu rodzajów fotouczulaczy [22-24].

Peptydoglikan stanowi kolejny punkt przejścia dla fotouczulaczy. Peptydoglikan występujący na błonie cytoplazmatycznej bakterii Gram-dodatnich jest około 2-10 razy grubszy niż ten występujący między błoną cytoplazmatyczną i zewnętrzną błoną u bakterii Gram-ujemnych. Peptydoglikan jest strukturą dość porowatą, dlatego nie stanowi większej przeszkody dla fotouczulaczy kationowych czy anionowych. Obojętne oraz anionowe fotouczulacze mogą przejść przez tę warstwę przy pomocy pasywnej dyfuzji, podczas gdy dodatnio naładowane cząstki na zasadzie oddziaływań elektrostatycznych. Przeprowadzone badania, pokazały, że mimo grubszej warstwy peptydoglikanu, walka z bakteriami Gram-dodatnimi jest łatwiejsza niż z bakteriami Gram-ujemnymi [15].

Błona cytoplazmatyczna stanowi ostatnią barierę do przejścia dla fotouczulacza. Skład błony w przypadku bakterii Gram-ujemnych oraz Gram-dodatnich jest znacznie zróżnicowany. Fosfatydyloetanolaminy mają większy udział w strukturze błon komórkowych bakterii Gram-ujemnych niż Gram-dodatnich. Niższa zawartość tych struktur w składzie bakterii Gram-dodatnich warunkuje występowanie większej ilości anionowych fosfolipidów. Jest to kolejny dowód na to, iż przeciwdrobnoustrojowa terapia fotodynamiczna jest skuteczniejsza wobec bakterii Gram-dodatnich [15].

## 7. Nanocząstki metali w terapii fotodynamicznej

W celu pokonania wcześniej wymienionych problemów, dąży się do otrzymywania fotouczulaczy III generacji wspomaganych różnorodnymi nanostrukturami, głównie nanocząstkami metali.

Nanotechnologia jest przełomową dziedziną ostatniej dekady wykorzystującą obiekty organiczne oraz nieorganiczne, o rozmiarze  $10^{-9}$  m o różnorodnych właściwościach, takich jak kształt, rozmiar, dyspersja czy długi czas działania [25]. Dobrze znanymi nanostrukturami są liposomy, micelle, nanorurki, a także nanocząstki metali. Przełomem w badaniach okazało się wykorzystanie nanostruktur, w tym nanocząstek metali do poprawy efektywności przeciwdrobnoustrojowej terapii fotodynamicznej [25, 26]. Nanostruktury mogą wspomagać fotouczulacze w dwójaki sposób. Pierwszym sposobem jest enkapsulacja cząsteczki fotouczulającej (liposomy, nanosfery micelle, nanokapsuły). Drugim sposobem jest jej kowalencyjne przyłączenie do nanostruktury (nanocząstki metali). Wspomaganie terapii fotodynamicznej przez nanoobiekty poprawia rozpuszczalność fotouczulaczy, zarówno w wodzie, jak i innych wodnych rozpuszczalnikach. Obecność nanocząstki zapobiega formowaniu się dimerów oraz trimerów cząsteczkowych, które mogą dawać niską efektywność terapii. Ważnym aspektem jest wspomaganie osiągnięcia celu oraz selektywności i akumulacja w docelowych komórkach. Dodatkową zaletą jest zapobieganie wydalaniu fotouczulacza z komórki oraz efektywna redukcja lekooporności mikroorganizmów. Opisuje się, iż same nanocząstki metali wykazują właściwości bakteriobójcze oraz bakteriostatyczne, poprzez hipotetyczną destrukcję osłon komórkowych, zaburzenie metabolizmu komórki oraz generowanie reaktywnych form tlenu, jednakże ich wpływ jest wciąż dyskusyjny, a mechanizm dokładnie niepoznany. Jednymi z najchętniej wykorzystywanych w fototerapii nanostruktur są nanocząstki metali, głównie złota i srebra [27, 28].

Ważnymi zaletami złotych nanocząstek są ich optyczne właściwości, uniwersalne powierzchnie oraz biokompatybilność. Przeprowadzono badania przeciwgrzybiczych właściwości kompleksu nanocząstka złota-błękit metylenowy wobec drożdżaków *Candida albicans*. Eksperymenty pokazały niszczący wpływ tego koniugatu, odnoszący się do zaburzenia struktury biofilmu drożdżaka, dezintegracji osłon komórkowych oraz dezorganizacji metabolizmu komórki [29]. Koniugat nanocząstka złota-błękit metylenowy wywoływał również śmiertelne fotouczulenie *Staphylococcus aureus* [30] i *Staphylococcus epidermidis* [31]. Kompleks nanozłoto-fotouczulacz, powodował prawie 100% śmiertelności *Staphylococcus epidermidis* już po 5-minutowym naświetlaniu. Dodatkowo stwierdzono bakteriobójcze działanie kompleksu złota nanocząstka-błękit metylenowy bez ekspozycji na światło [31].

Nanocząstki srebra są znane jako cząstki bakteriobójcze. Nanostruktury te mają zdolność do reagowania z siarką oraz jej pochodnymi skutkując zmianą przepuszczalności osłon komórkowych i dezorganizacją procesów replikacyjnych [32]. Badano bakteriobójcze właściwości kompleksu nanocząstka srebra-błękit metylenowy wobec *Streptococcus spp.*, będących niebezpiecznymi patogenami w pierwszych miesiącach życia dzieci. Wysokie stężenie srebrnych nanostruktur okazało się być efektywne w zwalczaniu patogenicznego drobnoustroju [33].

## 8. Podsumowanie

Przeciwdrobnoustrojowa terapia fotodynamiczna wydaje się być skuteczną techniką w zwalczaniu mikroorganizmów wywołujących groźne, a w niektórych przypadkach śmiertelne choroby. Zaletami terapii są nieinwazyjność, łatwość i nietoksyczność dla komórek gospodarza oraz co najważniejsze do tej pory, nie opisano oporności mikroorganizmów na ten sposób ich niszczenia. Elementy terapii, takie jak: światło, fotouczulacz oraz tlen, są łatwo dostępne. Cząsteczki fotoczułe są różnorodne, a dzisiejsze metody i techniki dają możliwość zmiany ich właściwości lub otrzymania całkiem nowego produktu. Uaktywniony fotouczulacz poprzez niszczenie osłon komórkowych, dociera do konkretnych struktur komórkowych, generuje reaktywne formy tlenu (ROS) oraz poprzez wywołanie stresu komórkowego zaburza metabolizm komórkowy (transkrypcja, replikacja, translacja). Szeroko rozwijająca się nanotechnologia pozwala tworzyć różnorodne nanostruktury, będące dodatkowym ogniwem procesu. Tworzone są fotouczulacze III generacji, wspomagane przez nanocząstki metali, które poprawiają efektywność omawianej metody niszczenia patogenów.

## Literatura

1. Nature Publishing Group, *Microbiology by numbers*, Nature Reviews Microbiology, 9, 2011, 628.
2. Ouay B., Stellacci F., *Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight*, Nanotoday, 10, 2015, 339-354.
3. Udakis R., *Antimicrobial resistance*, Society For General Microbiology, 2011.
4. Rajesh S., Koshi E., Koshi P., Mohan A., *Antimicrobial photodynamic therapy: An overview*, Journal of Indian Society of Peridontology, 15, 2011, 323-327.
5. Craig MacLean R., San Milan A., *Microbial Evolution: Towards Resolving the Plasmid Paradox*, Current Biology, 25, 2015, 764-767.
6. Santajit S., Indrawattana N., *Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens*, BioMed Research International, 2, 2016, 1-8.
7. Boucher H., Talbot G., Bradley S., Edwards J., Gilbert D., Rice L., Scheld M., Spellberg B., Bartlett J., *Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America*, Clinical Infectious Diseases, 48, 2009, 1-12.
8. Cieplik F., Deng D., Crielard W., Buchalla W., Hellwig E., Al-Ahmad A., Maish T., *Antimicrobial photodynamic therapy – what we know and what we don't*, Critical Reviews in Microbiology, 44, 2018, 571-589.
9. Rosa L., Silva F., *Antimicrobial Photodynamic Therapy: A New Therapeutic Option to Combat Infections*, Journal of Microbiology & Diagnosis, 3, 2014, 1-7.
10. Mesquita M., Dias C., Neves M., Almeida A., Amparo F., *Revisiting Current Photoactive Materials for Antimicrobial Photodynamic Therapy*, Molecules, 23, 2018, 1-47.
11. Kashmiri Z., Mankar S., *Free radicals and oxidative stress in bacteria*, International Journal of Current Microbiology and Applied Science, 3, 2014, 34-40.
12. Choromańska A., Kulbacka J., Saczko J., *Terapia fotodynamiczna-założenia, mechanizm, aplikacje kliniczne*, Nowa Medycyna, 1, 2013, 26-30.
13. Ryskova L., Buchta V., Slezak R., *Photodynamic Antimicrobial Therapy*, Central European Journal of Biology, 5, 2010, 400-406.
14. Fekrazad R., Nejat A., Kalhori K., *Antimicrobial Photodynamic Therapy With Nanoparticles Versus Conventional Photosensitizer in Oral Diseases*, [w:] Fikai A., Grumezescu A. (red.), Nanostructures for Antimicrobial Therapy, Bukareszt, 2017, 237-252.

15. Liu Y., Qin R., Zaat S., Eefjan B., Heger M., *Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic – resistant bacterial infections*, Journal of Clinical and Translational Research, 1, 2015, 140-157.
16. Kwiatkowski S., Knap B., Przystupski D., Saczko J., Kędzierska E., Knap-Czop K., Kotlińska J., Michel O., Kotowski K., Kulbacka J., *Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations*, Biomedicine and Pharmacotherapy, 106, 2018, 1098-1107.
17. Hsieh C., Huang Y., Chen C., Hsieh B., Tsai T., *5-Aminolevulinic acid induced photodynamic inactivation on Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa*, Journal of Food and Drug Analysis, 22, 2014, 350-355.
18. Baltazar L., Ray A., Sato D., Cisalpino P., Friedman A., Nosanchuk J., *Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control fungal infections*, Frontiers in Microbiology, 6, 2015, 1-11.
19. Bathavathalu S., Noel G., *Photosensitizers: An Effective Alternative Approach of Microbial Pathogen*, [w:] Rahman A. (red.), Frontiers in Clinical Drug Research: Anti-Infectives, Sharjah, 2017, 187-204.
20. Dosseli R., Milioni R., Puriceli L., Tessari P., Arrigoni G., Franchin C., Segalla A., Teardo E., Reddi E., *Molecular targets of antimicrobial photodynamic therapy identified by a proteomic approach*, Journal of Proteomics, 77, 2012, 329-343.
21. Award M., Tovmasyan A., Craik J., Batinic-Haberle I., Benov L., *Important cellular targets for antimicrobial photodynamic therapy*, Applied Microbial and Cell Physiology, 100, 2016, 7679-7688.
22. Hamblin M., Hasan T., *Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?*, Photochemical & Photobiological Sciences, 3, 2015, 436-450.
23. Georg S., Hamblin R., Kishen A., *Uptake pathways of anionic and cationic photosensitizers into bacteria*, Photochemical & Photobiological Sciences, 8, 2009, 788-795.
24. Freitas L., Hamblin M., *Antibiotic resistance and viral infections, Antimicrobial Photodynamic Inactivation and Antitumor Photodynamic Therapy*, Bristol, 2016, 121-124.
25. Bloise N., Minzioni P., Imbriani M., Visai L., *Can Nanotechnology Shine a New Light on Antimicrobial Photodynamic Therapies?*, [w:] Yohei Tanaka (red.), Photomedicine – Advances in Clinical Practice, 2017, 49-69.
26. Sun J., Kormakov S., Liu Y., Huang Y., Wu D., Yang Z., *Recent Progress in Metal-Based Nanoparticles Mediated Photodynamic Therapy*, Molecules, 23, 2018, 1-23.
27. Kasherf N., Huang Y., Hamblin R., *Advances in antimicrobial photodynamic inactivation at the nanoscale*, Nanophotonics, 6, 2017, 853-879.
28. Lucky S., Soo K., Zhang Y., *Nanoparticles in Photodynamic Therapy*, Chemical Reviews, 115, 2015, 1999-2020.
29. Khan S., Alam F., Azam A., Khan A., *Gold nanoparticles enhance methylene blue – induced photodynamic therapy: a novel therapeutic approach to inhibit Candida albicans biofilm*, International Journal of Nanomedicine, 2012, 7, 3245-3257.
30. Tawfik A., Morsy M., Alshaarnoubi J., *Photodynamic Antibacterial Enhanced Effect Of Methylene Blue-Gold Nanoparticles Conjugate On Staph Aureus Isolated From Impetigo Lesions In Vitro Study*, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 12, 2015, 215-220.
31. Maliszewska I., Leśniewska A., Olesiak-Bańska J., Matczyszyn K., Samoć M., *Biogenic gold nanoparticles enhance methylene blue-induced phototoxic effect on Staphylococcus epidermidis*, Journal of Nanoparticles Research, 16, 2014, 1-16.
32. Hsueh Y., Lin K., Ke W., Hsieh C., Chiang C., Tzou D., Liu S., *The Antimicrobial Properties of Silver Nanoparticles in Bacillus subtilis Are Mediated by Released Ag+ Ions*, 10, 2015, 1-17.
33. Kassab A., Dabous O., Morsy M., *A novel management of streptococcal pharyngotonsillar infections by laser-activated silver nanoparticles and methylene blue conjugate, in vitro study*, International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology, 100, 2017, 114-118.

## **Przeciwdrobnoustrojowa terapia fotodynamiczna**

### **Streszczenie**

Lekooporność patogenów stała się poważnym problemem XXI wieku. Antybiotyki stały się niewystarczającym ogniwem walki z infekcjami drobnoustrojowymi, które poprzez wykorzystanie różnorodnych mechanizmów obronnych skutecznie uodparniają się na stosowane leki. Skłoniło to naukowców do poszukiwania nowatorskich, łatwiejszych i tańszych ścieżek walki z mikroorganizmami. Rozwiązaniem może być przeciwdrobnoustrojowa terapia fotodynamiczna, wykorzystująca tlen, fotouczulacz oraz światło. Dodatkowym pomysłem stało się wykorzystanie nanocząstek metali jako wspomagaczy terapii, tworząc nowe fotosensybilatory III generacji.

Słowa kluczowe: lekooporność, mikroorganizmy, terapia fotodynamiczna, nanocząstki

## **Antimicrobial photodynamic therapy**

### **Abstract**

Drug resistance of pathogens has become a serious problem of the 21st century. Antibiotic therapy have become an insufficient method in the fight against microbial infections. Bacterial pathogens have developed different ways of resistance to antibiotics. An increasing problem convinced scientists to look for innovative, easier and cheaper ways to inactivate of pathogens. The alternative to antibiotics may be antimicrobial photodynamic therapy, using oxygen, photosensitizer and light. An additional idea is the use of metal nanoparticles as a aiding therapy agent, creating a new third generation of photosensitizers.

Keywords: drug resistance, microorganisms, photodynamic therapy, nanoparticles

## Wpływ formy amfoterycyny B na jej toksyczność

### 1. Poszukiwanie nowych leków przeciwgrzybiczych

Wybór leku przeciwgrzybiczego zależy od wielu czynników np. miejsca występowania grzybicy, rodzaju patogenu, kosztów, dostępności danego leku czy występujących działań niepożądanych. Poszukiwanie nowych leków ma na celu zwiększenie efektu leczniczego i jednocześnie zmniejszenie jego toksyczności. Istotnym jest również zwrócenie uwagi na oporność grzybów na dany lek, gdyż organizmy te wykształciły specjalne mechanizmy umożliwiające uniknięcie działania leku [1]. Przykładowo ściana komórkowa grzyba jest gruba i zbudowana z chityny, co utrudnia przenikanie leku do wnętrza komórki [2,3]. Narastającym problemem terapii jest występowanie lekooporności z powodu stosowania leków przeciwgrzybiczych niepotrzebnie, w niepotwierdzonych diagnozach, bez specjalistycznych badań [1,4]. Do mechanizmów oporności należy również zmniejszone powinowactwo do enzymów biorących udział w budowie błony komórkowej grzyba poprzez syntezę ergosterolu oraz nadekspresja pomp wypływowo- wych mających na celu usunięcie leku z komórki [4,5]. Amfoterycyna B jest antybiotykiem polienowym o szerokim spektrum działania, a wykazywanie oporności przez komórki grzyba jest znikome i stanowi wyjątki. Dodatkowo jest to bardzo silny lek przeciwgrzybiczy stosowany w inwazyjnych chorobach grzybiczych (IFDs), a zarazem bardzo toksyczny [6,7]. Z tego powodu badania skupiają się głównie nad preparatami lipidowymi AmB o obniżonej toksyczności z zachowaniem dawki terapeutycznej, gdyż inne leki mają wąski zakres działania, są stosowane w grzybicach miejscowych będących mniejszym zagrożeniem zdrowia i życia pacjentów rozpatrując w aspekcie występowania działań niepożądanych. Amfoterycyna B stosowana jest od lat 60. XX wieku, natomiast ze względu na jej toksyczność ograniczono jej stosowanie [8]. Stworzenie preparatów lipidowych o zmniejszonej toksyczności oraz wynalezienie nowych, dużo droższych leków przeciwgrzybiczych tworzących interakcje z innymi lekami sprawiło, że częstotliwość jej stosowania ponownie się zwiększyła [9].

---

<sup>1</sup> agna96@vp.pl, Zakład Biologii Molekularnej, Młoda Farmacja Sosnowiec, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.biolmol.sum.edu.pl.

<sup>2</sup> gianikowska@sum.edu.pl, Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.zakladchemiianalitycznej.sum.edu.pl.

<sup>3</sup> jgola@sum.edu.pl, Zakład Biologii Molekularnej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.biolmol.sum.edu.pl.

<sup>4</sup> jolantapudelko@gmail.com, Katedra i Zakład Biochemii, Młoda Farmacja Sosnowiec, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.biochemia.sum.edu.pl.

## **2. Toksyczność preparatów przeciwgrzybiczych**

Leki przeciwgrzybicze dzielą się na 5 klas tj. antybiotyki, azolowe leki przeciwgrzybicze, echinokandyny, pochodne alliloaminy i inne leki przeciwgrzybicze. Każdą klasę charakteryzuje odmienny mechanizm działania, toksyczność, zakres działania oraz zastosowanie [6]. Większość klas ma szeroki zakres działania, ale najlepiej działa w określonych schorzeniach poszczególnych układów. W celu wyjaśnienia powodu toksyczności niezbędne jest przeanalizowanie mechanizmów działania poszczególnych leków, ich budowy oraz cech charakterystycznych.

Pierwsza klasa leków przeciwgrzybiczych to antybiotyki, które dzielą się na antybiotyki polienowe i antybiotyki o budowie spiranowej. Najważniejszym antybiotykiem polienowym jest amfoterycyna B, która jest znana z szerokiego spektrum działania i dużej toksyczności. Stosuje się ją tylko w najpoważniejszych chorobach wywołanych przez grzyby np. IFDs, czyli inwazyjnej chorobie grzybiczej. W przypadku terapii tym antybiotykiem korzyści leczenia nim powinny być większe niż ryzyko działań niepożądanych, pogarszających stan zdrowia pacjenta [7]. Antybiotyki polienowi – w tym amfoterycyna B – działają na błonę komórkową grzyba poprzez bezpośrednią interakcję z ergosterolem, prowadzącą do tworzenia porów i zakłócenia potencjału transbłonowego na skutek utraty jonów [3]. Natomiast mechanizm działania antybiotyków o budowie spiranowej, w odróżnieniu od antybiotyków polienowych, polega na uszkodzeniu ściany komórkowej grzyba [6]. Proces ten jest skutkiem zahamowania biosyntezy chityny, zahamowania biosyntezy RNA oraz zaburzenia syntezy białek w komórkach grzyba. Do tej grupy leków należy gryzeofulwina, która jest metabolizowana przez cytochrom P-450, co może przyczyniać się do jej dużej toksyczności [10].

Do grupy azolowych leków przeciwgrzybiczych należą leki imidazolowi i triazolowe, oba o szerokim spektrum działania [11]. Eliminują one większość grzybów patogennych dla człowieka, lecz ze względu na dużą toksyczność są stosowane tylko w leczeniu miejscowym. Występuje różnica w nasileniu działania leczniczego pomiędzy lekami imidazolowymi, a triazolowymi. Wynika ona z różnicy w budowie, gdyż pochodne triazolowe wykazują większą aktywność przeciwgrzybiczą ze względu na zastąpienie grupy imidazolowej podwójną grupą triazolową [11]. Zapewnia to większą skuteczność leków należących do triazoli, których przedstawicielami są flukonazol, itraconazol czy vorikonazol [11-13]. Leki te blokują syntezę ergosterolu zawartego w błonie komórkowej grzyba poprzez łączenie się z cytochromem P-450. W wyniku tego mechanizmu może dojść do nagromadzenia się w środowisku reakcji toksycznych steroli [14].

Kolejną klasą grzybów są echinokandyny, do których należą kaspofungina, anidulafungina i mykafungina. Hamują one syntezę 1,3- $\beta$ -D-glukanu, który jest niezbędnym składnikiem ściany komórkowej niektórych grzybów [15,16]. Brak syntezy glukanu powoduje degradację komórki grzyba. Jednak czynnikiem ograniczającym stosowanie echinokandyn nie jest toksyczność, gdyż wywołują mało skutków ubocznych – a występowanie oporności na ten rodzaj antybiotyku oraz mniejsze efekty terapeutyczne w porównaniu do amfoterycyny B [17].

Ostatnią sprecyzowaną grupą leków są pochodne alliloaminy np. terbinafina, które hamują powstawanie ergosterolu w sposób niezależny od cytochromu P-450, lecz



w wyniku tej reakcji dochodzi do akumulacji toksycznego skwalenu, co może być ograniczeniem w stosowaniu tej grupy leków [18].

Amfoterycyna B jako jedyny lek ma szerokie spektrum działania, nie podlega mechanizmom oporności, jest tania w porównaniu do innych leków przeciwgrzybiczych, łatwo dostępna nawet w uboższych krajach na świecie, a jej połączenia z innymi substancjami i strukturami lipidowymi nie tworzą niezgodności oraz obniżają skutecznie jej toksyczność. Z tego powodu trwają liczne badania nad zastosowaniem jej różnych form, które mają za zadanie utrzymać efekt leczniczy i skuteczność, a zmniejszyć ryzyko wystąpienia działań niepożądanych [19, 20].

### **3. Amfoterycyna B – podstawowe informacje**

Amfoterycyna B (AmB) to jeden z najskuteczniejszych antybiotyków przeciwgrzybiczych stosowanych w ciężkich układowych lub głębokich zakażeniach grzybiczych ze względu na szerokie spektrum działania. Poza leczniczymi właściwościami AmB, wykazuje ona tak jak wszystkie leki działania niepożądane, a mianowicie jest silnie nefrotoksyczna – uszkadza błony komórkowe ludzkich komórek i wywiera działanie prozapalne. Z tego powodu w lecznictwie stosowane są głównie jej formy lipidowe tj. forma liposomalna, forma kompleksu lipidowego, forma koloidalna. Trwają badania nad połączeniem AmB z jonami  $\text{Cu}^{2+}$  oraz innymi formami np. NanoDisk lub amfoterycyna B w ciekłych kryształach, które mają być bezpieczniejszą formą terapii [21-23].

Amfoterycyna B należy do grupy antybiotyków polienowych, czyli związków posiadających wielocząłkowy pierścień laktonowy zawierający w części hydrofilowej grupy hydroksylowe i sprzężone wiązania podwójne. Swoją największą aktywność amfoterycynie B zapewniają grupy hydroksylowe w miejscach C-8, C-9 i C-10. Wspomniany pierścień laktonowy jest połączony glikozydowo z amino sacharydem – mykozaminą (3,6-dideoksy-3-amino-D-mannozą) [24]. Ograniczenie klinicznego wykorzystania tego leku wynika z silnych właściwości nefrotoksycznych, gdyż liczne badania wskazują na występowanie ostrej niewydolności nerek, która często prowadzi do śmierci pacjenta. Działania niepożądane leczenia amfoterycyną B, które również zagrażają zdrowiu i życiu pacjenta obejmują uszkodzenia wątroby [25].

### **4. Mechanizm działania**

Grzybobójczy mechanizm działania antybiotyków polienowych (w tym amfoterycyny B) polega na tworzeniu kompleksów leku ze sterolami (ergosterolem) błon komórkowych grzybów i zmianie przepuszczalności błony [26]. Antybiotyki polienowe łączą się ze sterolami błonowymi, tworzą w błonie komórek grzyba pory przepuszczalne dla jonów. Upośledzenie funkcji ochronnej błon komórkowych powoduje wydostanie się na zewnątrz składników komórkowych, przerwanie procesów metabolicznych i śmierć komórki [27]. Jednak amfoterycyna B poprzez zdolność do wiązania z cholesterolem zawartym w komórkach, uszkadza błony komórkowe również ludzkich komórek m.in. RPTEC-nabłonkowych komórek kanalika proksymalnego nerki. Natomiast mechanizm anatomiczny amfoterycyny B związany jest z obkurczaniem naczyń nerkowych (głównie tętniczki doprowadzającej), któremu często towarzyszą zespoły cewkowe charakteryzujące się upośledzeniem ząszczania

i zakwaszania moczu oraz nieprawidłowym jego składem. W moczu pojawiają się cukry oraz aminokwasy, a gospodarka wodno-elektrolitowa jest zaburzona [28]. Na poziomie molekularnym amfoterycyna B bierze udział w indukcji stanu zapalnego poprzez ekspresję cytokin prozapalnych tj. TNF- $\alpha$  (ang. *Tumor Necrosis Factor*) czynnik martwicy nowotworów, IL-1 (interleukina-1), IL-6, IL8 [25, 29].

## 5. Preparaty amfoterycyny B

### 5.1. D-Amb – dezoksycholan amfoterycyny B – klasyczna postać leku

Klasyczną formą amfoterycyny B jest dezoksycholan amfoterycyny (D-AmB), który został wprowadzony do lecznictwa w 1959 r. [8]. Mechanizm jego działania polega na bezpośrednim działaniu na komórkę co prowadzi do jej destrukcji. Jest to najbardziej toksyczna postać amfoterycyny B działająca silnie nefrotoksycznie poprzez powinowactwo do steroli, które występują w dużej ilości w komórkach nerek. Odradza się stosowanie tej formy amfoterycyny ze względu na liczne doniesienia o uszkodzeniu nerek i przewadze działań niepożądanych nad właściwościami leczniczymi [30]. Dezoksycholan amfoterycyny B wykazuje zależną od stężenia aktywność przeciwgrzybiczą, gdyż równowaga między efektami leczenia a skutkami ubocznymi zależy również od podanej dawki [31]. W porównaniu do innych form amfoterycyny B D-AmB jest łatwo dostępny i tańszy niż preparaty lipidowe, dlatego jest często stosowany w uboższych krajach.

### 5.2. Preparaty lipidowe

Preparaty lipidowe wykazują mniejszą toksyczność niż D-AmB, dlatego są częściej stosowane w lecznictwie. Formy lipidowe w miejscu zakażenia są tak samo toksyczne dla komórek grzyba jak D-AmB. Ich minusem jest cena, ponieważ są droższe niż klasyczna forma leku oraz mniej dostępne w krajach uboższych, gdzie ich zapotrzebowanie jest największe ze względu na częstsze zachorowania [32].

#### 5.2.1. Forma lizosomalna – Ambisome, L – AmB

Forma liposomalna amfoterycyny B (L-AmB) jest najmniej toksyczna, dlatego też ryzyko wystąpienia działań niepożądanych jest najbardziej obniżone spośród wszystkich znanych preparatów tego leku. Składa się ona z cząsteczek dezoksycholanu amfoterycyny B umieszczonych w liposomach, których wymiary wynoszą 60-80 nm [2, 33]. AmB ma długi okres półtrwania w krwiobiegu i jest powoli usuwana, dlatego może być bezpiecznie stosowana w dużych dawkach [2].

Mechanizm wnikania amfoterycyny B do komórek grzyba nie jest do końca poznany. Wśród badaczy istnieją dwie teorie działania L-Amb. Pierwszą z nich jest zbliżenie się amfoterycyny B zawartej w liposomach do ściany komórkowej grzyba, a następnie rozpad liposomu i wniknięcie cząsteczki amfoterycyny B do wnętrza komórki [34, 35]. Natomiast inni badacze na podstawie zdjęć z mikroskopu elektronowego wnioskują, iż liposomy wraz z amfoterycyną B wnikają do komórki w całości przez kanał błonowy [2]. Jednakże jeszcze jednym, niewyjaśnionym problemem pozostaje gruba ściana komórkowa i sposób przenikania przez nią liposomów z amfoterycyną B.

W leczeniu stosowany jest preparat Ambisome w postaci proszku do sporządzania roztworów do infuzji, jednak wysokie koszty są ograniczeniem w jego stosowaniu w krajach rozwijających się [33, 36]. Stężenie L-AmB jest najwyższe w wątrobie i śledzionie, natomiast niższe w nerkach i płucach. Zalecana dawka terapeutyczna to 3-6 mg na kilogram masy ciała na dobę [25].

### 5.2.2. Forma koloidalna

Od czasu znalezienia formy liposomalnej i przeprowadzenia badań porównywania toksyczności pomiędzy poszczególnymi formami amfoterycyny B, forma koloidalna (ABCD – ang. *Amphotericin B Colloidal Dispersion*) przestała być stosowana. Również spadło zainteresowanie badaczy tą formą leku, gdyż najwięcej badań nad formą koloidalną prowadzono pod koniec lat 90. XX wieku. Forma koloidalna ma postać cienkich struktur w kształcie dysku o średnicy 120 nm [2]. ABCD jest szybko wchłaniana przez makrofagi wątrobowe i szybko usuwana przez komórki układu siateczkowo-śródbłonkowego [2, 25, 37]. Badania donoszą, że forma koloidalna jest mniej toksyczna niż D-AmB, natomiast różnica jest niewielka [25]. Preparatami koloidalnej amfoterycyny B są Amphocil oraz Amphotec, których dawki nie powinny przekraczać 3-4 mg na kilogram masy ciała na dobę [25].

### 5.2.3. Forma kompleksu lipidowego

Forma kompleksu lipidowego (ABLC – ang. *Amphotericin B Lipid Complex*) jest największym preparatem lipidowym o wymiarach 1600-11000 nm [2, 25]. Z powodu dużego rozmiaru jest szybko wychwytywana przez makrofagi i zostaje w tkankach układu fagocytarnego, takich jak wątroba i śledziona. Jej wysokie stężenie obserwuje się również w płynie płucnym [2, 25]. Toksyczność tej formy jest zdecydowanie niższa niż klasycznej formy amfoterycyny B, natomiast ABLC wykazuje takie same właściwości przeciwgrzybicze jak D-AmB [2]. Preparatem kompleksu lipidowego amfoterycyny B stosowanym w leczeniu jest Abelcet. Zalecana dawka terapeutyczna ABLC wynosi 5 mg na kilogram masy ciała na dobę. Podawany jest przez lekarza lub pielęgniarkę w infuzyjnych wlewach dożylnych (może być rozcieńczany glukozą), jednak z zachowaniem ostrożności [25].

### 5.2.4. Kompleksy AmB z jonami

Kompleksy AmB z jonami miedzi  $\text{Cu}^{2+}$  zmniejszają nefrotoksyczność na poziomie molekularnym. Wykazują one mniejszą toksyczność dla nabłonkowych komórek kanalka proksymalnego nerki [21]. AmB- $\text{Cu}^{2+}$  jest stabilny w fizjologicznym pH i wykazuje dużą aktywność przeciwgrzybiczą wobec grzybów *Candida albicans* [21]. Ich działanie nefrotoksyczne jest związane również ze współwystępowaniem cytokin prozapalnych np. TNF- $\alpha$ , który zapoczątkowuje kaskadę reakcji zapalnej, a badania wykazały zmniejszenie uwalniania rozpuszczalnego receptora sTNFR1 przez AmB- $\text{Cu}^{2+}$  [21]. Kompleks ten bierze również udział w obniżaniu toksyczności poprzez wpływ na stres oksydacyjny. AmB- $\text{Cu}^{2+}$  zmniejsza regulację genów związanych z występowaniem stresu oksydacyjnego w komórkach nerki [21, 27]. Natomiast odpowiednio podwyższony poziom cytokin prozapalnych jest potrzebny do odpowiedzi immunologicznej przeciwko komórkom grzyba. AmB- $\text{Cu}^{2+}$  zwiększa stężenie mRNA TGF- $\beta$ 1 oraz TGFBR1 i TGFBR2, które biorą udział w regulacji

reakcji zapalnej [27]. Kompleks z jonami miedzi (II) oprócz wpływu na ekspresję genów związanych ze szlakiem TGF- $\beta$ 1 może również indukować mechanizmy naprawcze [27]. Dodatkowo AmB-Cu<sup>2+</sup> wpływa na miRNA i mRNA nabłonkowych komórek kanalika proksymalnego nerki [38]. Kompleks AmB-Cu<sup>2+</sup> jest w sferze badań, lecz może należeć w przyszłości do preparatów obniżających toksyczność amfoterycyny B ze szczególnym uwzględnieniem ochrony nerek.

## 6. Toksyczność wywołana amfoterycyną B

AmB nawet w dawkach terapeutycznych wywiera działania niepożądane tj. zakrzepowe zapalenie żył, bóle głowy, bóle mięśniowe i stawowe, gorączkę z dreszczami, zaburzenia żołądkowo-jelitowe. Najgroźniejszymi z nich są uszkodzenia nerek i wątroby [39].

### 6.1. Nefrotoksyczność

Nefrotoksyczność to negatywne działanie leków powodujące dysfunkcję nerek. Przykładem takiej nefrotoksyczności jest nefrotoksyczność wywołana amfoterycyną B, której nasilenie zależy od dawki. Terapeutyczne działanie AmB zależy również od dawkowania, gdyż przekroczenie dawki może prowadzić do zmniejszenia skuteczności leku bez względu na jego formę lub do pogorszenia stanu zdrowia na skutek zwiększenia toksyczności. Nefrotoksyczne działanie amfoterycyny B jest nasilone ze względu na powinowactwo amfoterycyny B do steroli zawartych w błonie komórkowej. Komórki nerki charakteryzują się dużą ilością cholesterolu, dlatego amfoterycyna B poprzez powinowactwo do steroli powoduje dysfunkcje nerek poprzez destrukcyjne działanie na ich komórki [2].

Amfoterycyna B wykazuje działanie prozapalne, powodując wzrost aktywności TNF, IL-1 oraz aktywację makrofagów. To zapoczątkowuje kaskadę reakcji zapalnej, w wyniku której następuje wydzielanie kolejnych czynników zapalnych, takich jak prostaglandyny, interleukiny (IL-6, IL-8) [40,41]. Indukcja cytokin prozapalnych powoduje uszkodzenie komórek nerkowych, co prowadzi do apoptozy.

AmB powoduje również spadek współczynnika filtracji kłębuszkowej (GFR) na skutek skurczu tętniczki doprowadzającej do kłębuszka nerkowego [42,43].

Kolejną reakcją zachodzącą w organizmie, która sprzyja uszkodzeniu nerek jest stres oksydacyjny. Wolne rodniki są to bardzo reaktywne cząsteczki posiadające niesparowany elektron. Powstają w odpowiedzi na czynnik zewnętrzny np. promieniowanie jonizujące, ultrafioletowe, wysoką temperaturę lub w wyniku metabolizmu leków (np. amfoterycyny B). Nadmiar wolnych rodników występuje podczas stresu oksydacyjnego i przyczynia się do rozwoju wielu chorób, w tym dysfunkcji nerek [44, 45].

Nefrotoksyczność oraz inne działania niepożądane częściej rozwijają się u pacjentów przyjmujących amfoterycynę B, którzy chorują na inne choroby, głównie zakażenie ludzkim wirusem obniżenia odporności HIV (ang. *Human Immunodeficiency Virus*). Najczęściej występującą chorobą nerek po zastosowaniu amfoterycyny B u pacjentów zarażonych HIV jest ostre uszkodzenie nerek (AKI, ang. *Acute kidney Injury*) [42, 46, 47].

## **6.2. Hepatotoksyczność**

AmB aktywuje makrofagi, a one pobudzają do wydzielania TNF- $\alpha$ , który jest silnym promotorem reakcji zapalnej i występuje w wielu rodzajach uszkodzeń wątroby. Pobudza to komórki Kupffera w wątrobie do odpowiedzi na stan zapalny z wydzielaniem IL-6. Interleukina ta jest wydzielana przez komórki Kupffera jako regulator odpowiedzi ostrej fazy w wątrobie. Prowadzi to do zapalenia wątroby i jej zwłóknienia z powodu wzrostu ilości cytokin prozapalnych, degradacji białek macierzy zewnątrzkomórkowej oraz hamowania proteaz [48]. Hepatotoksyczność występuje głównie u pacjentów, którzy oprócz grzybicy mają również inne choroby lub ich wątroba przed leczeniem była w gorszym stanie. Przeważnie po jednorazowej dawce AmB prawidłowo funkcjonująca wątroba nie zostaje uszkodzona [49].

## **7. Perspektywy**

Po sukcesie zastosowania AmB w preparatach lipidowych, które skutkują obniżoną nefrotoksycznością, naukowcy rozpoczęli badania nad jej połączeniami z innymi substancjami. Początkowo wyniki nie były zadowalające, gdyż AmB ma tak silne działanie toksyczne na organizm, że nie każda substancja działająca nefroprotekcyjnie jest w stanie skutecznie obniżyć ryzyko wystąpienia jej działań niepożądanych [50, 51].

Innym związkiem, który badano pod względem obniżenia toksyczności AmB jest ester fenyłowy kwasu kawowego. Jest on aktywnym składnikiem propolisu, a przeprowadzone do tej pory badania wskazują na jego działanie nefroprotekcyjne w uszkodzeniach nerek spowodowanych AmB. Mechanizm działania nie jest jeszcze całkowicie poznany, ale wykazano jego wpływ na stres oksydacyjny powstały po zastosowaniu AmB [52].

Ciekawym połączeniem jest również zastosowanie askorbinianu z AmB, gdyż wykazano wspomaganie działania przeciwgrzybiczego przez askorbinian. Askorbinian może być stosowany w wysokich dawkach ze względu na jego małą toksyczność, a zastosowany w terapii skojarzonej z AmB wykazał osłabienie nasilenia kandydozy podczas sepsy. Askorbinian poprzez wykazywanie efektu synergicznego do AmB pozwala na obniżenie jej dawki toksycznej z zachowaniem takiego samego efektu leczniczego [53].

Ponadto, istotna jest również regeneracja nerek po ich uszkodzeniu przez AmB, dlatego coraz częściej naukowcy zajmujący się tym problemem interesują się rolą mezenchymalnych komórek macierzystych w tym procesie. Mezenchymalne komórki macierzyste ze względu na swoje właściwości, takie jak wydzielanie czynników parakrynnych poprawiających ukrwienie uszkodzonego narządu, czy immunomodulację, mogą dawać możliwość regeneracji lub leczenia uszkodzeń powstających w trakcie terapii AmB [54].

## **8. Podsumowanie**

Toksyczność wywołana AmB jest istotnym problemem, gdyż jest to najsilniejszy antybiotyk przeciwgrzybiczy o szerokim zakresie działania i małym prawdopodobieństwie wystąpienia oporności przez komórki grzybów. Z tego powodu istotne jest poszukiwanie nowych postaci leków obniżających toksyczność oraz odpowiedniej ich dawki, której zastosowanie będzie miało najlepszy efekt terapeutyczny i najbardziej obniżone ryzyko wystąpienia działań niepożądanych.

## Literatura

1. Fay V. da S., Rodrigues D.M.G., Gonçalves S.M.B., Gregianini T.S., Bonamigo R.R., *Drug susceptibility in emerging fungal infections: tests with fluconazole, itraconazole, and amphotericin B*, An. Bras. Dermatol., 93, 3, 2018, 462-464.
2. Sulik-Tyszka B., Wróblewska M., *Liposomal Amphotericin B – putative mechanism of entry into fungal cells*, Zakazenia XXI Wieku, 2, 2018, 59-65.
3. Kinoshita H., Yoshioka M., Ihara F., Nihira T., *Cryptic antifungal compounds active by synergism with polyene antibiotics*, J. Biosci. Bioeng., 121, 4, 2016, 394-398.
4. Beardsley J., Halliday C.L., Chen S.C.-A., Sorrell T.C., *Responding to the emergence of antifungal drug resistance: perspectives from the bench and the bedside*, Future Microbiol., 13, 10, 2018, 1175-1191.
5. Bhattacharya S., Esquivel B.D., White T.C., *Overexpression or Deletion of Ergosterol Biosynthesis Genes Alters Doubling Time, Response to Stress Agents, and Drug Susceptibility in Saccharomyces cerevisiae*, mBio, 9, 4, 2018.
6. Kyriakidis I., Tragiannidis A., Munchen S., Groll A.H., *Clinical hepatotoxicity associated with antifungal agents*, Expert Opin. Drug Saf., 2016, 1-17.
7. Steimbach L.M. i in., *Efficacy and safety of amphotericin B lipid-based formulations – A systematic review and meta-analysis*, Mycoses, 60, 3, 2017, 146-154.
8. Newton P.J., Harris C., Morris J., Denning D.W., *Impact of liposomal amphotericin B therapy on chronic pulmonary aspergillosis*, J. Infect., 73, 5, 2016, 485-495.
9. Allen U., *Antifungal agents for the treatment of systemic fungal infections in children*, 15, 9, 2010, 6.
10. Grandner J.M., Cacho R.A., Tang Y., Houk K.N., *Mechanism of the P450-Catalyzed Oxidative Cyclization in the Biosynthesis of Griseofulvin*, ACS Catal., 6, 7, 2016, 4506-4511.
11. Campeste C. i in., *Analysis of imidazoles and triazoles in biological samples after MicroExtraction by packed sorbent*, J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 32, 1, 2017, 1053-1063.
12. Haegler P., Joerin L., Krähenbühl S., Bouitbir J., *Hepatocellular Toxicity of Imidazole and Triazole Antimycotic Agents*, Toxicol. Sci., 157,1, 2017, 183-195.
13. Lempers V.J. i in., *Drug-interactions of azole antifungals with selected immunosuppressants in transplant patients: strategies for optimal management in clinical practice*, Curr. Opin. Pharmacol., 24, 2015, 38-44.
14. Seyedmousavi S., Mouton J.W., Melchers W.J.G, Brüggemann R.J.M., Verweij P.E., *The role of azoles in the management of azole-resistant aspergillosis: From the bench to the bedside*, Drug Resist. Updat., 17, 3, 2014, 37-50.
15. Papp C., Kocsis K., Tóth R., Bodai L., Willis J.R., Ksiezopolska E., Lozoya-Pérez N.E., Vágvölgyi C., Mora Montes H., Gabaldón T., Nosanchuk J.D., Gácsér A., *Echinocandin-Induced Microevolution of Candida parapsilosis Influences Virulence and Abiotic Stress Tolerance*, mSphere, 3, 6, 2018.
16. Perlin D.S., *Mechanisms of echinocandin antifungal drug resistance: Mechanism of echinocandin drug resistance*, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1354, 1, 2015, 1-11.
17. Cornely O.A., Bassetti M., Calandra T., Garbino J., Kullberg B.J., Lortholary O., Meersseman W., Akova M., Arendrup M.C., Arikan-Akdagli S., Bille J., Castagnola E., Cuenca-Estrella M., Donnelly J.P., Groll A.H., Herbrecht R., Hope W.W., Jensen H.E., Lass-Floerl C., Petrikos G., Richardson M.D., Roilides E., Verweij P.E., Viscoli C., Ullmann A.J., *ESCMID\* \*This guideline was presented in part at ECCMID 2011. European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases. guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: non-neutropenic adult patients*, Clin. Microbiol. Infect., 18, 2012, 19-37.
18. Akiyoshi T., Ishiuchi M., Imaoka A., Ohtani H., *Variation in the inhibitory potency of terbinafine among genetic variants of CYP2D6*, Drug Metab. Pharmacokin., 30, 4, 2015, 321-324.

19. Kaur L, Abhijeet, Jain SK, *Safe and Effective Delivery of Amphotericin B: A Survey of Patents.*, Recent Pat Nanotechnol, t. 3, nr 11, s. 214-234.
20. Liu M., Chen M., Yang Z., *Design of amphotericin B oral formulation for antifungal therapy*, Drug Deliv., 24, 1, 2017, 1-9.
21. Gola J., Strzałka-Mrozik B., Kruszniewska-Rajs C., Janiszewski A., Skowronek B., Gagoś M., Czernel G., Mazurek U., *A new form of amphotericin B – the complex with copper (II) ions – downregulates sTNFR1 shedding and changes the activity of genes involved in TNF-induced pathways*, Pharmacol. Rep., 69, 1, 2017, 22-28.
22. Tang X., Dai J., Xie J., Zhu Y., Zhu M., Wang Z., Xie Ch., Yap A., Liu T., Wang X., Chen L., Jiang Q., Wang S., Liang Y., Xu C., *Enhanced Antifungal Activity by Ab-Modified Amphotericin B-Loaded Nanoparticles Using a pH-Responsive Block Copolymer*, Nanoscale Res. Lett., 10, 1, 2015.
23. Chaudhari M.B., Desai P.P., Patel P.A., Patravale V.B., *Solid lipid nanoparticles of amphotericin B (AmbiOnp): in vitro and in vivo assessment towards safe and effective oral treatment module*, Drug Deliv. Transl. Res., 2015.
24. Tevyashova A.N., Isakova E.B., Zotchev S.B., Preobrazhenskaya M.N., Pereverzeva E.R., Mirchink E.P., Elena B., Trenin A.S., Galatenko O.A., Treshalin I.D., Solovieva S.E., Printsevskaya S.S., Reznikova M.I., Tevyashova A.N., Olsufyeva E.N., Svetlana E.B., *Structure-Antifungal Activity Relationships of Polyene Antibiotics of the Amphotericin B Group*, Antimicrob. Agents Chemother., 57, 8, 2013, 3815-3822.
25. Hamill R.J., *Amphotericin B Formulations: A Comparative Review of Efficacy and Toxicity*, Drugs, 73, 9, 2013, 919-934.
26. Mesa-Arango A.C., Scorzoni L., Zaragoza O., *It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug*, Front. Microbiol., 3, 2012.
27. Gola J., Strzałka-Mrozik B., Wieczorek E., Kruszniewska-Rajs C., Adamska J., Gagoś M., Czernel G., Mazurek U., *Amphotericin B – copper (II) complex alters transcriptional activity of genes encoding transforming growth factor-beta family members and related proteins in renal cells*, Pharmacol. Rep., 69, 6, 2017, 1308-1314.
28. Antonowicz-Juchniewicz J., Jodkowska A., Dobrosława K., *Nefropatie wtórne w praktyce lekarza medycyny pracy I. Nefropatie wtórne w przebiegu narażenia zawodowego*, Med. Pr., 4, 57, 2006, 389-400.
29. Menotti J., Alanio A., Sturny-Leclere A., Vitry S., Sauvage F., Barrat G., Bretagne S., *A cell impedance-based real-time in vitro assay to assess the toxicity of amphotericin B formulations*, Toxicol. Appl. Pharmacol., 334, 2017, 18-23.
30. Rothenbühler C., Held U., Manz M.G., Schanz U., Gerber B., *Continuously infused amphotericin B deoxycholate for primary treatment of invasive fungal disease in acute myeloid leukaemia*, Hematol. Oncol., 36, 2, 2018, 471-480.
31. Al-Nakeeb Z., Petraitis V., Goodwin J., Petraitiene R., Walsh T.J., Hope W.W., *Pharmacodynamics of Amphotericin B Deoxycholate, Amphotericin B Lipid Complex, and Liposomal Amphotericin B against Aspergillus fumigatus*, Antimicrob. Agents Chemother., 59, 5, 2015, 2735-2745.
32. Chávez-Fumagalli M.A., Ribeiro T.G., Castilho R.O., Fernandes S.O.A., Cardoso V.N., Coelho C.S.P., Mendonça D.V.C., Soto M., Tavares C.A.P., Faraco A.A.G., Coelho E.A.F., *New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment*, Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 48, 3, 2015, 235-242.
33. Satpati A., Das S., Goswami R.P., Goswami R.P., Rahman M., *Short-Course Treatment Regimen of Indian Visceral Leishmaniasis with an Indian Liposomal Amphotericin B Preparation (Fungisome™)*, Am. J. Trop. Med. Hyg., 94, 1, 2016, 93-98.
34. Grela E., Wieczor M., Luchowski R., Zielińska J., Barzycka A., Grudzinski W., Nowak K., Tarkowski P., Czub J., Gruszecki W.I., *A Mechanism of Binding of an Antifungal Antibiotic Amphotericin B to Lipid Membranes: An Insight from Combined Single Membrane Imaging, Micro-Spectroscopy, and Molecular Dynamics*, Mol. Pharm., 2018, 47.

35. Stone N.R.H., Bicanic T., Salim R., Hope W., *Liposomal Amphotericin B (AmBisome®): A Review of the Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Clinical Experience and Future Directions*, *Drugs*, 76, 4, 2016, 485-500.
36. Diro E., Blesson S., Edwards T., Ritmeijer K., Fikre H., Admassu H., Kibret A., Ellis S.J., Bardonneau C., Zijlstra E.E., Soipei P., Mutinda B., Omollo R., Kimutai R., Omwalo G., Wasunna M., Tadesse F., Alves F., Strub-Wourfgaft N., Hailu A., Alexander N., Alvar J., *A randomized trial of AmBisome monotherapy and AmBisome and miltefosine combination to treat visceral leishmaniasis in HIV co-infected patients in Ethiopia*, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 13,1, 2019.
37. Weiler S., U berlacher E., Schöfmann J., Stienecke E., Dunzendorfer S., Joannidis M., Bellmanna R., *Pharmacokinetics of Amphotericin B Colloidal Dispersion in Critically Ill Patients with Cholestatic Liver Disease*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 56, 10, 2012, 5414-5418.
38. Gola J.M., Strzałka-Mrozik B., Kruszniewska-Rajs C., Adamska J., Gagoś M., Mazurek U., *Differential expression of microRNAs and their predicted targets in renal cells exposed to amphotericin B and its complex with copper (II) ions*, *Toxicol. Mech. Methods*, 27, 7, 2017, 537-543.
39. Janiec W., *Kompendium Farmakologii*, PZWL, 2015.
40. Li Y., Chi G., Shen B., Tian Y., Feng H., *Isorhamnetin ameliorates LPS-induced inflammatory response through downregulation of NF- $\kappa$ B signaling*, *Inflammation*, 39, 4, 2016, 1291-1301.
41. Yang Y., Yang Y., Ma Z., Yang G., Wan J., Li G., Du L., Lu P., *Alginate oligosaccharide indirectly affects toll-like receptor signaling via the inhibition of microRNA-29b in aneurysm patients after endovascular aortic repair*, *Drug Des. Devel. Ther.*, 11, 2017, 2565-2579.
42. Schutz C., Boulware D.R., Huppler-Hullsiek K., Hohenberg M., Rhein J., Taseera K., Thienemann F., Muzoora L., Meya D.B., Meintjes G., *Acute Kidney Injury and Urinary Biomarkers in HIV-associated Cryptococcal Meningitis*, *Open Forum Infect Dis*, 4, 3, 2017.
43. Grazziotin L.R., Moreira L.B., Ferreira M.A.P., *Comparative effectiveness and safety between amphotericin B lipid – formulations: a systematic review*, *Int. J. Technol. Assess. Health Care*, 34,3, 2018, 343-351.
44. Karpińska A., Gromadzka G., *Stres oksydacyjny i naturalne mechanizmy antyoksydacyjne – znaczenie w procesie neurodegeneracji. Od mechanizmów molekularnych do strategii terapeutycznych*, *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 2013, 11.
45. Jopkiewicz S., *Stres oksydacyjny Część I. Stres oksydacyjny jako czynnik rozwoju chorób cywilizacyjnych*, *Med. Śr. – Environ. Med.*, 2, 2018, 48-52.
46. Tuon F.F., Florencio K.L., Rocha J.L., *Burden of acute kidney injury in HIV patients under deoxycholate amphotericin B therapy for cryptococcal meningitis and cost-minimization analysis of amphotericin B lipid complex*, *Med. Mycol.*, 57, 3, 2019, 265-269.
47. Botero Aguirre J.P., Restrepo Hamid A.M., *Amphotericin B deoxycholate versus liposomal amphotericin B: effects on kidney function*, *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2015.
48. Folk A., Cotoraci C., Balta C., Suciuc M., Herman H., Boldura O.M., Dinescu S., Paiusan L., Ardelean A., Hermenean A., *Evaluation of Hepatotoxicity with Treatment Doses of Flucytosine and Amphotericin B for Invasive Fungal Infections*, *BioMed Res. Int.*, 2016, 1-9.
49. Wagner J., Bell A., *Acute hepatic injury with amphotericin B deoxycholate in an immunocompetent patient*, *J. Pharmacol. Pharmacother.*, 7, 2, 2016, 112.
50. Karimzadeh I., Khalili H., Dashti-Khavidaki S., Sharifian R., Abdollahi A., Hasibi M., Khazaeipour Z., Farsei S., *N-acetyl cysteine in prevention of amphotericin – induced electrolytes imbalances: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, clinical trial*, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 70, 4, 2014, 399-408.



51. Karimzadeh I., Khalili H., Sagheb M.M., Farsaei S., *A double-blinded, placebo-controlled, multicenter clinical trial of N – acetylcysteine for preventing amphotericin B-induced nephrotoxicity*, Expert Opin. Drug Metab. Toxicol., 11, 9, 2015, 1345-1355.
52. Altuntas A., Yjlmaz H.R. Altuntag A., Uz E., Demir M., Gökçimen A., Aksu O., Bayram D.F., Sezer M.T., *Caffeic Acid Phenethyl Ester Protects against Amphotericin B Induced Nephrotoxicity in Rat Model*, BioMed Res. Int., 2014, 1-8.
53. Leelahavanichkul A., Somporn P., Bootprapan T., Tu H., Tangtanatakul P., Nuengjumng R., Worasilchai N., Tiranathanagul K., Eiam-Ong S., Levine M., Chinampon A., Srisawat N., *High-dose ascorbate with low-dose amphotericin B attenuates severity of disease in a model of the reappearance of candidemia during sepsis in the mouse*, Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol., 309, 3, 2015, R223-R234.
54. Chen C., Hou J., *Mesenchymal stem cell-based therapy in kidney transplantation*, Stem Cell Res. Ther., 7, 1, 2016.

## Wpływ formy amfoterycyny B na jej toksyczność

### Streszczenie

Poszukiwanie skutecznych leków przeciwgrzybiczych doprowadziło do ponownego zainteresowania się amfoterycyną B (AmB). W ostatnich latach prowadzone są badania nad zmniejszeniem działań niepożądanych tego antybiotyku z zachowaniem jego właściwości przeciwgrzybiczych. Doprowadziło to do powstania kilku form tego leku różniących się toksycznością, z których najistotniejszymi są preparaty lipidowe. Okazało się, że AmB jest jednym z najskuteczniejszych antybiotyków przeciwgrzybiczych stosowanych w ciężkich zakażeniach grzybiczych, takich jak inwazyjna choroba grzybicza. Klasyczną postacią leku stanowi połączenie AmB z dezoksycholaniem sodu, która oprócz właściwości leczniczych jest silnie toksyczna. Podawanie skutecznych dawek AmB często prowadzi do dysfunkcji nerek i wątroby poprzez bezpośrednie uszkodzenie błon komórkowych. Terapeutyczne działanie AmB zależy również od dawkowania, gdyż przekroczenie dawki może prowadzić do zmniejszenia skuteczności tego leku bez względu na jego formę. Celem niniejszej pracy jest przegląd literatury dotyczącej toksyczności różnych form AmB, ze szczególnym uwzględnieniem kompleksów lipidowych, liposomalnych, koloidalnych oraz z różnymi jonami, a także możliwości ich terapeutycznego zastosowania.

Słowa kluczowe: amfoterycyna B, preparaty lipidowe AmB, forma liposomalna AmB, nefrotoksyczność, hepatotoksyczność

## The effect of different forms of amphotericin B on its toxicity

### Abstract

The search for effective antifungal drugs has led to a renewed interest in amphotericin B (AmB). In recent years, research has been conducted to reduce the side effects of this antibiotic while maintaining its antifungal properties. This led to the formation of several forms of this drug that differ in toxicity, the most important of which are lipid preparations. It turned out that the AmB is one of the most effective antimycotic antibiotics used in severe fungal infections, such as invasive fungal disease. The classic form of the drug is a combination of AmB with sodium deoxycholate, which in addition to the medicinal properties is highly toxic. Administration of effective doses of AmB often leads to kidney and liver dysfunction through direct damage the cell membranes. The therapeutic effect of AmB also depends on the dosage, because exceeding the dose may lead to a decrease in the effectiveness of the drug regardless of its form. The aim of this work is to review the literature on subject of toxicity of various forms of AmB, with particular emphasis on lipid, liposomal and colloidal complexes, and connections with different ions, and also the possibility of their therapeutic use.

Keywords: amphotericin B, AmB lipid preparations, liposomal form of AmB, nephrotoxicity, hepatotoxicity

# Modyfikacje składu lipidowego bakteryjnych błon komórkowych w odpowiedzi na stres niskich temperatur

## 1. Wprowadzenie

Drobnoustroje żyjące w ekstremalnych ekosystemach, takich jak: regiony polarne, kwaśne, gorące źródła czy pustynie, narażone są na niekorzystne działanie szeregu czynników abiotycznych. Jednym z najważniejszych stresów środowiskowych jest temperatura, która oddziałuje bezpośrednio na stan fizjologiczny bakterii [1].

Jak wykazano, niska temperatura zakłóca przebieg odczytu informacji genetycznej oraz zmniejsza stopień płynności błony, która warunkuje prawidłową aktywność metaboliczną komórki. W związku z tym bakterie wykształciły szereg mechanizmów adaptacyjnych umożliwiających im przetrwanie i prawidłowy rozwój w środowiskach cechujących się niskimi temperaturami [1-3]. W tym miejscu należy podkreślić fakt, iż niekorzystny efekt działania tego czynnika abiotycznego obserwuje się również w przypadku zbyt wysokich temperatur. Ponieważ 90% objętości wód oceanów, które pokrywają około 70% powierzchni kuli ziemskiej ma temperaturę poniżej 5°C, a 15% powierzchni Ziemi stanowią regiony polarne, to wskazuje to, że najliczniej występującą grupą bakterii są drobnoustroje zdolne do wzrostu w niskich temperaturach, tj. psychrofile [2, 4, 5]. Z tych powodów niniejsza praca ma na celu scharakteryzowanie jednego z najważniejszych mechanizmów adaptacyjnych mikroorganizmów zimnolubnych, jakim jest modyfikacja składu lipidowego membran komórkowych bakterii.

## 2. Psychrofile obligatoryjne i fakultatywne

Bakterie zdolne do przeżycia w temperaturze 0°C zostały po raz pierwszy opisane w 1887 roku przez Forster'a. Kilka lat później Schmidt-Nielsen określił te bakterie terminem psychrofile. Jednakże definicja ta klasyfikowała bakterie jedynie ze względu na minimalną temperaturę wzrostu, dlatego też pojawiła się potrzeba zdefiniowania mikroorganizmów preferujących skrajnie niskie temperatury i odróżnienia ich od tych, które wykazywały jedynie tolerancję do przeżycia w takich warunkach. Organizmy, dla których minimalne, optymalne i maksymalne temperatury wynoszą odpowiednio: 0, 15 i 20°C zostały nazwane psychrofilami obligatoryjnymi, natomiast te bakterie, które cechują się zdolnością wzrostu w niskich temperaturach, ale ich optimum mieści się w zakresie 20-25°C określane są mianem psychrotrofów (psychrofilii fakultatywnych) [2, 6].

---

<sup>1</sup> martakozielbiot@gmail.com, Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, <https://www.umcs.pl/pl/biologia-i-biotechnologia.htm>.

<sup>2</sup> paulina.lipa56@gmail.com, Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, <https://www.umcs.pl/pl/biologia-i-biotechnologia.htm>.

<sup>3</sup> mon.jan@poczta.umcs.lublin.pl, Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, <https://www.umcs.pl/pl/biologia-i-biotechnologia.htm>.

Wykazano, iż najliczniej występującymi w zimnych środowiskach są Gram-ujemne  $\alpha$ -,  $\beta$ -, i  $\gamma$ -proteobakterie, np. *Alcaligenes* spp., *Antarctobacter* spp., *Aquaspirillum* spp., *Bacteroides* spp., *Colwellia* spp., *Gelidibacter* spp., *Hymenobacter* spp., *Moraxella* spp., *Moritella* spp., *Oleispira* spp., *Photobacterium* spp., *Polaribacter* spp., *Polaromonas* spp., *Pseudoalteromonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Psychrobacter* spp., *Psychroflexus* spp., *Psychromonas* spp., *Psychroserpens* spp., *Spingomonas* spp., *Shewanella* spp., *Vibrio* spp. Ponadto, zidentyfikowano również gatunki będące przedstawicielami organizmów Gram-dodatnich (*Micrococcus* spp., *Bacillus* spp.), drożdży (*Candida* spp., *Cryptococcus* spp.), grzybów (*Penicillium* spp., *Cladosporium* spp.) oraz archeonów (*Halorubrum* spp., *Methanococcoides* spp.) [5, 7, 8].

### **3. Skutki ekspozycji bakterii na niskie temperatury**

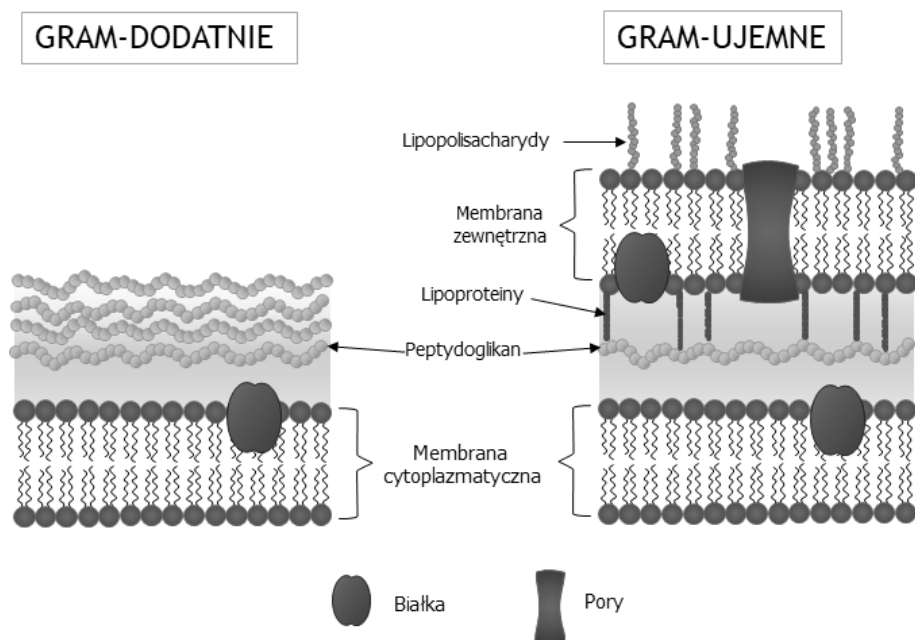
W wyniku oddziaływania niskich temperatur na komórki bakteryjne dochodzi do zmniejszenia płynności błon komórkowych, co skutkuje zaburzeniem takich procesów, jak: transport (czynny oraz bierny), odbieranie bodźców zewnątrzkomórkowych, pobieranie substancji odżywczych oraz prawidłowego przebiegu procesów komórkowych (głównie łańcucha transportu elektronów podczas oddychania). Ponadto, obserwuje się powstawanie mechanicznych uszkodzeń komórek na skutek tworzenia się kryształków lodu oraz zmniejszenia szybkości reakcji enzymatycznych, tempa transkrypcji i translacji mRNA oraz replikacji DNA, w wyniku zwiększenia sztywności struktury drugorzędowej kwasów nukleinowych [3, 5, 9-14]. Wszystkie wymienione procesy prowadzą do utraty właściwości funkcjonalnych bakterii. Dlatego mikroorganizmy te wykształciły szereg mechanizmów adaptacyjnych umożliwiających im przeżycie w niskich temperaturach. Do najlepiej scharakteryzowanych mechanizmów adaptacyjnych bakterii psychrofilnych zaliczamy: modyfikację składu lipidów błon komórkowych, zmiany strukturalne enzymów i syntezę szeregu specyficznych białek, takich jak: białka szoku zimna (ang. *Cold Shock Proteins*, CSPs), białka zapobiegające zamarzaniu (ang. *Antifreeze Proteins*, AFP) nazywane inaczej białkami termicznej histerezy (ang. *Thermal Hysteresis Proteins*, THPs) [3, 4, 14-17].

### **4. Błona komórkowa**

Występowanie cytoplazmatycznych błon komórkowych jest wspólną cechą wszystkich organizmów żywych, a ich podstawową funkcją jest zapewnienie naturalnej bariery między wnętrzem komórki a środowiskiem zewnętrznym. Ponadto, struktury te biorą udział w kontroli szeregu innych procesów komórkowych, takich jak: transport i dyfuzja niskocząsteczkowych związków niepolarnych, przekazywanie sygnałów między komórkami, czy sekrecja białek [10, 18].

Gram-dodatnie mikroorganizmy charakteryzują się obecnością błony cytoplazmatycznej oraz grubej ściany komórkowej, zbudowanej z wielu warstw peptydoglikanu (rysunek 1) [19]. Natomiast trójwarstwowa otoczka bakterii Gram-ujemnych złożona jest z dwóch odrębnych błon, pomiędzy którymi znajduje się, wypełniona białkami, lipoproteinami oraz peptydoglikanem, przestrzeń zwana peryplazmą (rysunek 1) [20]. Ponadto w strukturze membran Gram-ujemnych mikroorganizmów wyróżniamy lipopolisacharydy wchodzące w skład zewnętrznej błony komórki oraz szereg fosfolipidów, takich jak: fosfatydyloetanolamina, fosfatydyloglicerol, difosfatydylo-

glicerol oraz fosfatydyloinozytol, które tworzą warstwę wewnętrzną [19, 21]. Dodatkowo, w strukturze membran bakteryjnych wyróżniamy integralne i peryferyczne białka pełniące funkcję różnego rodzaju receptorów, enzymów, transformatorów energii, pomp i kanałów [11, 20].



Rysunek 1. Schemat budowy ścian komórkowych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych (opracowanie własne, na podstawie [19, 20])

Ogólny schemat budowy błon komórkowych określany jest mianem płynnej mozaiki i przedstawia on błonę jako ciekłokrystaliczną dwuwarstwę lipidów, w której zawieszona są zdolne do swobodnego przemieszczania się, cząsteczki białka. Po raz pierwszy model ten został opisany w 1972 roku przez dwóch amerykańskich naukowców S.J. Singera oraz G. Nicolsona [22]. Zaproponowany przez nich model jest asymetryczny, dynamiczny i płynny. Szczególne znaczenie w prawidłowym funkcjonowaniu mikroorganizmów ma odpowiednia płynność membrany, która wpływa m.in. na aktywność enzymatyczną komórki, czy transport błonowy. Stopień płynności błony zależy głównie od długości i stopnia nasycenia lub rozgałęzienia, występujących w lipidach kwasów tłuszczowych (ang. *Fatty Acids*, FAs) oraz, jak ma to miejsce w przypadku organizmów zwierzęcych, zawartości cholesterolu [10, 22]. Ponadto, na odpowiedni poziom płynności membran komórkowych ma wpływ szereg czynników środowiskowych, m.in. temperatura. Pod wpływem niskich temperatur dochodzi do przejścia dwuwarstwy lipidowej z nieuporządkowanej fazy ciekłokrystalicznej do sztywniejszej i ściśle upakowanej fazy żelowej. Przejście pomiędzy fazami zależy od tzw. temperatury głównego przejścia fazowego, której wartość w przypadku bakterii związana jest głównie z ilością i rodzajem obecnych w lipidach kwasów tłuszczowych [18]. Oznacza to, iż ekspozycja bakteryjnych błon

cytoplazmatycznych na niskie temperatury powoduje wzrost ich sztywności, co skutkuje zmniejszeniem płynności błony, a tym samym utratą jej biologicznych funkcji. Wówczas dochodzi do zaburzenia prawidłowej aktywności metabolicznej komórek bakteryjnych [5, 9-11]. Dlatego też mikroorganizmy musiały wykształcić szereg różnych mechanizmów zapewniających im odpowiedni stopień płynności błon w niskich temperaturach [18].

## **5. Modyfikacje składu lipidowego błon komórkowych**

W toku licznych badań zaobserwowano, że wraz z obniżeniem temperatury otoczenia, w lipidowym profilu bakteryjnej błony zachodzi szereg zmian, pozwalających na zachowanie optymalnej płynności membran komórkowych. Do zmian tych zaliczamy głównie modyfikację struktury kwasów tłuszczowych polegające na: (i) przeksztalceniu nasyconych kwasów tłuszczowych do form nienasyconych (ang. *Unsaturated Fatty Acids*, UFAs), (ii) zwiększeniu ilości rozgałęzionych (głównie w pozycji *anteiso*) kwasów tłuszczowych (ang. *Branched Chain Fatty Acids*, BCFAs), (iii) syntezie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (ang. *Short Chain Fatty Acids*, SCFAs) oraz (iv) wytwarzaniu cyklopropanowych kwasów tłuszczowych (ang. *Cyclopropane Fatty Acids*, CFAs), co prowadzi do obniżenia temperatury tranzykcji błonowej dwuwarstwy lipidowej [11, 23-25]. Jednakże synteza SCFAs zawierających łańcuchy o długości mniejszej niż 12 atomów węgla nie jest uniwersalnym sposobem regulacji płynności błon komórkowych w warunkach stresu zimna, gdyż mechanizm ten dotyczy tylko komórek rosnących [26].

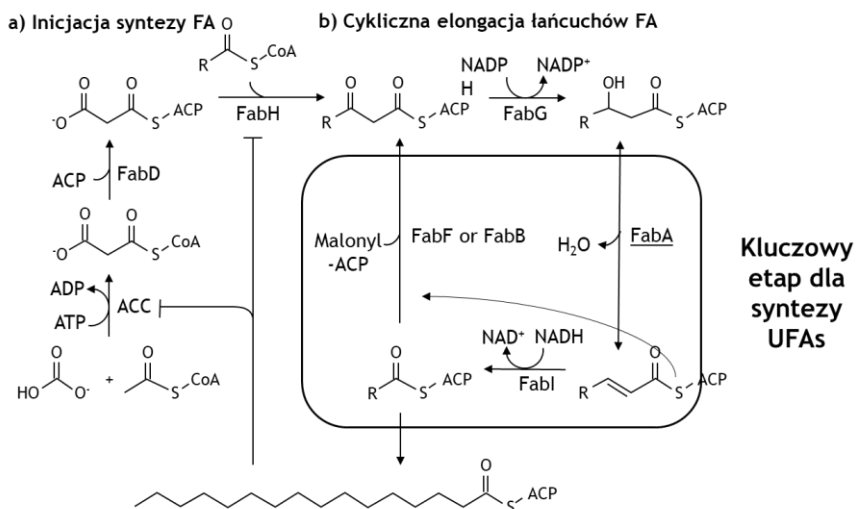
### **5.1. Synteza nasyconych kwasów tłuszczowych**

Synteza nasyconych kwasów tłuszczowych *Escherichia coli* zachodzi z udziałem zlokalizowanej w cytozolu syntazy kwasów tłuszczowych typu II (ang. *Fatty Acid Synthase II*, FAS II). Jest to enzymatyczny kompleks, w którym każda podjednostka jest kodowana przez odrębny gen. Większość wspomnianych genów znajduje się w obrębie klastra *fab* (*fabH-fabD-fabG-acyP-fabF*), a pozostałe są porzrucane po całym chromosomie bakteryjnym. Istotnym elementem szlaku FAS II jest białko ACP (ang. *Acyl Carrier Protein*), zdolne do transportu łańcuchów kwasów tłuszczowych w postaci tioestrów przyłączonych do jego grupy fosfopanteteinowej [23, 27, 28].

W szlaku syntezy SFAs wyróżniamy następujące etapy: inicjację oraz cykliczną elongację, obejmującą szereg następujących po sobie reakcji kondensacji, redukcji, dehydratacji i ponownej redukcji [23, 29].

Biosynteza FA rozpoczyna się od konwersji acetylo-CoA do malonylo-CoA w reakcji katalizowanej przez karboksylazę acetylo-CoA (ang. *Acetyl-CoA Carboxylase*, ACC). Następnie, z udziałem transacetylazy malonylo-CoA:ACP (FabD), grupa malonylowa zostaje przeniesiona na białko ACP [23], [29-31]. Kolejnym etapem szlaku jest kondensacja malonylo-ACP z krótkołańcuchowymi (C2-C5) cząsteczkami acylo-CoA. Reakcja ta zachodzi z udziałem białka FabH o aktywności  $\beta$ -ketoacylo-ACP syntazy III, która inicjuje etap elongacji i powstawania nowych SFAs (rysunek 2) [27], [29]. FabH jest enzymem, który ma decydującą rolę w determinowaniu struktury powstających kwasów tłuszczowych. W zależności od swojej specyficzności substratowej enzym FabH może inicjować syntezę prostych, bądź rozgałęzionych

kwasów tłuszczowych, a także decydować o występowaniu FAs w postaci izomerów *cis*, bądź *trans*. Przykładowo, białko FabH występujące u *E. coli* wykazuje specyficzność względem acetylo-CoA, podczas gdy enzym FabH obecny u *Staphylococcus aureus* wykorzystuje głównie jako substraty cząsteczki acylo-CoA (C4-C6), co prowadzi do powstania łańcuchów kwasów tłuszczowych, rozgałęzionych w pozycji *iso*, bądź *anteiso* [23, 32, 33].



Rysunek 2. Schemat syntezy SFA/UFA (Opracowanie własne na podstawie [23])

Acetoacetylo-ACP powstały w wyniku działania FabH, ulega redukcji do  $\beta$ -hydroksyacylo-ACP przez białko FabG o aktywności reduktazy  $\beta$ -ketoacylo-ACP zależnej od NADPH. Następnie, związek ten jest poddawany działaniu jednej z dwóch dehydrataz  $\beta$ -hydroksyacylo-ACP, tj. FabA lub FabZ, w wyniku czego powstaje *trans*-enoilo-ACP. Różnica pomiędzy wspomnianymi enzymami dotyczy zdolności FabA do izomeryzacji powstałego produktu, co skutkuje powstaniem nienasyconych kwasów tłuszczowych. Końcowa reakcja cyklu elongacyjnego obejmuje redukcję *trans*-enoilo-ACP do nasyconego acylo-ACP. Etap ten jest katalizowany przez obecną w wielu bakteriach reduktazę enoilo-ACP (FabI), zależną od NAD(P)H [23, 27, 29-31]. Niektóre mikroorganizmy posiadają alternatywne formy reduktaz. Przykładem może być reduktaza enoilo-ACP (FabV) cechująca się odmienną budową strukturalną, która została zidentyfikowana m.in. u *Vibrio cholerae* [34], *Burkholderia mallei* [35] oraz *Pseudomonas aeruginosa* [36]. Różnica pomiędzy białkami FabI i FabV dotyczy rozmieszczenia katalitycznych reszt tyrozyny i lizyny. W przypadku enzymu FabI zidentyfikowano katalityczną domenę Tyr-X<sub>6</sub>-Lys, natomiast białko FabV zawiera reszty katalityczne o następującej konfiguracji Tyr-X<sub>8</sub>-Lys. Z kolei, większość paciorkowców wykorzystuje do redukcji enoilo-ACP reduktazę FabK, będącą flawoenzymem [31]. Powstały acylo-ACP może być wykorzystany jako substrat do dalszych etapów kondensacji, zachodzących z udziałem syntazy  $\beta$ -ketoacylo-ACP typu I (FabB) lub typu II (FabF), co prowadzi m.in. do powstania kwasu palmitynowego, wbudowywanego do fosfolipidów błonowych (rysunek 2) [23, 29, 30].

## 5.2. Synteza nienasyconych kwasów tłuszczowych

Za najbardziej powszechną modyfikację składu lipidowego bakteryjnych błon cytoplazmatycznych, wywołaną niskimi temperaturami uważa się wzrost ilości jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (ang. *Mono-Unsaturated Fatty Acids*, MUFAs). W toku licznych badań wykazano, iż kwasy tłuszczowe w konformacji *cis* w większym stopniu zwiększają płynność błony. Jest to uwarunkowane tym, iż obecność wiązania podwójnego we wspomnianej konfiguracji przyczynia się do zakrzywienia łańcucha acyloвого pod kątem aż 30 °C, co zakłóca porządek dwuwarstwy lipidowej i zwiększa jej przepuszczalność. Laureat Nagrody Nobla w dziedzinie chemii, Konrad Bloch i jego współpracownicy wykazali, że mikroorganizmy mogą zwiększać liczbę UFAs w dwojaki sposób, tj. przez syntezę *de novo* na drodze beztlenowej dehydratacji hydroksykwasów bądź poprzez wprowadzanie zmian w strukturach już istniejących lipidów, w wyniku desaturacji acyloowych estrów długołańcuchowych kwasów tłuszczowych [18, 23, 26].

### 5.2.1. Desaturazy

Desaturazy kwasów tłuszczowych są enzymami związanymi z błonami komórkowymi, stanowiącymi grupę oksydoreduktaz zdolnych do usunięcia dwóch atomów wodoru z łańcucha węglowodorowego, występującego, np. w kwasach tłuszczowych, co prowadzi do powstania podwójnego wiązania. Enzymy te do swojej aktywności wymagają tlenu cząsteczkowego, równoważników redukujących oraz, niekiedy, jonów żelaza, które pełnią funkcję kofaktorów [37]. Desaturazy reprezentują złożoną grupę enzymów, które można klasyfikować według różnych kryteriów, np. w zależności od donora elektronów, rozpuszczalności enzymu, oraz rodzaju estryfikowanego kwasu tłuszczowego [37-40].

Biorąc pod uwagę sublokalizację komórkową enzymu jako kryterium klasyfikacji desaturaz, wyróżniamy następujące grupy tych białek: rozpuszczalne (występujące w cytozolu) desaturazy acylo-ACP, charakterystyczne głównie dla plastydów roślin wyższych oraz obecne w zdecydowanej większości taksonów desaturazy błonowe [37]. W obrębie tych ostatnich wyróżniamy takie podgrupy, jak: desaturazy acylo-lipidowe (wykorzystujące jako substrat FAs związane z lipidami, np. kwas oleinowy, kwas stearynowy) oraz desaturazy acylo-CoA (dla których substratem są głównie aktywne reszty acylowe kwasów tłuszczowych). Z kolei, na podstawie miejsca działania enzymu, możemy podzielić desaturazy na następujące grupy: desaturazy  $\Delta$ -x, wprowadzające podwójne wiązanie przy x węglu, licząc od końca karboksylowego, desaturazy  $\omega$ -x, usuwające wodór z węgla znajdującego się w pozycji x od końca metylowego oraz desaturazy v+x, wykorzystujące jako punkt odniesienia już istniejące wiązanie podwójne i usuwające atomy wodoru od atomu węgla znajdującego się najbliżej węgla alkenowego [37, 38, 41]. Mechanizm powstawania nienasyconych kwasów tłuszczowych przebiegający z udziałem błonowych desaturaz charakteryzuje się dwiema ważnymi cechami. Otóż w sytuacji, gdy dochodzi do obniżenia płynności membran komórkowych w wyniku ekspozycji bakterii na niskie temperatury, następuje natychmiastowa aktywacja omawianych enzymów, co prowadzi do szybkiego przywrócenia stanu homeostazy. A ponadto, proces ten jest wydajniejszy w porównaniu do syntezy kwasów tłuszczowych *de novo*, nie tylko ze względu na szybkość, ale także na bilans energetyczny [18, 23, 37].

### 5.2.1.1. Desaturaza acylo-lipidowa ( $\Delta 5$ -Des) *Bacillus subtilis*

Jedną z pierwszych zidentyfikowanych desaturaz była desaturaza acylo-lipidowa ( $\Delta 5$ -Des), występująca u *Bacillus subtilis*. Enzym ten, będący produktem ekspresji genu *des*, katalizuje wprowadzenie podwójnego wiązania w pozycji *cis* przy piątym atomie węgla ( $\Delta 5$ ) łańcucha kwasu tłuszczowego [42-44]. *B. subtilis* reaguje na obniżenie temperatury otoczenia, a tym samym zmniejszenie płynności membran komórkowych w dwojaki sposób. Równoległe z odpowiedzią długoterminową prowadząca do zwiększenia ilości BCFAs, bakteria ta indukuje ekspresję genu kodującego białko  $\Delta 5$ -Des, które to powoduje desaturację łańcucha acylolego obecnego w błonowych fosfolipidach. W regulacji transkrypcji genu *des* bierze udział dwuskładnikowy układ, w którym wyróżniamy kinazę histydynową DesK oraz dimeryczny regulator odpowiedzi DesR [18, 42-44]. Białko DesK zawiera pięć transbłonowych regionów (ang. *Transmembrane Helical Segments*, TMSs), które wchodzi w skład domeny sensorycznej oraz długi region C-końcowy, który zawiera domenę kinazową (DesKC). W wyniku zwiększenia ilości uporządkowanych i ściśle upakowanych lipidów błonowych w obecności ATP dochodzi do fosforylacji reszty histydynowej znajdującej się w domenie DesKC. Następnie DesKC przenosi grupę fosforylową do białka efektorowego DesR, co powoduje powstanie tetramerycznej, aktywnej postaci regulatora odpowiedzi DesR-P i przyłączenia polimerazy RNA do promotora genu *des*, a tym samym aktywacji jego transkrypcji [37, 43, 45, 46]. Aktywne białko  $\Delta 5$ -Des powoduje desaturację acylolego łańcuchów fosfolipidów błonowych. Te nowo powstałe UFAs powodują obniżenie temperatury tranzykcji dwuwarstwowej lipidowej oraz wzrost aktywności fosfatazy DesK katalizującej defosforylację DesR-P, co w konsekwencji prowadzi do inhibicji transkrypcji genu *des* [42, 43, 46, 47].

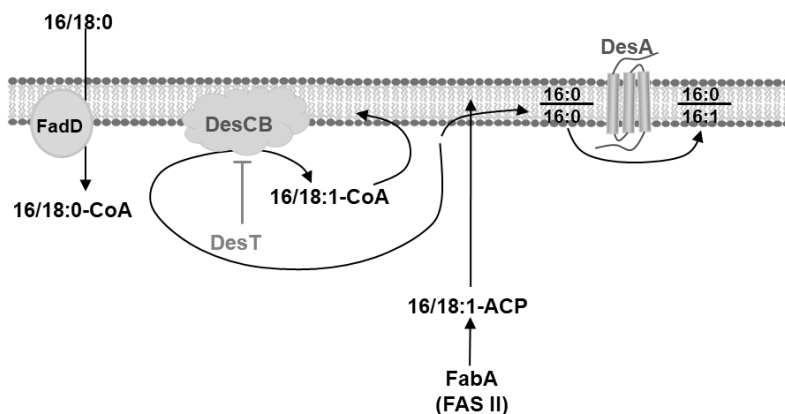
### 5.2.1.2. Desaturazy *Pseudomonas aeruginosa*

Kolejnym przykładem enzymów syntetyzujących UFAs są dwie desaturazy występujące u Gram-ujemnej bakterii *Pseudomonas aeruginosa*, będącej oportunistycznym, ludzkim patogenem. Błony tej bakterii zawierają duże ilości UFAs o prostych łańcuchach, głównie kwasu *cis*-wាក់cenowego (11-oktadekaenowy). W ostatnich latach wykazano, iż bakteria ta w odpowiedzi na niskie temperatury może syntetyzować UFAs na trzy różne sposoby w zależności od dostępności tlenu cząsteczkowego. W warunkach beztlenowych UFAs są wytwarzane wyłącznie z udziałem białek FabA oraz FabB, wchodzących w skład wspomnianego wcześniej kompleksu enzymatycznego FAS II. Natomiast w warunkach tlenowych, oprócz wspomnianego wyżej szlaku, *P. aeruginosa* wykorzystuje dwie desaturazy DesA oraz DesB do syntezy UFAs. DesA wprowadza podwójne wiązanie w konfiguracji *cis* przy dziewiątym atomie węgla ( $\Delta 9$ ) łańcucha kwasu tłuszczowego, przyłączonego w pozycji *sn-2* do obecnych w błonie fosfolipidów. Natomiast DesB usuwa atomy wodoru z acylo-CoA, utworzonych głównie z egzogennych SFAs [46, 48]. Zwiększoną ekspresję genu *desA* obserwuje się w warunkach ograniczonej dostępności tlenu. Jednakże mechanizm regulacji DesA z udziałem tlenu cząsteczkowego do tej pory nie został dokładnie poznany [37, 46].

Natomiast Zhang i współpracownicy [49] wykazali, że drugi system desaturaz DesCB obecnych u *P. aeruginosa* jest regulowany przez białko represorowe DesT,



które z różną efektywnością wiąże się do międzygenowego regionu *desT-desCB*, w zależności od składu puli acylo-CoA obecnych w komórce. W obecności UFA-CoA zaobserwowano ścisłe wiązanie się represora do tego regionu DNA, co prowadziło do represji transkrypcji genów *desCB*. Natomiast w środowisku zawierającym duże ilości SFAs dochodzi do wychwytywania tych kwasów przez komórkę i ich aktywowania z udziałem syntetazy acylo-CoA (FadD). Zwiększony poziom SFA-CoAs zapobiega wiązaniu DesT z promotorem *desCB*, co tym samym umożliwia ekspresję genów *desCB*. W rezultacie SFA-CoAs są przekształcane do  $\Delta 9$  UFA-CoAs, które następnie są włączane do fosfolipidów obecnych w błonach komórkowych [48, 49]. Mechanizm działania desaturaz DesA oraz DesCB został przedstawiony na rysunku 3.



Rysunek 3. Desaturacja acylowych estrów długołańcuchowych kwasów tłuszczowych z udziałem DesA i DesCB (Opracowanie własne na podstawie [48])

### 5.2.2. Synteza UFAs w warunkach beztlenowych

Zdecydowana większość mikroorganizmów syntetyzuje nienasycone kwasy tłuszczowe *de novo* w warunkach beztlenowych. Mechanizm ten został dobrze poznany, m.in. u Gram-ujemnej bakterii *E. coli* [18, 23]. Wytworzenie podwójnego wiązania w pozycji *cis-3* obejmuje dehydratację 3-hydroksydekanoilo-ACP, będącego związkiem pośrednim w syntezie kwasów tłuszczowych, do *trans-2*-decenoilo-ACP, a następnie jego izomeryzację do *cis-3*-decenoilo-ACP. Obydwie reakcje są katalizowane przez dehydratazę  $\beta$ -hydroksyacylo-ACP (FabA). Ilość powstających nasyconych kwasów tłuszczowych i ich form nienasyconych zależy głównie od stosunku pomiędzy ilością *cis-3*-decenoilo-ACP wykorzystanego przez syntezę I  $\beta$ -ketoacylo-ACP (FabB) a ilością *trans-2*-decenoilo-ACP zużytego przez enoiloreduktazę FabI. Wprowadzenie podwójnego wiązania do 10-węglowego produktu pośredniego i poddanie go kolejnym reakcjom wydłużania prowadzą do powstawania dwóch UFAs, powszechnie występujących w bakteriach, tj. kwasu palmitoleinowego (16:1) oraz *cis*-wakcenoowego (18:1) [18, 23, 29]. Enzym FabB posiada unikalną, katalityczną aktywność wydłużania *cis-3*-decenoilo-ACP, w reakcji kondensacji z malonylo-ACP do palmitoleilo-ACP. Właściwości tej nie posiada natomiast enzym FabF, będący izozymem FabB, który z kolei katalizuje powstawanie *cis*-wakcenoilo-ACP z pamtioleilo-ACP i malonylo-ACP. Podsumowując, zarówno

FabA, jak i FabB są wymagane do syntezy UFAs, natomiast FabF jest jedynie zaangażowany w wydłużanie kwasu 16:1 do 18:1. Enzym FabF został zidentyfikowany jako kluczowy czynnik regulujący zmianę składu lipidowego bakteryjnej błony komórkowej w odpowiedzi na stres temperaturowy. W niskich temperaturach enzym ten promuje produkcję kwasu *cis*-wakcenenowego, podczas gdy w wyższych wartościach temperatury białko to ulega inaktywacji, co skutkuje mniejszą zawartością nienasyconych kwasów tłuszczowych [18, 23, 29, 50]. Potwierdza to, że biosynteza kwasów tłuszczowych jest ściśle regulowana w odpowiedzi na zmienne warunki środowiskowe.

W przypadku *E. coli* regulacja genów *fabA* oraz *fabB* zachodzi z udziałem czynników transkrypcyjnych FadR oraz FabR. FadR, należący do rodziny białek regulatorowych GntR, funkcjonuje jako globalny regulator syntezy UFAs i  $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych. W przypadku omawianego szlaku pełni on funkcję aktywatora transkrypcji genów *fabA* oraz *fabB*. Odkryte znacznie później białko FabR będące przedstawicielem rodziny regulatorów typu TetR w obecności UFAs powoduje represję genów *fabA* oraz *fabB* [22, 41].

Z kolei obecność UFA-ACP bądź UFA-CoA indukuje powstawanie zmian konformacyjnych, które zwiększają powinowactwo białka FabR do promotora genu *fabB*, co powoduje represję transkrypcji genów *fabB* i *fabA*. Natomiast SFA-ACP i SFA-CoA blokują występowanie tych zmian konformacyjnych i tym samym zapobiegają hamowaniu ekspresji wyżej wspomnianych genów [23, 51].

Zidentyfikowano również wiele innych bakterii należących głównie do organizmów Gram-dodatnich, u których szlak syntezy UFAs zachodzi z udziałem enzymów innych niż FabA i FabB. Przykładowo u *Streptococcus pneumoniae* wykryto FabM o funkcji izomerazy [52]. Natomiast u *Enterococcus faecalis* w szlak syntezy UFAs zaangażowane są dwa odmienne enzymy, tj. FabN, będący homologiem FabZ *E. coli*, a funkcjonalnie wykazujący aktywność dehydratazy i izomerazy stanowiąc analog FabA oraz FabF (przemianowany obecnie na FabO) o podobnej funkcji do FabB [23, 53].

Wzrost ilości UFAs w odpowiedzi na ekspozycję na niskie temperatury zaobserwowano również u Gram-ujemnych, symbiotycznych *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae, wyizolowanych z *Lathyrus japonicus* oraz *Lathyrus pratensis*. Drouin i współpracownicy [54] zaobserwowali zwiększenie poziomu UFAs, zwłaszcza kwasu *cis*-wakcenenowego, w lipidach błonowych badanych szczepów wraz z obniżeniem temperatury do 5 °C [54, 55]. Rolę kwasów w adaptacji do zimna potwierdzono także w przypadku mezofilnych szczepów *E. coli* [56]. Z kolei, występowanie dużych ilości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, takich jak: omega-6 ( $\omega_6$ ) i omega-3 ( $\omega_3$ ) w odpowiedzi na niskie temperatury odnotowano u morskich psychrofilii i cyjanobakterii [25, 57].

### 5.3. Synteza BCFAs

Synteza rozgałęzionych kwasów tłuszczowych, podobnie jak SFAs, zachodzi z udziałem FAS II. Szlaki te różnią się między sobą jedynie substratami wykorzystywanymi w reakcji kondensacji zachodzącej z udziałem FabH. Jak już wspomniano, enzym ten katalizuje kondensację malonylo-ACP i acetylo-CoA. W przypadku bakterii wytwarzających kwasy tłuszczowe o prostych łańcuchach enzym FabH wykorzystuje głównie acetylo-CoA. Natomiast synteza BCFAs wymaga obecności krótkołańcu-

chowych  $\alpha$ -ketokwasów, będących pochodnymi aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach węglowych. Bezpośrednimi prekursorami BCFAs są izobutyrylo-CoA, 2-metylobutyrylo-CoA oraz izowalerylo-CoA, które są produktami katabolizmu, odpowiednio: waliny, izoleucyny i leucyny [18, 31]. W reakcji zachodzącej z wykorzystaniem 2-metylobutyrylo-CoA jako substratu powstają rozgałęzione kwasy tłuszczowe, zawierające grupę metylową przy trzecim atomie węgla (*anteiso*), licząc od końca łańcucha. Natomiast produktem syntezy przebiegającej z udziałem pozostałych prekursorów są kwasy tłuszczowe rozgałęzione w pozycji *iso*, tj. posiadające grupę metylową znajdującą się przy przedostatnim atomie węgla. Wykazano, iż obecność grupy metylowej w *anteiso*-BCFAs znacząco wpływa na stopień upakowania łańcuchów kwasów tłuszczowych, co tym samym sprzyja zwiększeniu płynności membran komórkowych w odpowiedzi na ekspozycję bakterii na niskie temperatury [18, 31].

Dodatkowe strategie adaptacji membran do niskich temperatur zaobserwowano u mezofilnych Gram-dodatnich bakterii, takich jak: *Bacillus subtilis* i *Bacillus amyloliquefaciens* T1, ale także u Gram-ujemnych termofili z gatunku *Thermus thermophilus*, w których to obserwuje się zamianę form izomerycznych z *iso*- na *anteiso*-BCFA [58, 59]. W przypadku psychrotolerancyjnego szczepu *Sphingo-bacterium antarcticus* ( $T_{opt.} = 25^{\circ}\text{C}$ ) zidentyfikowano jednoczesne występowanie kilku mechanizmów adaptacyjnych [60, 61]. W wyniku obniżenia temperatury do  $5^{\circ}\text{C}$  zaobserwowano wzrost ilości UFAs oraz BCFAs. Przeciwnie, w skrajnie niskich temperaturach ( $-15^{\circ}\text{C}$ ) szczep *Planococcus halocryophilus*, którego optymalna temperatura mieści się w okolicach  $25^{\circ}\text{C}$ , charakteryzował się obecnością mniejszej ilości rozgałęzionych kwasów tłuszczowych [24]. Dodatkowo, charakterystyka składu lipidowego błon psychrofilii, takich jak: *Clostridium psychrophilum*, *Colwellia psychrerythraea* oraz *Psychromonas ingrahamii* wykazała, że bakterie te zawierają duże ilości UFAs oraz SCFAs. Mimo że w bakteriach tych potwierdzono również obecność *iso*-BCFAs, to jednakże, jak wykazują badania, kwasy te nie mają istotnego udziału w regulacji płynności ich błon. Przedstawione powyżej dane sugerują, że rola BCFAs w adaptacji do niskich temperatur jest specyficzna dla danego gatunku bakterii [24].

#### **5.4. Cyklopropanowe kwasy tłuszczowe (CFAs)**

Konwersja istniejących *cis*-UFA do cyklopropanowych kwasów tłuszczowych (CFAs) jest powszechnie występującym zjawiskiem wśród organizmów bakteryjnych. W reakcji tej bierze udział syntaza CFA, która wykorzystuje S-adenozylometioninę jako donora grup metylowych. Powstały pierścień cyklopropanowy zachowuje podwójne wiązanie w konfiguracji *cis*, a więc fosfolipidy, w obrębie których występują cyklopropanowe kwasy tłuszczowe wykazują podobne właściwości jak lipidy zawierające *cis*-UFAs [62]. Metylacja podwójnego wiązania izomerów *cis* rozpoczyna się wraz z wejściem bakterii w stacjonarną fazę wzrostu i trwa do momentu, gdy większość obecnych w komórce *cis*-UFA zostanie przekształcona do CFA [23, 63]. Wykazano, iż mutanty *Pseudomonas putida* KT2440 pozbawione aktywności syntazy CFA są bardziej wrażliwe na liofilizację niż dzikie typy tych szczepów, co może wskazywać na istotną rolę CFA w stabilizacji struktur błonowych [29, 64].

## 6. Podsumowanie

Bakterie występujące od miliardów lat na Ziemi, w wyniku ewolucji przystosowały się do różnorodnych warunków środowiskowych, w których bytują. Dlatego też nie jest zaskakujące to, iż mikroorganizmy te cechują się tak dużym zróżnicowaniem struktur lipidowych oraz szlaków zaangażowanych w ich syntezę. Jednakże pomimo wielu lat badań nad mechanizmami warunkującymi odpowiednią płynność błon, nadal istnieje szereg pytań, dotyczących m.in. struktur krystalicznych i mechanizmów katalitycznych acylotransferaz [30].

Obecnie coraz bardziej widoczne w skali globalnej zmiany klimatu skutkujące występowaniem szeregu niekorzystnych czynników abiotycznych, np. niskich temperatur oraz największa w dziejach i wciąż rosnąca liczba ludności w naturalny sposób zwiększa zapotrzebowania na artykuły spożywcze, w tym na te pochodzące z upraw roślin. Wykorzystanie wspomnianych wcześniej bakteryjnych mechanizmów adaptacyjnych do zimna, nie tylko stanowi realne dostosowywanie się do zmieniającego klimatu, ale także może posłużyć do zwiększenia wydajności upraw roślinnych. Istotne też jest lepsze zrozumienie procesów adaptacyjnych, gdyż wiedza ta może zostać wykorzystana do usuwania niepożądanych mikroorganizmów (jak np. bakterie *Listeria monocytogenes*, które są w stanie przetrwać w niskich temperaturach mogłyby zostać wyeliminowane podczas konserwacji żywności) [11, 14].

## Literatura

1. Tribelli P.M., López N.I., *Reporting Key Features in Cold-Adapted Bacteria*, Life, 8(1), 2018, 1-12.
2. Moyer C.L., Collins R.E., Morita R.Y., *Psychrophiles and Psychrotrophs*, [w:] eLS., John Wiley & Sons Ltd (red.), Reference Module in Life Sciences, Elsevier, Chichester 2017.
3. Barria C., Malecki M., Arraiano C.M., *Bacterial adaptation to cold*, Microbiology, 159 (12), 2013, 2437-2443.
4. Hébraud M., Potier P., *Cold shock response and low temperature adaptation in psychrotrophic bacteria*, Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 1(2), 1999, 211-219.
5. Feller G., Gerday C., *Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation*, Nature Reviews. Microbiology, 1(3), 2003, 200-208.
6. Morita R.Y., *Psychrophilic bacteria*, Bacteriological Reviews, 39(2), 1975, 144-167.
7. D'Amico S., Collins T., Marx J.C., Feller G., Gerday C., *Psychrophilic microorganisms: challenges for life*, European Molecular Biology Organization reports, 7(4), 2006, 385-389.
8. Nogi Y., *Taxonomy of Psychrophiles*, [w:] Horikoshi K. (red.) Extremophiles Handbook, Springer Japan, Tokyo 2011, s. 777-792.
9. Kaufman A., Turkiewicz M., *Białka szoku zimna mikroorganizmów*, Postępy Biochemii, 50(1), 2004, 32-44.
10. Strahl H., Errington J., *Bacterial Membranes: Structure, Domains, and Function*, Annual Review of Microbiology, 71(1), 2017, 519-538.
11. Turkiewicz M., *Drobnoustroje psychrofilne i ich biotechnologiczny potencjał*, Kosmos, 55(4), 2006, 307-320.
12. Nedwell D.B., *Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature*, FEMS Microbiology Ecology, 30(2), 1999, 101-111.

13. Ermolenko D.N., Makhatadze G.I., *Bacterial cold-shock proteins*, Cellular and Molecular Life Sciences, 59(11), 2002, 1902-1913.
14. Phadtare S., *Recent developments in bacterial cold-shock response*, Current Issues in Molecular Biology, 6(2), 2004, 125-136.
15. Berry E.D., Foegeding P.M., *Cold Temperature Adaptation and Growth of Microorganisms*, Journal of Food Protection, 60(12), 1997, 1583-1594.
16. De Maayer P., Anderson D., Cary C., Cowan D.A., *Some like it cold: understanding the survival strategies of psychrophiles*, European Molecular Biology Organization reports, 15(5), 2014, 508-517.
17. Ray M.K., Kumar G.S., Janiyani K., Kannan K., Jagtap P., Basu M.K., Shiaji S., *Adaptation to low temperature and regulation of gene expression in antarctic psychrotrophic bacteria*, Journal of Biosciences, 23(4), 1998, 423-435.
18. Mansilla M.C., de Mendoza D., *Regulation of Membrane Lipid Homeostasis in Bacteria upon Temperature Change*, [w:] Geiger O (red.), *Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes*, Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, Springer International Publishing, Cham 2017, 1-13.
19. Malanovic N., Lohner K., *Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides*, Biochimica et Biophysica Acta BBA – Biomembranes, 1858(5), 2016, 936-946.
20. Silhavy T.J., Kahne D., Walker S., *The bacterial cell envelope*, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2(5), 2010, 1-16.
21. Sohlenkamo C., Geiger O., *Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways*, FEMS Microbiology Reviews 40(1), 2016, 1-27.
22. Dowhan W., Bogdanov M., Mileykovskaya E., *Functional Roles of Lipids in Membranes*, [w:] Ridgway N.D., McLeod R.S. (red.), *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Sixth Edition)*, Ridgway ND, Elsevier, Boston 2016, 1-40.
23. Hang Y.M., Rock C.O., *Membrane lipid homeostasis in bacteria*, Nature Reviews. Microbiology, 6(3), 2008, 222-233.
24. Siliakus M.F., Van der Oost J., Kengen S.W.M., *Adaptations of archaeal and bacterial membranes to variations in temperature, pH and pressure*, Extremophiles: life under extreme conditions, 21(4), 2017, 651-670.
25. Russell N.J., *Psychrophilic bacteria – molecular adaptations of membrane lipids*, Comparative biochemistry and physiology. Part A, Physiology, 118(3), 1997, 489-493.
26. Denich T.J., Beaudette L.A., Lee H., Trevors J.T., *Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes*, Journal of Microbiological Methods, 52(2), 2003, 149-182.
27. Rock C.O., Jackowski S., *Forty years of bacterial fatty acid synthesis*, Biochemical and biophysical research communications 292(5), 2002, 1155-1166.
28. Zhang Y., Cronan J.E., *Transcriptional analysis of essential genes of the Escherichia coli fatty acid biosynthesis gene cluster by functional replacement with the analogous Salmonella typhimurium gene cluster*, Journal of Bacteriology 180(13), 1998, 3295-3303.
29. Komaniecka I., Choma A., *Składniki lipidowe Rhizobiaceae*, Postępy Mikrobiologii, 40(1), 2001, 7-30.
30. White S.W., Zheng J., Zhang Y.M., Rock C.O., *The structural biology of type II fatty acid biosynthesis*, Annual Review of Biochemistry, 74, 2005, 791-831.
31. Parsons J.B., Rock C.O., *Bacterial Lipids: Metabolism and Membrane Homeostasis*, Progress in Lipid Research, 52(3), 2013, 249-276.
32. Qiu X., Choudhry A.E., Janson C.A., Grooms M., Daines R.A., Lonsdale J.T., Khandekar S.S., *Crystal structure and substrate specificity of the  $\beta$ -ketoacyl-acyl carrier protein*

- synthase III (FabH) from Staphylococcus aureus*, Protein science: a publication of the Protein Society, 14(8), 2005, 2087-2094.
33. Choi K.H., Heath R.J., Rock C.O.,  *$\beta$ -ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) is a determining factor in branched-chain fatty acid biosynthesis*, Journal of Bacteriology, 182(2), 2000, 365-370.
  34. Massengo-Tiasse R.P., Cronan J.E., *Vibrio cholerae FabV defines a new class of enoyl-acyl carrier protein reductase*, Journal of Biological Chemistry, 283, 2008, 1308-1316.
  35. Lu H., Tonge P.J., *Mechanism and inhibition of the FabV Enoyl-ACP reductase from Burkholderia Mallei*, Biochemistry, 49(6), 2010, 1281-1289.
  36. Zhu L., Lin J., Ma J., Cronan J.E., Wang H., *Triclosan resistance of Pseudomonas aeruginosa PAO1 is due to FabV, a triclosan-resistant enoyl-acyl carrier protein reductase*, Antimicrobial agents and chemotherapy, 54(2), 2010, 689-698.
  37. Altabe S.G., Mansilla M.C., de Mendoza D., *Remodeling of Membrane Phospholipids by Bacterial Desaturases*, [w:] Ntambi Ph.D.J. (red.) Stearoyl-CoA Desaturase Genes in Lipid Metabolism, Springer, New York 2013, 209-231.
  38. Garba L., Mohamad Ali M.S., Oslan S.N., Rahman R.N.Z.R.A., *Review on Fatty Acid Desaturases and their Roles in Temperature Acclimatisation*, Journal of Applied Sciences, 17(6), 2017, 282-295.
  39. Li D., Moorman R., Vanhercke T., Petrie J., Singh S., Jackson C.J., *Classification and substrate head-group specificity of membrane fatty acid desaturases*, Computational and Structural Biotechnology Journal, 14, 2016, 341-349.
  40. Sperling P., Ternes P., Zank T.K., Heinz E., *The evolution of desaturases*, Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids, 68(2), 2003, 73-95.
  41. Wang M., Chen H., Gu Z., Zhang H., Chen W., Chen Y.Q.,  *$\omega$ 3 fatty acid desaturases from microorganisms: structure, function, evolution, and biotechnological use*, Applied microbiology and biotechnology, 97(24), 2013, 10255-10262.
  42. Altabe S.G., Aguilar P., Caballero G.M., de Mendoza D., *The Bacillus subtilis acyl lipid desaturase is a delta5 desaturase*, Journal of Bacteriology, 185(10), 2003, 3228-3231.
  43. Mansilla M.C., de Mendoza D., *The Bacillus subtilis desaturase: a model to understand phospholipid modification and temperature sensing*, Archives of Microbiology, 183(4), 2005, 229-235.
  44. Weber M.H., Klein W., Müller L., Niess U.M., Marahiel M.A., *Role of the Bacillus subtilis fatty acid desaturase in membrane adaptation during cold shock*, Molecular Microbiology, 39(5), 2001, 1321-1329.
  45. Albanesi D., Mansilla M.C., de Mendoza D., *The Membrane Fluidity Sensor DesK of Bacillus subtilis Controls the Signal Decay of Its Cognate Response Regulator*, Journal of Bacteriology, 186(9), 2004, 2655-2663.
  46. Mansilla M.C., Banchio C.E., de Mendoza D., *Signalling Pathways Controlling Fatty Acid Desaturation*, [w:] Quinn P.J., Wang X. (red.), Lipids in Health and Disease, Springer, Dordrecht 2008, s. 71-99.
  47. Cybulski L.E., Albanesi D., Mansilla M.C., Altabe S., Aguilar P.S., de Mendoza D., *Mechanism of membrane fluidity optimization: isothermal control of the Bacillus subtilis acyl-lipid desaturase*, Molecular Microbiology, 45(5), 2002, 1379-1388.
  48. Zhu K., Choi K.H., Schweizer H.P., Rock C.O., Zhang Y.M., *Two aerobic pathways for the formation of unsaturated fatty acids in Pseudomonas aeruginosa*, Molecular Microbiology, 60(2), 2006, 260-273.
  49. Zhang Y.M., Zhu K., Frank M.W., Rock C.O., *A Pseudomonas aeruginosa transcription factor that senses fatty acid structure*, Molecular Microbiology, 66(3), 2007, 622-632.

50. de Mendoza D., Klages Ulrich A., Cronan J.E., *Thermal regulation of membrane fluidity in Escherichia coli. Effects of overproduction of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase I*, Journal of Biological Chemistry, 258(4), 1983, 2098-2101.
51. Zhu K., Zhang Y.M., Rock C.O., *Transcriptional Regulation of Membrane Lipid Homeostasis in Escherichia coli*, Journal of Biological Chemistry, 284(50), 2009, 34880-34888.
52. Marrakchi H., Choi K.H., Rock C.O., *A new mechanism for anaerobic unsaturated fatty acid formation in Streptococcus pneumoniae*, Journal of Biological Chemistry, 277(47), 2002, 44809-44816.
53. Lu Y.J., White S.W., Rock C.O., *Domain swapping between Enterococcus faecalis FabN and FabZ proteins localizes the structural determinants for isomerase activity*, Journal of Biological Chemistry, 280(34), 2005, 30342-30348.
54. Drouin P., Prévost D., Antoun H., *Physiological adaptation to low temperatures of strains of Rhizobium leguminosarum bv. viciae associated with Lathyrus spp.*, FEMS Microbiology Ecology, 32(2), 2000, 111-120.
55. Alexandre A., Oliveira S., *Response to temperature stress in rhizobia*, Critical reviews in microbiology, 39(3), 2013, 219-228.
56. Marr A.G., Ingraham J.L., *Effect of temperature on the composition of fatty acids in Escherichia coli*, Journal of Bacteriology, 84(6), 1962, 1260-1267.
57. Zsiros O., Várkonyi Z., Kovács A., Farkas T., Gombos Z., Garab G., *Induction of polyunsaturated fatty-acid synthesis enhances tolerance of a cyanobacterium, Cylandrospermopsis raciborskii, to low-temperature photoinhibition*, Indian Journal of Biochemistry & Biophysics, 37(6), 2000, 470-476.
58. Chintalapati S., Kiran M.D., Shivaji S., *Role of membrane lipid fatty acids in cold adaptation*, Cellular and molecular biology, 50(5), 2004, 631-642.
59. Oshima M., Miyagawa A., *Comparative studies on the fatty acid composition of moderately and extremely thermophilic bacteria*, Lipids, 9(7), 1974, 476-480.
60. Jagannadham M.V., Chattopadhyay M.K., Subbalakshmi C., Vairamani M., Narayanan K., Rao C.M., Shivaji S., *Carotenoids of an Antarctic psychrotolerant bacterium, Sphingobacterium antarcticus, and a mesophilic bacterium, Sphingobacterium multivorum*, Archives of Microbiology, 173(5-6), 2000, 418-424.
61. Shicaji S., Ray K.M., Shyamala Rao N., Saisree L., Jagannadham M.V., Seshu Kumar G., Reddy G.S.N., Bhargava P.M., *Sphingobacterium antarcticus sp. nov., a psychrotrophic bacterium from the soils of Schirmacher Oasis, Antarctica*, International Journal of Systematic Bacteriology, 42(1), 1992, 102-106.
62. Grogan D.W., Cronan J.E., *Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria*, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 61(4), 1997, 429-441.
63. Wang A.Y., Cronan J.E., *The growth phase-dependent synthesis of cyclopropane fatty acids in Escherichia coli is the result of an RpoS(KatF) – dependent promoter plus enzyme instability*, Molecular. Microbiology, 11(6), 1994, 1009-1017.
64. Muñoz-Rojas J., Bernal P., Duque E., Godoy P., Segura A., Ramos J.L., *Involvement of Cyclopropane Fatty Acids in the Response of Pseudomonas putida KT2440 to Freeze-Drying*, Applied and Environmental Microbiology, 72(1), 2006, 472-477.

## **Modyfikacje składu lipidowego bakteryjnych błon komórkowych pod wpływem w odpowiedzi na stres niskich temperatur**

### **Streszczenie**

Pod wpływem niskiej temperatury w organizmach bakteryjnych zachodzi szereg zmian, które uniemożliwiają im prawidłowe funkcjonowanie. Szczególnie niekorzystnym zjawiskiem jest przejście błon cytoplazmatycznych z fazy ciekłokrystalicznej do fazy żelowej, cechującej się zwiększoną sztywnością i grubością. Taka struktura membran przyczynia się do zaburzenia prawidłowej aktywności metabolicznej bakterii. Z tego powodu mikroorganizmy wykształciły szereg mechanizmów adaptacyjnych, aby przetrwać w zimnych środowiskach. Jedną z najważniejszych adaptacji do niskich temperatur jest zdolność bakterii do modyfikacji składu lipidowego błon komórkowych, która polega na: (i) syntezie nienasyconych kwasów tłuszczowych, (ii) zwiększeniu ilości rozgałęzionych łańcuchów acylowych, (iii) wytwarzaniu krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych oraz (iv) obecności cyklopropanowych kwasów tłuszczowych. Powstałe makrocząsteczki wpływają na obniżenie temperatury tranzycji dwuwarstwy lipidowej, co pozwala na utrzymanie odpowiedniej płynności membran komórkowych. Dokładne scharakteryzowanie mechanizmów regulujących modyfikację struktury bakteryjnych kwasów tłuszczowych w odpowiedzi na niskie temperatury ma kluczowe znaczenie w wykorzystaniu tych mikroorganizmów w zwiększeniu upraw rolnych bądź opracowaniu skutecznych farmaceutyków opierających się na interakcji z błonami komórkowymi patogenów.

Słowa kluczowe: bakterie, błona, adaptacja do zimna, kwasy tłuszczowe

## **Modifications of the lipid composition of bacterial cell membranes in response to low temperature stress**

### **Abstract**

Under the influence of low temperature, a number of changes occur in bacterial organisms that make them unable to function properly. Among them, transition of cytoplasmic membranes from a liquid crystal phase to a gel phase, characterized by increased stiffness and thickness, is a particularly unfavorable process. This structure of membranes results in disturbances in normal bacterial metabolic activity. For this reason, microorganisms have developed a number of adaptive mechanisms to survive in cold environments. One of the most important adaptations to low temperatures is the ability of bacteria to modify the lipid composition of cell membranes, which includes: (i) the synthesis of unsaturated fatty acids, (ii) increasing the amount of branched acyl chains, (iii) the production of short-chain fatty acids, and (iv) the presence of cyclopropane fatty acids. These compounds induce reduction of the transition temperature of the lipid bilayer, which allows maintenance of adequate fluidity of cell membranes. Detailed characterization of mechanisms regulating the modification of the bacterial fatty acid structure in response to low temperatures is crucial in view of the use of these microorganisms to improve agricultural crops or to develop effective pharmaceuticals based on their interaction with the cell membranes of pathogens.

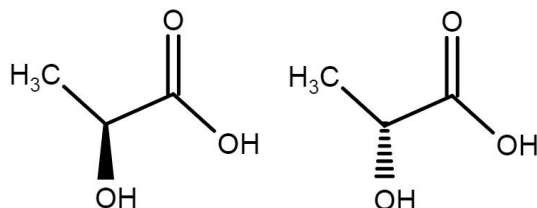
Keywords: bacteria, membrane, cold-adapted, fatty acids



## Produkcja enancjomerów kwasu mlekowego przez bakterie

### 1. Wprowadzenie

Kwas mlekowy (kwas 2-hydroksypropionowy, *Lactic Acid*, LA) jest naturalnym, chiralnym kwasem hydroksykarboksylowym występującym w formie L(+)  
z konfiguracją absolutną S (L-LA) i D(-) z konfiguracją absolutną R (D-LA) (rysunek 1).



Rysunek 1. Kwas L-mlekowy (po lewej) i D-mlekowy (po prawej) [opracowanie własne]

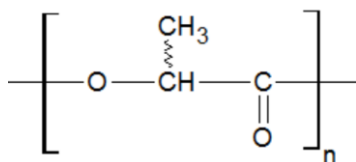
W organizmie ludzkim występuje prawie wyłącznie L-mleczan, osiągając stężenie w surowicy krwi ~ 1-2 mM, U zdrowych osób stężenie D-mleczanu w surowicy wynosi ~ 13 μM, a jego zwiększenie następuje w stanach patologicznych, takich jak zespół krótkiego jelita (*Short Bowel Syndrome*, SBS), cukrzyca, infekcje, sepsa [1].

Amerykańska Agencja do Spraw Żywności i Leków (*Food and Drug Agency*, FDA) nadała kwasowi mlekowemu status GRAS (*Generally Regarded as Safe*) [2]. W przemyśle spożywczym mieszanina racemiczna kwasu L i D mlekowego kryje się pod symbolem E270 i jest wykorzystywana głównie jako przeciwutleniacz, substancja zakwaszająca i konserwująca, przedłużająca świeżość żywności. Dzięki właściwościom przeciwdrobnoustrojowym, kwas mlekowy jest szeroko wykorzystywany zarówno przy produkcji wyrobów wędliniarskich, obróbce mięsa, konserwacji tłuszczów, jak i odpadów poubojowych [2]. Jest też powszechnie stosowany przy produkcji napojów bezalkoholowych, soków owocowych i warzywnych – dodaje się go celem poprawienia i uwydatnienia ich naturalnego smaku i aromatu, jak również jako środek konserwujący [3]. Właściwości bakteriostatyczne kwasu mlekowego są również wykorzystywane do konserwacji pasz i w żywieniu zwierząt, szczególnie drobiu i trzody chlewnej, a także zwierząt futerkowych. Kwas mlekowy dodawany do surowców i odpadów rolniczych poddawanych procesowi kiszenia powoduje szybkie obniżenie pH środowiska, co w połączeniu z biologiczną aktywnością kwasu, hamuje rozwój szkodliwych drobnoustrojów, w tym także patogennych, i przyczynia się do znacznego ograniczenia strat w procesie kiszenia [4]. W pszczelarstwie kwas mlekowy stosuje się do zwalczania roztoczy *Varroa destructor*. W przemyśle garbarskim, kwas

<sup>1</sup> Katedra Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków, Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej, ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa.

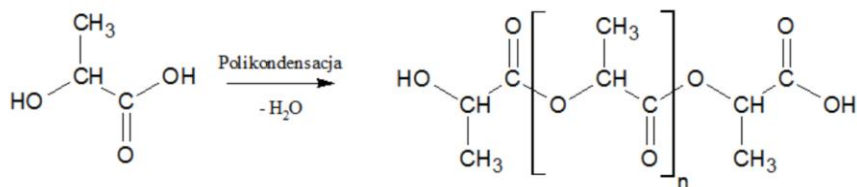
mlekowy służy do odwapniania skór zwierzęcych, a w przemyśle tekstylnym jest wykorzystywany w procesie barwienia (barwniki kwasowe). W przemyśle chemicznym służy do otrzymywania, m.in. glikolu propylenowego oraz kwasu akrylowego. Kwas akrylowy i jego pochodne estrowe są podstawowym materiałem do otrzymywania polimerowych produktów, które są szeroko stosowane m.in. do pokrywania powierzchni, do produkcji tekstyliów, klejów, sztucznej skóry, włókien detergentów i materiałów określanych jako super-absorbenty oraz do obróbki papieru. Estry kwasu mlekowego są stosowane do produkcji rozpuszczalników ekologicznych, które nie zawierają substancji lotnych ani trujących, a ponadto są biodegradowalne. Optycznie czyste postacie kwasu mlekowego, także w formie estrów, służą do produkcji herbicydów [2]. W przemyśle kosmetycznym wykorzystuje się działanie złuszczące, nawilżające i przeciwstarzeniowe kwasu mlekowego. Dzięki działaniu przeciwbakteryjnemu, jest on również pomocny w leczeniu zmian skórnych o podłożu infekcyjnym. Z tych powodów kwas mlekowy jest jednym podstawowych składników wielu kremów, szamponów oraz różnego typu preparatów kosmetycznych, w tym płynów do higieny intymnej, a także probiotyków ginekologicznych. Sól wapniowa kwasu mlekowego jako składnik past do zębów uczestniczy w zwalczaniu próchnicy [5].

Oprócz zastosowania samego kwasu mlekowego i jego soli, coraz większe zainteresowanie budzi polimer kwasu mlekowego, polilaktyd (*Poly-lactic Acid, PLA*) przedstawiony na rysunku 2. W związku z rosnącym światowym problemem dotyczącym utylizacji i zagospodarowania odpadów z tworzyw sztucznych naukowcy skłaniają się coraz bardziej ku powszechnej produkcji polimerów biodegradowalnych. PLA jest znanym od lat 30. XX wieku odnawialnym, biokompatybilnym biopolimerem, którego obszar zastosowań ciągle się rozszerza [6].



Rysunek 2. Wzór chemiczny PLA, opracowanie własne na podstawie [7]

Metoda syntezy polilaktydu o dużej masie cząsteczkowej jest dwuetapowa [8]. W pierwszym etapie syntezowany jest laktyd (cykliczny dimer kwasu mlekowego), który w drugim etapie jest polimeryzowany z otwarciem pierścienia cyklicznego (*Ring-Opening Polymerization, ROP*) (rysunek 3).



Rysunek 3. Synteza PLA metodą ROP, opracowanie własne na podstawie [8]

Laktyd, zbudowany z dwóch cząsteczek kwasu mlekowego, istnieje w trzech formach diastereoizomerycznych: jako L-laktyd (S,S), D-laktyd (R,R) i równomolowa mieszanina izomerów D i L kwasu mlekowego (mezo-laktyd). Pośród różnych polilaktydów, optycznie czyste poli(L-laktyd) i poli(D-laktyd) są krystalicznymi polimerami o temperaturze topnienia ok. 180°C, podczas gdy poli(DL-laktyd) jest materiałem amorficznym z temperaturą przechodzenia w stan szklisty wynoszącą 50-70°C. Dysponowanie czystymi optycznie formami kwasu mlekowego jest niezwykle istotne z punktu widzenia produkcji polimerów o zdefiniowanych właściwościach [9,10], ponieważ właściwości polilaktydów są bardzo zróżnicowane w zależności od stosunku i rozmieszczenia izomerów D i L [11]. Stereochemiczna struktura PLA może być łatwo kontrolowana przez polimeryzowanie mieszaniny kwasu L- i D-mlekowego w ściśle określonych proporcjach [12,13]. PLA znajduje zastosowanie zarówno przy wyrobie produktów powszechnego użytku, jak niektóre elementy wyposażenia wnętrza, opakowania i folie, produkty jednorazowe, jak i przy produkcji artykułów biomedycznych. Coraz częściej stosowany jest do tworzenia nowoczesnych, bioresorbowalnych implantów, protez, nici i masek chirurgicznych, a także odzieży medycznej [14].

Ze względu na możliwość syntezy PLA o różnych właściwościach, dostępność czystych enancjomerów kwasu L-LA i D-LA jest bardzo pożądana. Chemiczna synteza kwasu mlekowego wymaga zastosowania surowców petrochemicznych, z których w pierwszym etapie wytwarzany jest aldehyd octowy. Następnie poprzez dodanie cyjanowodoru otrzymywany jest nityl kwasu mlekowego. Ostatni etap syntezy bazuje na kwasowej hydrolizie nitylu kwasu mlekowego do jego mieszaniny racemicznej [15, 16]. Do biotechnologicznej produkcji kwasu mlekowego wykorzystuje się różne szczepy bakterii fermentacji mlekowej, głównie należące do rodzaju *Lactobacillus* i *Lactococcus*, które są zdolne, wykorzystując aktywność stereospecyficznych zależnych od NAD<sup>+</sup> dehydrogenaz mleczanowych (LDHL i LDHD), do wytwarzania izomerów kwasu, co stwarza możliwości produkcji czystego optycznie LA. Otrzymywanie czystego izomeru L lub D kwasu mlekowego stanowi istotny problem, gdyż bakterie stosowane do procesu fermentacji mlekowej w skali przemysłowej zawierają zwykle więcej niż jeden typ dehydrogenazy mleczanowej, a stosunek ilościowy poszczególnych izomerów zależy od wzajemnej aktywności tych dehydrogenaz. Wiele badań poświęcono ulepszeniu produkcji czystych enancjomerów kwasu mlekowego, w tym również za pomocą inżynierii genetycznej [17, 18]. Organizmy genetycznie modyfikowane nie są obecnie chętnie wykorzystywane w przemyśle, zatem poszukiwanie dobrych producentów kwasu L- lub D-mlekowego w rozmaitych środowiskach zasiedlanych naturalnie przez bakterie mlekowe (*Lactic Acid Bacteria*, LAB) wydaje się dobrym pomysłem. W Katedrze Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej jest tworzona kolekcja środowiskowych szczepów LAB, które są badane pod kątem naturalnego potencjału do przemysłowego wykorzystania tych szczepów, w tym również do produkcji czystych enancjomerów kwasu mlekowego. W tej pracy prezentujemy 18 szczepów LAB, z których trzy są zdolne do produkcji w dużym nadmiarze kwasu L-mlekowego, a jeden charakteryzuje się wydajną produkcją LA z dużą przewagą izomeru D.

## **2. Materiał i metody**

### **2.1. Materiał do izolacji szczepów LAB**

Materiał do izolacji szczepów LAB pochodził z różnych regionów Polski i z Afryki i były to próbki mleka krowiego, wielbłądzicy i klaczy oraz materiał uzyskany na drodze fermentacji surowców roślinnych, takich jak kapusta biała i czerwona, ogórki, rzodkiewki, kalafior, papryka, buraki.

### **2.2. Metody**

#### **2.2.1. Izolacja czystych szczepów ze źródeł naturalnych**

Materiał stanowiący źródła do izolacji LAB wysiewano na stałą pożywkę MRS. Szalki inkubowano w warunkach beztlenowych przez 48 do 72 godzin w 37°C. Pojedyncze kolonie kilkukrotnie przeszczepiano na świeże podłoże stałe MRS, wykonując posiew redukcyjny. W każdym przypadku dążono do osiągnięcia tylko jednego rodzaju kolonii na szalce. Następnie wykonana została analiza makroskopowa, która polegała na ocenie morfologii otrzymanych kolonii bakteryjnych (m.in. wielkości, kształtu, koloru, przezroczystości, brzegu kolonii) zgodnie z wytycznymi dotyczącymi oceny makroskopowej morfologii bakterii [19]. Kolejnym krokiem była ocena mikroskopowa, podczas której przygotowano preparaty przyżyciowe oraz preparaty utrwalone i barwione metodą Grama. Barwienie wykonano według zaleceń producenta (Biomérieux). Oceniano jednorodność i morfologię komórek bakteryjnych w obrazie mikroskopowym.

#### **2.2.2. Hodowla bakterii w pożywce płynnej**

Pojedynczymi koloniami pobranymi z szalek z wyizolowanymi szczepami zaszczipiano 8 ml pożywki MRS i hodowano w 37°C. Bakterie hodowano w probówkach zamkniętych w pojemniku do hodowli beztlenowych w obecności generatora warunków beztlenowych Genbox (Biomérieux). Po 24, 48 i 72 h pobierano 1 ml próbki do oznaczenia stężenia kwasu L- i D-mlekowego.

#### **2.2.3. Optymalizacja temperatury hodowli wybranych szczepów**

Hodowle prowadzono w 50 ml płynnej pożywki MRS w 25, 30, 37 oraz 42°C, Inokulum stanowiły hodowle nocne dodawane w ilości 5% objętości pożywki. Hodowle były prowadzone w kolbach zamkniętych w szczelnych torbach polietylenowych, bez wytrząsania. Po 24, 48 i 72 h pobierano 1 ml próbki do oznaczenia stężenia kwasu L- i D-mlekowego.

#### **2.2.4. Charakterystyka biochemiczna wyizolowanych szczepów**

Do scharakteryzowania wyizolowanych szczepów pod kątem ich zdolności metabolicznych użyto komercyjnie dostępnych testów API 50CHL i API ZYM (Biomérieux) zgodnie z instrukcją producenta.

#### **2.2.5. Izolacja genomowego DNA ze szczepów bakteryjnych**

Z wyizolowanych szczepów przygotowano hodowle nocne w pożywce płynnej MRS. Po 12 h inkubacji hodowle odwirowano, a z osadu bakteryjnego wyizolowano genomowy DNA z użyciem zestawu DNA Genomic Mini (Eurx), zgodnie z instrukcją

producenta. W celu lizy grubej ściany komórkowej, charakterystycznej dla bakterii Gram-dodatnich, procedurę izolacji poprzedzono godziną inkubacją osadu w 200 µl buforu TES z dodatkiem lizozymu i mutanolizyny w temperaturze 37°C. Po zakończeniu izolacji uzyskany genomowy DNA zawieszono w 20 µl sterylnej wody. Jakość DNA oszacowano po rozdzieleniu próbki w 0,8% żelu agarozowym.

### 2.2.6. Ocena przynależności rodzajowej wyizolowanych szczepów bakteryjnych

Wyizolowany genomowy DNA posłużył jako matryca do przeprowadzenia łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) z użyciem starterów specyficznych rodzajowo. Ze względu na źródła materiału do izolacji, zastosowane podłoże selekcyjne oraz dokonane obserwacje makro i mikroskopowe, spodziewano się szczepów z rodzaju *Lactobacillus*. Amplifikacja fragmentu genomowego DNA *Lactobacillus*, kodującego region pomiędzy 16S a 23S rRNA, daje specyficzny obraz produktów na żelu agarozowym [20]. Zastosowano startery: 16-1A (forward): 5'-GAATCGCTA GTAATCG-3' oraz 23-1B (reverse): 5'-GGGTTCCCCATTCGGA-3' [21]. PCR (35 cykli) przeprowadzono w następujących warunkach:

- wstępna denaturacja (95°C, 5 min);
- denaturacja (95°C, 30 s);
- przyłączanie starterów (53°C, 30 s);
- elongacja (72°C, 90 s);
- końcowa elongacja (72°C, 5 min).

Produkty reakcji PCR rozdzielono za pomocą elektroforezy w 0,8% żelu agarozowym.

### 2.2.7. Oznaczanie przynależności gatunkowej szczepów z użyciem sekwencjonowania 16S rRNA

Genomowy DNA wyizolowany z czterech wybranych szczepów poddano reakcji PCR, w której powielono gen kodujący 16S rRNA. Użyto uniwersalnych starterów 27f: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' i 1492r: 5'-TACGGYTACCTTGTTAC GACTT-3' dających produkt o wielkości ok. 1500 par zasad. DNA otrzymany w reakcji PCR oczyszczano przy pomocy zestawu Clean-up (A&A Biotechnology) wg zaleceń producenta. W końcowym etapie materiał genetyczny eluowano z kolumny za pomocą jałowej wody dejonizowanej. Czystość uzyskanych produktów sprawdzono na 0,8% żelu agarozowym. Tak przygotowane i oczyszczone preparaty DNA oddano do sekwencjonowania w firmie Genomed. Uzyskane sekwencje analizowano przy użyciu programu BLAST.

### 2.2.8. Oznaczenie ilości kwasu mlekowego metodą enzymatyczną

Próbki o objętości 1 ml pobrane z hodowli płynnych wirowano w celu oddzielenia biomasy (12,0-13,4 tys. rpm, 6 min) i w supernatancie oznaczano kwas L- i D-mlekowy metodą spektrofotometryczną, mierząc przy 340 nm ilość NADH, powstającego w reakcji dehydrogenazy mleczanowej (LDH) przekształcającej kwas mlekowy w pirogronian. Oznaczenia przeprowadzono wg wskazówek producenta wykorzystując zestawy D-Lactic Acid i L-Lactic Acid firmy Megazyme, zawierające specyficzne enzymy, odpowiednio D-LDH i L-LDH.

### 2.2.9. Analiza HPLC kwasu octowego

Pomiar prowadzono przy pomocy kolumny Comosil 5C18-MS-II. Jako fazę ruchomą zastosowano 20 mM roztwór  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  przy szybkości przepływu 0,5 ml/min. Czas każdego pomiaru wynosił 40 min, po tym czasie zaobserwowano całkowity zanik pików. Stężenie kwasu octowego w płynach pofermentacyjnych obliczano na podstawie krzywej wzorcowej. W celu sporządzenia krzywej wzorcowej przygotowano 4 standardy kwasu octowego o stężeniach: 0,5; 1,0; 1,5 i 2,0 g/l. Dla każdego ze standardów pomiar przeprowadzono w trzech powtórzeniach, a następnie sporządzono wykres zależności pola powierzchni pików od stężenia kwasu octowego.

### 3. Wyniki

Wyizolowano 18 szczepów bakterii kwasu mlekowego pochodzących z różnych naturalnych źródeł roślinnych i zwierzęcych. Ze względu na źródła materiału do izolacji, zastosowane podłoże selekcyjne oraz dokonane obserwacje makro i mikroskopowe (preparaty przyżyciowe i zabarwione odczynnikiem Grama) (tabela 1), spodziewano się szczepów z rodzaju *Lactobacillus*. Reakcja PCR ze specyficznymi rodzajowo starterami potwierdziła przynależność wszystkich szczepów do rodzaju *Lactobacillus*.

Tabela 1. Charakterystyka wyizolowanych szczepów *Lactobacillus*

Szczep WUT	Źródło pochodzenia LAB	Charakterystyka makroskopowa (opis wzrostu na szalkach z podłożem MRS)	Charakterystyka mikroskopowa (preparaty przyżyciowe i utrwalone)
17/1	Mleko krowie (Afryka)	Kolonie średniej wielkości, okrągłe, lekko wypukłe błyszczące, brzegi kolonii regularne, kolor jasnokremowy	Średniej wielkości, regularne pałeczki występujące pojedynczo lub układające się po dwie komórki w kształt litery V
17/2	Przefermentowany sok z buraka (Polska, Mazowsze)	Kolonie duże, okrągłe, wypukłe, błyszczące, brzegi kolonii regularne, kolor beżowy	Średniej wielkości, regularne pałeczki tworzą charakterystyczne układy komórek w literę V, w polu widzenia widoczne krótkie łańcuszki do 5 komórek
17/3	Mleko krowie (Polska, Mazowsze)	Kolonie okrągłe i drobne, wypukłe, błyszczące, brzegi kolonii regularne, kolor beżowy, środek kolonii ciemniejszy	Średniej wielkości, regularne pałeczki tworzące charakterystyczny układ litery V, zazwyczaj występują po 2 komórki lub w większych skupiskach pojedynczych komórek
17/4	Mleko wielbłądźcy (Afryka)	Kolonie małe, okrągłe, wypukłe, błyszczące, brzegi kolonii równe, kolor biały	Drobne, regularne, cienkie pałeczki, tworzące długie łańcuszki do 15 komórek
17/5	Mleko wielbłądźcy II (Afryka)	Kolonie średniej wielkości okrągłe, wypukłe, błyszczące, o regularnych brzegach koloru	Regularne, średniej długości pałeczki tworzą charakterystyczne układy V,

		mlecznego	brak długich łańcuszków, komórki występują po 2 lub w dużych grupach pojedynczych pałeczek
17/6	Mleko kłaczy (Polska, Mazowsze)	Kolonie małe, okrągłe, wypukłe, błyszczące, o regularnych brzegach kolonii równe, kolor jasnobiały	Drobne, regularne pałeczki, tworzące układy komórek w literę V, występują krótkie łańcuszki do 5 komórek
17/7	Sok z kiszonej kapusty (Polska, Mazowsze)	Kolonie średniej wielkości, okrągłe, wypukłe, błyszczące, brzegi regularne, kolor beżowy	Duże pałeczki, tworzące charakterystyczne układy V, obecne łańcuszki od 3 do 7 komórek
17/8	Sok z kiszonych ogórków (Polska, Mazowsze)	Kolonie średniej wielkości, okrągłe, wypukłe, błyszczące, brzegi kolonii równe, kolor mleczny, wyraźne ciemne środki kolonii	Drobne pałeczki, tworzące układy komórek w kształcie litery V, w obrazie mikroskopowym widoczne łańcuszki do 9 komórek
17/9.1	Mleko krowie (Polska, Beskid Niski)	Kolonie duże, płaskie, lekko rozlane, błyszczące, brzegi kolonii nieregularne, lekko faliste, kolonie tarczowate, ze zgrubieniem na środku, kolor jasnobiały	Duże, długie, regularne pałeczki występujące pojedynczo lub po dwie komórki tworzą charakterystyczne układy w kształcie litery V, występują krótkie łańcuszki do 4 komórek
17/9.2	Mleko krowie (Polska, Beskid Niski)	Kolonie średniej wielkości okrągłe, wypukłe, błyszczące, brzegi kolonii równe, kolor mlecznobiały	Drobne, regularne pałeczki, tworzące układy komórek w kształt litery V, nie tworzą długich łańcuszków, zazwyczaj występują po 2 komórki w polu widzenia
17/10.1	Sok z kiszonych ogórków (Polska, Podlasie)	Kolonie średniej wielkości, okrągłe, płaskie, błyszczące, brzegi kolonii nieregularne, kolonie tarczowate, kolor jasno-biały	Długie, regularne, cienkie pałeczki, dużo pojedynczych komórek, występują długie, proste łańcuszki do 8 komórek
17/10.2	Sok z kiszonych ogórków (Polska, Podlasie)	Kolonie średniej wielkości, okrągłe, wypukłe, błyszczące, brzegi kolonii równe, kolor beżowy	Nieregularne pałeczki tworzące charakterystyczny układ V, występują długie, kręte łańcuszki do 7 komórek
17/11	Sok z kiszonej kapusty (Polska, Podlasie)	Kolonie drobne, okrągłe, wypukłe, błyszczące, brzegi kolonii równe, kolor mlecznobiały	Bardzo krótkie, grube, regularne pałeczki, tworzące charakterystyczny układ w kształcie litery V, w polu widzenia widoczne krótkie łańcuszki od 3 do 5 komórek
18/17	Sok z kiszonych ogórków (Polska, Mazowsze)	Kolonie małe, okrągłe, płaskie, brzegi kolonii równe, kolor beżowy	Drobne, regularne pałeczki, tworzące układy komórek w kształcie litery V, występują łańcuszki do 4 komórek oraz grupy pojedynczych komórek

18/21	Sok z kiszzonego kalafiora (Polska, Mazowsze)	Kolonie o średniej wielkości, okrągłe, błyszczące, brzegi kolonii równe, kolor beżowy z ciemniejszym środkiem	Drobne, regularne pałeczki, tworzące układy komórek w kształcie litery V, zazwyczaj występują po 2 komórki lub w większych skupiskach pojedynczych komórek
18/25	Sok z kiszzonej papryki (Polska, Mazowsze)	Kolonie małe, okrągłe, płaskie, matowe, brzegi kolonii równe, kolor beżowy	Drobne, regularne pałeczki, tworzące układy komórek w kształcie litery V, występują po 2 komórki lub w większych skupiskach pojedynczych komórek
18/32	Sok z kiszzonej czerwonej kapusty (Polska, Mazowsze)	Kolonie o małej i średniej wielkości, okrągłe, wypukłe, błyszczące, brzegi kolonii lekko rozmyte, kolor mlecznobiały	Pałeczki o średniej wielkości, tworzące układy komórek w kształcie litery V, występują długie, kręte łańcuszki do 8 komórek
18/35	Rzodkiewka (Polska, Mazowsze)	Kolonie o średniej wielkości, nieregularnym kształcie, płaskie, brzegi kolonii nieregularne i rozmyte, kolor mlecznobiały z ciemniejszym środkiem	Drobne, regularne pałeczki, tworzące układy komórek w kształcie litery V, występują po 2 komórki lub w większych skupiskach pojedynczych komórek

### 3.1. Charakterystyka biochemiczna wyizolowanych szczepów *Lactobacillus*

W celu ustalenia źródeł węgla, które mogą być wykorzystane przez wyizolowane szczepy zastosowano test API50CHL. Wszystkie szczepy metabolizowały D-glukozę, D-fruktozę, D-mannozę, N-acetyloglukozaminę i salicynę. Większość szczepów, z pojedynczymi wyjątkami fermentowała również D-galaktozę, D-rybozę, D-mannitol, D-sorbitol, amidalinę, arbutynę, eskulinę, D-celobiozę, D-maltozę, D-laktozę, D-trehalozę (WUT 17/4 nie fermentował D-rybozy, a WUT 17/5 D-mannitolu i D-maltozy). Szczep WUT 17/10.2, metabolizował tylko siedem źródeł węgla (D-galaktozę, D-glukozę, D-fruktozę, D-mannozę, D-mannitol, N-acetyloglukozaminę i salicynę), podczas gdy wyizolowany z tego samego źródła szczep WUT 17/10.1 mógł korzystać aż z dwudziestu dwóch źródeł węgla.

Test API ZYM pozwolił na określenie aktywności enzymatycznych, umożliwiających bakteriom uzyskiwanie odpowiednich składników odżywczych do wzrostu, adhezji lub unikania układu immunologicznego gospodarza. Wśród najczęściej występujących aktywności katalitycznych była naftolo-AS-BI-fosfohydrolaza (14 szczepów), aryloamidazy leucynowa i walinowa (12 szczepów), kwaśna fosfataza (11 szczepów), 9 szczepów produkowało  $\beta$ -glukozydazę, 7- $\alpha$ -glukozydazę, 7- $\beta$ -galaktozydazę. Szczepy WUT 17/2, WUT 17/4 i WUT 17/10.2 wykazywały aktywności esterazowe, a szczepy WUT 17/1 i WUT 17/11 produkowały N-acetylo- $\beta$ -glukozaminidazę. Żaden ze szczepów nie wykazywał aktywności alkalicznej fosfatazy, lipazy (C14), aryloamidazy cystynowej, trypsyny,  $\alpha$ -chymotrypsyny,  $\alpha$ -galaktozydazy,  $\alpha$ -glukonidazy,  $\alpha$ -mannozydazy i  $\alpha$ -fukozydazy.



## 3.2. Produkcja kwasu mlekowego w pożywce MRS przez wyizolowane szczepy *Lactobacillus*

### 3.2.1. Produkcja LA w temperaturze 37°C po 24, 48 i 72 h hodowli

Poszukując szczepów LAB wydajnie produkujących kwas mlekowy, a zwłaszcza takich, które wydzielalyby w nadmiarze jeden z enancjomerów, oznaczono metodą enzymatyczną ilości produkowanego kwasu L- i D-mlekowego w płynach pohodowlanych po 24, 48 i 72 godzinach hodowli. Wyniki oznaczeń przedstawiono w tabeli 2. Większość wyselekcjonowanych szczepów produkowała racemat kwasu mlekowego, ze stosunkiem enancjomerów L:D zbliżonym do 50%:50%. Sumarycznie, najwięcej kwasu mlekowego po 72 h hodowli wyprodukował szczep WUT 17/1 (24,5 g/l), a zaraz za nim szczep WUT 17/3 (21,1 g/l). Szczep WUT 17/3 okazał się również bardzo szybkim producentem, ponieważ łączna ilość wyprodukowanego LA bardzo nieznacznie zmieniła się pomiędzy 24., a 72. godziną hodowli. Najgorszym producentem kwasu mlekowego okazał się szczep WUT 17/10.1, który wyprodukował go zaledwie 12 g/l.

Tabela 2. Produkcja kwasu L- i D-mlekowego przez wyizolowane szczepy *Lactobacillus* w zależności od czasu hodowli

Szczep WUT	Stężenie kwasu mlekowego w płynie pohodowlanym [g/l]*								
	Po 24 h			Po 48 h			Po 72 h		
	L- LA	D- LA	L-LA [%]	L- LA	D- LA	L-LA [%]	L- LA	D- LA	L-LA [%]
17/1	6,3	11,9	34,6	5,4	12,4	30,3	12,5	12,0	51,1
17/2	8,7	0,2	97,8	17,4	0,4	98,0	17,1	1,8	90,6
17/3	7,5	11,1	40,3	8,0	10,1	44,3	9,5	11,6	44,9
17/4	5,5	0,2	96,1	8,7	3,4	72,0	10,7	4,6	69,9
17/5	6,5	0,6	91,6	13,6	0,6	96,1	14,4	1,1	92,9
17/6	6,4	8,6	42,5	8,1	10,5	43,5	9,8	11,1	47,0
17/7	4,4	9,0	32,9	7,1	10,5	40,3	8,3	10,7	43,7
17/8	4,1	7,1	36,5	8,0	9,7	45,2	8,2	10,3	44,2
17/9.1	12,2	0,4	96,7	16,1	0,8	95,4	17,5	0,8	95,7
17/9.2	5,3	8,2	39,3	6,3	9,4	40,4	8,4	12,4	40,3
17/10.1	1,9	1,0	65,5	5,4	6,0	48,9	6,0	6,1	49,5
17/10.2	5,3	2,3	69,9	17,4	6,5	60,8	10,2	6,9	59,9
17/11	3,5	5,9	37,2	8,0	10,3	38,5	7,3	12,1	37,6
18/17	7,5	6,3	54,2	7,5	7,1	51,2	8,4	8,4	50,0
18/21	7,1	8,0	46,9	7,0	8,2	45,9	6,8	8,0	46,2
18/25	6,5	8,3	44,1	6,7	7,4	47,3	6,3	9,2	40,4
18/32	6,4	6,6	49,2	7,2	7,4	49,2	7,1	7,6	48,3
18/35	6,5	5,6	53,8	8,9	7,7	53,7	7,3	7,8	48,3

\*Większość oznaczeń wykonano w trzech powtórzeniach – błąd SD wynosił średnio 9,9%, Część oznaczeń wykonano w dwóch powtórzeniach – uzyskane wyniki nie różniły się od średniej w zakresie 0,2-6,9%.

Wśród wyselekcjonowanych szczepów, WUT 17/2, WUT 17/5 i WUT 17/9.1 produkowały w znacznym nadmiarze izomer L-LA. Procentowy udział enancjomeru L zmienił się w czasie hodowli – dla szczepów WUT 17/2 i WUT 17/5 najwyższy był po 48 h i wynosił odpowiednio 98% i 96,1%, a dla szczepu WUT 17/9.1 po 24 h wynosił 96,7%, a po 48 i 72 h – ok. 95,5%. Spośród szczepów najwydajniej

produkujących racemat kwasu mlekowego, WUT 17/1 produkował w przewodzie kwas D-mlekowy po 24 i 48 h – odpowiednio 65,4% i 69,7%, ale po 72 h ta przewaga była niezauważalna. Niestety, nie wyselekcjonowano szczepu, który wydzielaliby wyłącznie (lub w dużym nadmiarze) kwas D-mlekowy w badanych warunkach. Dla wszystkich szczepów obliczono stopień wykorzystania glukozy oraz produktywność kwasu mlekowego (tabela 3).

Tabela 3. Wydajność produkcji i produktywność kwasu mlekowego przez wyizolowane szczepy *Lactobacillus*

Szczep WUT	Wydajność [g LA/g glukozy]*			Produktywność LA (g/lh)		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
17/1	0,91	0,89	1,23	0,76	0,37	0,34
17/2	0,45	0,89	0,94	0,37	0,37	0,26
17/3	0,93	0,90	1,05	0,78	0,38	0,29
17/4	0,29	0,60	0,76	0,24	0,25	0,21
17/5	0,35	0,71	0,78	0,29	0,30	0,22
17/6	0,75	0,93	1,05	0,62	0,39	0,29
17/7	0,67	0,88	0,95	0,56	0,37	0,26
17/8	0,56	0,89	0,93	0,47	0,37	0,26
17/9.1	0,63	0,85	0,91	0,52	0,35	0,25
17/9.2	0,68	0,78	1,04	0,56	0,33	0,29
17/10.1	0,15	0,57	0,60	0,12	0,24	0,17
17/10.2	0,38	1,19	0,85	0,32	0,50	0,24
17/11	0,47	0,92	0,97	0,39	0,38	0,27
18/17	0,69	0,73	0,84	0,57	0,30	0,23
18/21	0,75	0,76	0,74	0,63	0,32	0,21
18/25	0,33	0,71	0,77	0,62	0,29	0,22
18/32	0,65	0,73	0,73	0,54	0,31	0,20
18/35	0,61	0,83	0,76	0,51	0,35	0,21

\* Obliczenie oparte na informacji producenta o zawartości glukozy w pożywce MRS (~20 g glukozy na 1 l pożywki)

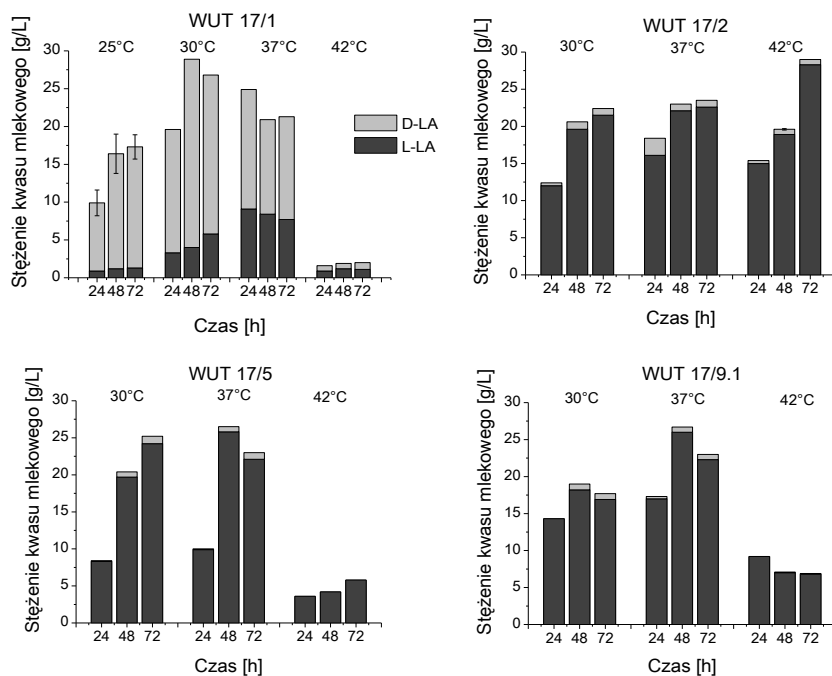
Za najbardziej interesujące z punktu widzenia uzyskania czystego enancjomeru L-LA uznano szczepy WUT 17/2, WUT 17/5 i WUT 17/9.1, natomiast szczep WUT 17/1 wydawał się obiecujący ze względu na dużą ilość produkowanego kwasu mlekowego i przewagę enancjomeru D-LA. Wymienione cztery szczepy postanowiono poddać badaniom zmierzającym do znalezienia optymalnych warunków do wzrostu bakterii i produkcji enancjomerów LA.

Izolacja kwasu mlekowego, a zwłaszcza oddzielenie go od innych kwasów organicznych, nie jest łatwa, wobec tego korzystne jest stosowanie szczepów homofermentatywnych. Szczepy heterofermentatywne LAB oprócz kwasu mlekowego najczęściej produkują kwas octowy, wobec tego przeprowadzono pomiar kwasu octowego w płynach pofermentacyjnych metodą HPLC. Szczepy WUT 17/1, WUT 17/2 i WUT 17/5 nie produkowały mierzalnych ilości kwasu octowego, a szczep WUT 17/9.1 produkował go w stężeniu  $1,90 \pm 1,23$  g/l.

### 3.2.2. Zależność produkcji enancjomerów LA od temperatury

Wybrane cztery szczepy hodowano w pożywce MRS w temperaturze 30°C, 37°C oraz 42°C, a szczep WUT 17/1 hodowano również w temperaturze 25°C ze względu

na bardzo dobry wzrost tego szczepu w temp. 30°C. Stężenie kwasu L- i D-mlekowego oznaczono w próbkach pobieranych po 24, 48 i 72 godzinach hodowli (rysunek 5). Optymalną temperaturą do wzrostu i produkcji LA przez szczepy WUT 17/2, WUT 17/5 i WUT 17/9.1 było 37°C, a dla szczepu WUT 17/2 nawet 42°C przy dłuższym czasie hodowli. Zawartość enancjomeru L-LA w produkowanym kwasie mlekowym, w zależności od temperatury i czasu hodowli, mieściła się w zakresie 96-100%. Szczep WUT 17/1 najwięcej kwasu mlekowego produkował w temperaturze 30°C po 48 i 72 h hodowli. Dla tego szczepu zaobserwowano ciekawą zależność proporcji D-LA:L-LA od temperatury – im niższa, tym większa była przewaga enancjomeru D, ale jednocześnie ilość produkowanego kwasu mlekowego była mniejsza z powodu słabszego wzrostu bakterii. W temperaturze 25°C bakterie produkowały po 24, 48 i 72 h hodowli odpowiednio 90,9, 92,7 i 92,5% D-LA, a w 30°C odpowiednio 83,2, 86,2, i 78,4% D-LA. W temperaturze 37°C bakterie produkowały racemat z nieznaczną przewagą kwasu D-mlekowego – 63,5, 59,8 i 63,8%. W temperaturze 42°C wzrost szczepu WUT 17/1 był bardzo słaby, co przełożyło się na niewielką ilość produkowanego kwasu mlekowego, z niewielką przewagą kwasu L-mlekowego.



Rysunek 5. Zależność produkcji enancjomerów kwasu mlekowego od temperatury i czasu hodowli. Każde oznaczenie zostało wykonane co najmniej w dwóch powtórzeniach, których wyniki różniły się od średniej w zakresie 0,0-19,9%

### 3.3. Identyfikacja przynależności gatunkowej wybranych szczepów

Za pomocą sekwencjonowania 16S RNA i programu BLAST zidentyfikowano dotychczas cztery gatunki *Lactobacillus* (tabela 4).

Tabela 4. Wyniki identyfikacji gatunkowej wybranych szczepów

Szczep WUT	Zidentyfikowany gatunek	Identyczność sekwencji z bazą danych
17/1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100%
17/2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	99%
17/3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100%
17/5	<i>Lactobacillus paracasei/casei</i>	100%

Planowane jest przeprowadzenie identyfikacji pozostałych szczepów oraz kolejnych, izolowanych z innych źródeł naturalnych, dodawanych do kolekcji.

## 4. Dyskusja

Możliwości licznych zastosowań bakterii fermentacji mlekowej w różnych gałęziach przemysłu stymulują badaczy do izolacji nowych szczepów ze źródeł naturalnych. Dokładna charakterystyka szczepu pozwala określić jego potencjał do konkretnego zastosowania przemysłowego. Zapotrzebowanie na kwas mlekowy nieustająco rośnie, a nowe techniki stosowane w nauce pozwalają na coraz wydajniejszą jego produkcję z użyciem mikroorganizmów. W niniejszej pracy badawczej przedstawiono 18 wyizolowanych szczepów LAB, pochodzących z mleka krowiego, wielbłądziego i kłaczy lub z przefermentowanych surowców roślinnych. Szczepy te zakwalifikowano do rodzaju *Lactobacillus*. Chang i wsp. [22] scharakteryzowali biochemicznie 2309 szczepów bakterii pochodzących z różnych rodzajów kimchi, tradycyjnej potrawy koreańskiej, w skład której wchodzi fermentowane warzywa, takie jak kapusta, rzepa czy ogórki. Wyizolowane szczepy zostały zidentyfikowane jako *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*, *Lb. Sakei* i *Leuconostoc mesenteroides*. Vantsawa i wsp. [23] zajmowali się izolacją bakterii z nigeryjskiego mleka krowiego, w którym stwierdzili obecność szczepów *Lb. saliverius*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. bulgaricus* i *Lb. delbruecki ssp. lactis*. Natomiast grupa Yelnetty i wsp. [24] wyizolowała z mleka koziego i scharakteryzowała szczepy zidentyfikowane jako *Lb. plantarum* i *Lb. pentosus*. Świadczy to o szerokim spektrum występowania LAB zarówno w produktach pochodzenia roślinnego, jak i w produktach mlecznych. We wspomnianych produktach zauważalna jest wyraźna dominacja rodzaju *Lactobacillus* nad innymi rodzajami LAB. Produkty mleczne oraz fermentowane stanowią dobre źródła do izolacji i poszukiwania nowych, obiecujących szczepów, które łatwo zmieniają się i nabywają nowe zdolności w ramach adaptacji do środowiska.

Charakterystyka wyizolowanych szczepów pod kątem zdolności do fermentacji różnych źródeł węgla została wykonana przy użyciu testów API 50 CHL. Wyniki testów są spójne z wykonanymi przez Yelnetty i wsp. [24] i charakterystyczne dla rodzaju *Lactobacillus*. W związku z bytowaniem LAB na powierzchni roślin obserwuje się dużą zdolność do fermentacji cukrów roślinnych, takich jak fruktoza, eskulina czy salicyna. Większość szczepów również bardzo dobrze fermentuje cukry

mleczne, jak laktoza, czy jej składowe, glukozę i galaktozę, co umożliwia bakteriom świetne funkcjonowanie w produktach mlecznych. Grupa Stoyanovski i wsp. [25] przeprowadziła analizę aparatów enzymatycznych szczepów LAB odpowiedzialnych za fermentację produktów mięsnych. Wykazano niską aktywność enzymów lipolitycznych, co pokrywa się z wynikami uzyskanymi w tej pracy. Większość szczepów opisanych przez Stoyanovski i wsp. [25] i Papamanoli i wsp. [26] oraz 12 szczepów scharakteryzowanych w tej pracy, produkowała arylamidazę leucyny i waliny, co dowodzi przystosowania LAB do życia w środowisku bogatym w białka i aminokwasy. Jednakże nie wszystkie z uzyskanych wyników testów API Zym w różnych pracach badawczych są spójne, np. Stoyanovski i wsp. [25] opisali bardzo niską aktywność fosfatazy kwaśnej, podczas gdy w niniejszej pracy dla tego enzymu uzyskano wynik pozytywny dla 10 szczepów. Różnice w aktywności enzymatycznej wynikają ze zdolności bakterii do przystosowywania się do środowiska bytowania i eliminacji zbędnych ścieżek metabolicznych na korzyść innych, bardziej pożądanых w konkretnych warunkach.

Kwas mlekowy, będący głównym metabolitem LAB, został w 2010 roku zamieszczony w raporcie wydanym przez Departament Energii USA jako potencjalny element budulcowy na przyszłość [27]. Duże znaczenie tego związku chemicznego i ogrom jego potencjalnych zastosowań, skłaniają do poszukiwań alternatywnych pożywek, na których produkcja LA mogłaby przebiegać wydajnie i jednocześnie taniej. Boontim i wsp. [28] zajmowali się izolacją szczepów syntetyzujących wyłącznie kwas L-mlekowy. Po zoptymalizowaniu warunków na pożywce MRS osiągnęli produkcję 10 g/l L-LA z czystością optyczną 98,7%. Singhvi i wsp. [29] z użyciem różnych szczepów *Lactobacillus* na pożywce MRS uzyskali produkcję w granicach 36-49 g/l. Wyizolowany w niniejszej pracy szczep WUT 17/9.1, po 72 h produkował L-LA w ilości 17,5 g/l przy czystości optycznej ponad 95%, natomiast najlepszy producent racematu, szczep WUT 17/1 (*Lb. plantarum*), po tym samym czasie produkował 24,5 g/l, co całkiem dobrze plasuje wyizolowane szczepy w porównaniu z innymi opisanymi w literaturze. Oczywiście, syntezę LA można znacząco ulepszyć, przenosząc produkcję z probówek i kolb laboratoryjnych do bioreaktora, gdzie warunki, takie jak pH czy temperatura podlegają dużo lepszej kontroli. Możliwe jest także uzupełnianie zużywanego substratu oraz bieżące odprowadzanie metabolitów, co dodatkowo usprawnia produkcję. W ten sposób Coelho i wsp. [30] po 48 h uzyskali 90 g/l kwasu mlekowego, a Dumbrepatil i wsp. [31] 166 g/l używając szczepu *Lb. delbrueckii*. Natomiast zespół Okano i wsp. [32], posługując się metodami inżynierii genetycznej, stworzył szczep *Lb. plantarum* produkujący L-LA z czystością optyczną ponad 98%. Metody inżynierii genetycznej, polegające na usunięciu genu kodującego jedną z dehydrogenaz mleczanowych (w tym przypadku D-LDH) oraz racemazę mleczanową, stają się coraz bardziej powszechne i pozwalają na znaczne usprawnienia w ilości i czystości produkowanego LA.

## 5. Podsumowanie

W pracy przedstawiono 18 szczepów *Lactobacillus* z powstającej w Katedrze Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków kolekcji szczepów LAB. Badania nad identyfikacją gatunkową szczepów i określaniem ich potencjału do wykorzystania w różnych gałęziach przemysłu trwają. Spośród przedstawionych szczepów ocenionych pod kątem produkcji enancjomerów kwasu mlekowego cztery wydają się mieć potencjał aplikacyjny. Trzy z nich produkują w dużej przewadze enancjomer L-LA, a jeden w odpowiednich warunkach produkuje znacznie więcej enancjomeru D. Badania nad optymalizacją warunków hodowli w bioreaktorze (pH, szybkość mieszania, skład pożywki, itp.), zmierzające do osiągnięcia jak najwyższej wydajności oraz produkcji pojedynczych enancjomerów kwasu mlekowego, są w toku.

## Podziękowania

Badania zostały sfinansowane przez Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej.

## Literatura

1. Ewaschuk J.B., Naylor J.M., Zello G.A., *D-lactate in human and ruminant metabolism*, Journal of Nutrition, 135, 2005, 1619-1625.
2. Rogers P., Chen J.S., Zidwick M.J., *Organic Acid and Solvent Production: Acetic, Lactic, Gluconic, Succinic, and Polyhydroxyalkanoic Acids*, [w:] Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (red.), The Prokaryotes, Springer, Berlin, Heidelberg, 2013, 21-34.
3. Ameen S.M., Caruso G., *Lactic Acid in the Food Industry*, Chemistry of Foods Springer International Publishing, Cham, 2017.
4. Weinberg Z.G., *Preservation of Forage Crops by Solid-state Lactic Acid Fermentation-Ensiling*, [w:] Pandey A., Soccol C.R., Larroche C. (red.), Current Developments in Solid-state Fermentation, Springer, Nowy Jork, 2008.
5. Ramzi A.A. Abd, Azzam A., Othman N.Z., Malek R. Abd, Leng O.M., Aziz R., El Enshasy H.A., *Lactic acid applications in pharmaceutical and cosmeceutical industries*, Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 7, 2015, 729-735.
6. Van Wouwe P., Dusselier M., Vanleeuw E., Sels B., *Lactide synthesis and chirality control for polylactic acid production*, ChemSusChem, 9, 2016, 907-921.
7. Gołębiowski J., Gibas E., Malinowski R., *Wybrane polimery biodegradowalne – otrzymywanie, właściwości, zastosowanie*, Polimery, 53, 2008, 11-12.
8. Drumright R.E., Gruber P.R., Henton D.E., *Polylactic acid technology*, Advanced Materials, 12, 2000, 1841-1846.
9. Lunt J., *Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers*, Polymer Degradation and Stability, 59, 1998, 145-152.
10. Wee Y.J., Kim J.N., Ryu H.W., *Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications*, Food Technology and Biotechnology, 44, 2006, 163-172.
11. Ahmed J., Zhang J.-X., Song Z., Varshney S.K., *Thermal properties of polylactides. Effect of molecular mass and nature of lactide isomer*, Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 95, 2009, 957-964.
12. Garlotta D.A., *Literature Review of Poly(Lactic Acid)*, Journal of Polymers and the Environment, 9, 2001, 63-84.
13. Sodergard A., Stolt M., *Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition*, Progress in Polymer Science, 27, 2002, 1123-1163.
14. Żenkiewicz M., Richert J., *Synteza, właściwości i zastosowanie polilaktydu*, Przetwórstwo Tworzyw, 5, 2009, 192-199.

15. Vijayakumar J., Aravindan R., Viruthagiric T., *Recent trends in the production, purification and application of lactic acid*, Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 2008, 22, 245-264.
16. Pietraszek P., Dybka K., Walczak P., Otlewska A., Rygała A., Ołtuszek-Walczak E., *Mikrobiologiczna produkcja kwasu mlekowego z surowców odnawialnych*, Polish Journal of Agronomy, 2014, 16: 45-56.
17. Ferain T., Garmyn D., Bernard N., Hols P., Delcour J., *Lactobacillus plantarum ldhL gene: overexpression and deletion*, Journal of Bacteriology, 176, 1994, 596-601.
18. Gandini C., Tarraran L., Kalemasi D., Pessione E., Mazzoli R., *Recombinant Lactococcus lactis for efficient conversion of cellodextrins into L-lactic acid*, Biotechnology and Bioengineering, 114, 2017, 2807-2817.
19. Varghese N., Joy P.P., *Microbiology Laboratory Manual*, Kerala Agricultural University, Pineapple Research Station 2014, 18-19.
20. Tannock G.W., *Identification of Lactobacilli and Bifidobacteria*, Current Issues in Molecular Biology, 1, 1999, 53-64.
21. Tilsala-Timisjarvi A., Alatossava T., *Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR*, International Journal of Food Microbiology, 35, 1997, 49-56.
22. Chang J.H., Shim Y.Y., Cha S.K., Chee K.M., *Probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from kimchi*, Journal of Applied Microbiology, 2010, 109, 220-230.
23. Vantsawa P.A., Maryah U.T., Timothy B., *Isolation and identification of lactic acid bacteria with probiotic potential from fermented cow milk (Nono) in Unguwar Rimi Kaduna State Nigeria*, American Journal of Molecular Biology, 2017, 7, 99-106.
24. Yelnetty A., Purnomo H., Purwadi, Mirah A., *Biochemical characteristics of lactic acid bacteria with proteolytic activity and capability as starter culture isolated from spontaneous fermented local goat milk*, Journal of Natural Sciences Research, 2014, 4, 137-146.
25. Stoyanovski S., Gacovski Z., Antonova-Nikolova S., Kirlov N., Ivanova I., Tenev T., Hadjinesheva V., *API Zym enzymatic profile of lactic acid bacteria isolated from traditional bulgarian meat product „Lukanka”*. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 2013, 19, 86-89.
26. Papamanoli E., Tzanetakis N., Lipopoulou-Tzanetaki E., Kotzekidou P., *Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dryfermented sausage in respect of their technological and probiotic properties*, Meat Science, 2003, 65, 859-867.
27. Komesu A., Martins P.F., Lunelli B.H., Oliveira J., Filho R.M., Wolf Maciel M.R., *Evaluation of lactic acid purification from fermentation broth by hybrid short path evaporation using factorial experimental design*, Separation and Purification Technology, 2014, 136, 233-240.
28. Boontim N., Khanongnuch C., Pathom-aree W., Niamsup P., Lumyong S., *Production of L-lactic acid by thermotolerant lactic acid bacteria*, Chiang Mai Journal of Science, 2018, 45, 68-76.
29. Singhvi M., Zendo T., Gokhale D., Sonomoto K., *Greener L-lactic acid production through in situ extractive fermentation by an acid-tolerant Lactobacillus strain*, Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102, 6425-6435.
30. Coelho L.F., de Lima C.J.B., Rodovalho C.M., Bernardo M.P., Contiero J., *Lactic acid production by new Lactobacillus plantarum LMISM6 grown in molasses: optimization of medium composition*, Brazilian Journal of Chemical Engineering, 2011, 28, 27-36.
31. Dumbrepatil A., Adsul M., Chaudhari S., Khire J., Gokhale D., *Utilization of molasses sugar for lactic acid production by Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii mutant Uc-3 in batch fermentation*, Applied Environmental Microbiology, 2008, 74, 333-335.
32. Okano K., Uematsu G., Hama S., Tanaka T., Noda H., Kondo A., Honda K., *Metabolic Engineering of Lactobacillus plantarum for Direct l-Lactic Acid Production From Raw Corn Starch*, Biotechnol Journal, 2018, 13, 1700517.

## Produkcja enancjomerów kwasu mlekowego przez bakterie

### Streszczenie

Kwas mlekowy (LA) jest cennym produktem wykorzystywanym w wielu gałęziach przemysłu. Jednym z ważnych zastosowań jest synteza polilaktydów (PLA) – biokompatybilnych i biodegradowalnych polimerów LA. Właściwości PLA zależne są od kontrolowanej zawartości izomerów optycznych L i D kwasu mlekowego. Produkcja kwasu mlekowego przez dobrane szczepy bakterii, w przeciwieństwie do syntezy chemicznej, umożliwia uzyskanie pojedynczych enancjomerów LA. Celem tej pracy była izolacja szczepów bakterii kwasu mlekowego (LAB) z naturalnych środowisk i ich selekcja pod kątem wydajnej produkcji izomeru L- i D-LA. Z próbek mleka krowiego, wielbłądźcy i kłaczy oraz materiału uzyskanego na drodze fermentacji surowców roślinnych wyizolowano 18 szczepów *Lactobacillus*, które oceniono pod kątem produkcji kwasu L- i D-mlekowego oznaczanego w płynach pochodowlanych metodą enzymatyczną. Cztery szczepy, ocenione jako mające potencjał przemysłowy, wybrano do dalszych badań. Trzy z nich (WUT 17/2, WUT 17/5 i WUT 17/9) produkowały w zakresie 96-100% L-LA, niezależnie od temperatury hodowli, podczas gdy jeden (WUT 17/1), produkujący racemat w temperaturze 37°C, produkował D-LA w 90-92,7% nadmiarze w temperaturze 25°C. Badania nad optymalizacją warunków hodowli szczepów w celu uzyskania wydajnej produkcji pojedynczych enancjomerów kwasu mlekowego są w toku.

Słowa kluczowe: kwas L-mlekowy, kwas D-mlekowy, bakterie mlekowe, LAB, polilaktyd

## The production of lactic acid enantiomers in bacteria

### Abstract

Lactic acid (LA) is a valuable product used in variety of industrial branches. One of its important applications is the synthesis of polylactides (PLA) – biocompatible and biodegradable LA polymers. PLA properties depend on controlled L-LA and D-LA content. The production of lactic acid by selected bacterial strains, in contrary to chemical synthesis, allows to obtain the single LA enantiomer. The goal of this work was the isolation of lactic acid bacteria (LAB) strains from natural environments and their selection for efficient production of single L- or D-LA isomer. Eighteen *Lactobacillus* strains have been isolated from cow, camel and mare milk, as well as from plant silage material. The strains have been evaluated as producers of L- and D-LA that were assayed by enzymatic method. Four strains, considered as potentially applicable in industry, were chosen for further investigation. Three of them (WUT 17/2, WUT 17/5 i WUT 17/9) produced L-LA in 96-100% excess independently on culture temperature, while one (WUT 17/1), producing LA racemate at 37°C, produced D-LA in 90-92,7% excess at 25°C. The studies on optimization of culture conditions in order to facilitate the efficient production of single LA enantiomer are in progress.

Keywords: L-lactic acid, D-lactic acid, lactic acid bacteria, LAB, polylactide



## Diagnostyka pałeczek *Legionella* w materiale klinicznym

### 1. Wstęp

Bakterie z rodzaju *Legionella* należą do względnych, wewnątrzkomórkowych patogenów zasiedlających ekosystemy wodne oraz sztuczne systemy dystrybucji wody. Do zakażenia ludzi dochodzi najczęściej poprzez inhalację skażonego bakteriami wodno-powietrznego aerozolu. Infekcja pałeczkami *Legionella* określana jako legionelloza może przebiegać w postaci dwóch odrębnych klinicznie zespołów chorobowych: gorączki Pontiac oraz choroby legionistów. Pałeczki *Legionella pneumophila* serogrupy 1 są czynnikiem etiologicznym najczęściej wywołującym legionelozowe zapalenie płuc. Bakteria ta odpowiedzialna jest za ponad 80% laboratoryjnie zdiagnozowanych przypadków legionellozy nabytej zarówno w środowisku zamieszkania, jak i w szpitalach [91].

Brak specyficznych objawów klinicznych legionellozy jest główną przyczyną trudności w odróżnianiu tego schorzenia od zapalenia płuc o innej etiologii. Wykrywanie pałeczek *Legionella* w materiale klinicznym związane jest z szeregiem trudności dotyczących m.in. długiego czasu generacji bakterii lub ich szczególnych wymagań wzrostowych. Do stosowanych obecnie metod diagnostycznych legionellozy należy izolacja drobnoustrojów z materiału klinicznego oraz ich hodowla, wykrywanie obecności antygeny *Legionella* w moczu i tkankach, badanie poziomu miana swoistych przeciwciał w surowicy oraz testy genetyczne.

### 2. Zakażenie i transmisja pałeczek *Legionella*

Pałeczki *Legionella* występują zarówno w naturalnych ekosystemach wodnych, jak i sztucznych systemach dystrybucji wody. Zasadniczą drogą zakażenia człowieka jest wdychanie skażonego bakteriami wodno-powietrznego aerozolu o średnicy kropeł od 0,2 do 0,5  $\mu\text{m}$  [94]. Rzadko dochodzi do zakażenia poprzez aspirację płynów lub zachłyśnięcia się wodą zawierającą bakterie *Legionella* [103]. Udokumentowano przypadki zainfekowania rany na skutek przemywania skażoną wodą wodociągową [73] lub wprowadzeniem patogenu do dróg oddechowych pacjenta poprzez użycie nieodpowiednio odkażonych respiratorów, inhalatorów i innego sprzętu medycznego [34]. Na terenie Australii i Nowej Zelandii odnotowuje się zakażenia wywołane *L. longbeachae* związane z użytkowaniem podłóż ogrodniczych, kompostów oraz innych materiałów ulegających procesom rozkładu (np. kora, trociny). Przepuszczalną drogą przeniesienia pałeczek *Legionella* z tego typu materiałów jest aspiracja lub aerolizacja patogenów obecnych w pyłe [106].

Infekcje *L. pneumophila* dotyczą zarówno ludzi, jak i zwierząt gospodarczych np. bydła, koni, owiec, zwierząt laboratoryjnych m.in. świnek morskich, szczurów oraz zwierząt dzikich, takich jak mały czy antylopy [23]. Główną drogą przenoszenia

---

<sup>1</sup> marta.szysz@poczta.umcs.lublin.pl, Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin.

infekcji jest wodno-powietrzny aerozol, ale w 2016 roku ukazała się praca, w której opisany został przypadek transmisji *L. pneumophila* szczepu PtVFX/2014 z człowieka na człowieka [14].

### 3. Manifestacje kliniczne legionellozy

Zakażenia bakteriami *Legionella* manifestują się w postaci dwóch zespołów chorobowych o klinicznie odmiennym przebiegu: choroby legionistów oraz gorączki Pontiac. Rzadko diagnozowanymi formami legionellozy jest izolowana postać pozapłucna, samoograniczające się infekcje oraz bezobjawowa serokonwersja [57]. *L. pneumophila* wykorzystuje makrofagi płucne, monocyty, fibroblasty oraz komórki nabłonkowe typu I i II pęcherzyków płucnych do wewnątrzkomórkowej replikacji, prowadząc do rozwoju zapalenia płuc. Przypadki izolacji *Legionella* z tkanki pozapłucnej, najczęściej serca, dotyczą głównie pacjentów z osłabionym układem odpornościowym. Pałeczki *Legionella* wykrywane są także w mózgu, skórze, układzie moczowo-płciowym lub mięśniowo-szkieletowym [78, 43, 58, 3].

#### 3.1. Gorączka Pontiac

Symptomy gorączki Pontiac przypominają grypę z towarzyszącą gorączką, osłabieniem, apatią, kaszlem, bólami i zawrotami głowy, bólem gardła, mięśni i stawów oraz słabą koordynacją ruchową. Ponadto występuje ból w klatce piersiowej, duszność, nudności, wymioty, biegunka, a także stan zapalny błony śluzowej i krwawienie z nosa, bóle oczu, światłowstręt, bezsenność oraz drażliwość [67]. Choroba mija w ciągu dwóch do pięciu dni bez specyficznego leczenia. Z powodu braku charakterystycznych objawów gorączka Pontiac jest często niepoprawnie diagnozowana i przez to rzadziej wykrywana niż choroba legionistów [95]. Okres inkubacji choroby trwa od 20 do 48 godzin, średnio 36. Jest znacznie krótszy niż w przypadku choroby legionistów, gdzie okres ten sięga od dwóch do dziesięciu dni [11].

#### 3.2. Choroba legionistów

Wczesnymi objawami choroby legionistów są bóle głowy i mięśni oraz ogólne osłabienie organizmu. Dochodzi następnie do gwałtownego wzrostu temperatury do 40°C oraz wystąpienia dreszczy. Suchy kaszel, któremu często towarzyszy ból w klatce piersiowej, ma tendencje do przechodzenia w kaszel mokry. Rzadko występuje odkrztuszanie śluzowo-ropnej wydzieliny z krwawą treścią. U pacjentów występuje także duszność, bóle brzucha, biegunka i inne żołądkowo-jelitowe dolegliwości. Do pozapłucnych objawów należy również krwawienie z górnych i dolnych odcinków przewodu pokarmowego, które najprawdopodobniej związane jest z ogólnoustrojowym osłabieniem. Dodatkowo dosyć często obserwuje się krótkotrwałe i łagodne upośledzenie czynności nerek. Legionelozowe zapalenie płuc, często obustronne i wielopłatowe, charakteryzuje się gwałtownym początkiem infekcji z wysoką temperaturą, występowaniem plamistych nacieków na tkance płucnej oraz opornością na leczenie antybiotykami  $\beta$ -laktamowymi [57, 16]. Liczne nacieki obejmują najczęściej peryferyjne części płatów płucnych. Ponadto zakażenie *L. pneumophila* doprowadza do rozwoju stanu zapalnego w obrębie pęcherzyków płucnych z towarzyszącym obrzękiem nabłonka oraz znacznym pogrubieniem tkanki śródmiąższowej [76].

#### 4. Czynniki ryzyka

Infekcja dróg oddechowych wywołana przez bakterie *Legionella* powoduje wystąpienie objawów o zróżnicowanych stopniu nasilenia: od łagodnej formy grypopodobnej gorączki Pontiac po wielopłatowe zapalenie płuc zwane chorobą legionistów ze śmiertelnością sięgającą od 10-15% lub wyższą w przypadku zbyt późno rozpoczętego leczenia. Przyczyna takiej rozbieżności stopnia zaawansowania choroby nie została w pełni wyjaśniona [16].

Choroba legionistów stanowi od 2% do 9% przypadków zapalenia płuc u osób dorosłych. U dzieci odsetek ten wynosi poniżej 1% i najczęściej dotyczy infekcji nabytych w szpitalu u wcześniaków, dzieci z dysplazją oskrzelowo-płucną lub leczonych kortykosteroidami [108]. Statystycznie najbardziej narażeni na infekcje pałeczkami *Legionella* są mężczyźni w wieku 70-79 lat. Innym czynnikiem predysponującym do zachorowania na chorobę legionistów jest palenie papierosów, zwiększające ryzyko infekcji nawet 2-, 4-krotnie (zależność ta nie dotyczy gorączki Pontiac). Wysoki odsetek chorych na legionellozę stanowią pacjenci z nowotworami układu krwiotwórczego i niewydolnością nerek [77]. Prawdopodobieństwo zakażenia bakteriami *Legionella* wzrasta także u pacjentów z przewlekłymi chorobami serca, układu oddechowego, nerek, a także u diabetyków i pacjentów przyjmujących immunosupresanty po zabiegach transplantacji głównie płuc, nerek, serca, rzadziej szpiku kostnego [76]. Stan immunosupresji jest szczególnym czynnikiem predysponującym do nabycia szpitalnego zakażenia bakteriami *Legionella*. Osłabienie układu odpornościowego pacjenta dodatkowo przyczynia się do zwiększenia ryzyka wystąpienia niewydolności oddechowej [53]. Zatwierdzona przez Światową Organizację Zdrowia (WHO – *World Health Organization*) obecna definicja pneumonii wywołanej szpitalnym zakażeniem *L. pneumophila* dotyczy zachorowania potwierdzonego laboratoryjnie, którego objawy wystąpiły w czasie 10 dni po rozpoczęciu hospitalizacji pacjenta [5].

#### 5. Materiał kliniczny wykorzystywany do badań

Materiałem klinicznym, z którego mogą być izolowane bakterie *Legionella* jest krew, wycinki tkanki płucnej, wydzieliny układu oddechowego (plwocina, popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe (BAL – *bronchial alveolar lavage*), aspirat tchawiczy, materiał pozyskany przy ssaniu podczas intubacji dotchawiczej, płyn opłucnowy) oraz stolec (tabela 1). Do pozapłucnych miejsc izolacji bakterii należy szpik kostny, sztuczne zastawki serca oraz rany w obrębie mostka. Do wykrycia pałeczek *Legionella* w wątrobie, śledzionie, płynie osierdziowym, uszkodzonych nerkach, ropniach skórnych czy w przeszczepach naczyniowych dochodzi najczęściej w próbkach sekcyjnych zwłok [41, 4].

Próbki przeznaczone do hodowli mikrobiologicznej powinny być pobrane przed rozpoczęciem antybiotykoterapii, chociaż opisano udane próby izolacji pałeczek *Legionella* z niższych partii układu oddechowego oraz z krwi po kilku dniach podawania erytromycyny [4]. U pacjentów z zapaleniem płuc wywołanym przez bakterie *Legionella* początkowo występujący suchy kaszel ma tendencję do przechodzenia w kaszel produktywny z odkrztuszaniem wydzieliny całkowicie pozbawionej ropy lub z niewielką jej ilością. W plwocinie lub aspiracie tchawiczym często wykrywa się małą ilość wielojądrzastych leukocytów lub płaskonabłonkowych komórek podstawnych naskórka. Pominięcie takich próbek przy wykonywaniu hodowli

plytkowych wiąże się z utratą 47-84% materiału stanowiącego przypuszczalne źródło izolacji *L. pneumophila*. Dlatego w przypadku podejrzenia legionellozy zaleca się wykonanie posiewu z wykorzystaniem wszystkich próbek pobranych z dróg oddechowych pacjenta, niezależnie od ilości ropy i liczby leukocytów wielojądrowych [54, 97].

W wydzielinach układu oddechowego mających kontakt z mikroflorą jamy ustnej obecne są różne gatunki bakterii, które przyczyniają się do obniżenia czułości hodowlanej metody izolacji *Legionella* [4]. W celu eliminacji flory mikrobiologicznej przed izolacją bakterii *Legionella* z płwociny lub środowiskowych próbek wody rekomenduje się metodę opartą na traktowaniu materiału przeznaczonego do dalszej diagnostyki podwyższoną temperaturą lub kwasem chlorowodorowym [110]. Ogrzewanie zanieczyszczonej próbki klinicznej przez 1-2 min w temperaturze 60°C może przyczynić się do eliminacji innych bakterii i wzrostu *L. pneumophila*. Z reguły wraz ze wzrostem czasu ogrzewania wzrasta także czystość uzyskanej hodowli bakteryjnej *Legionella*. Ze względu na oporność niektórych gatunków bakterii we florze towarzyszącej *Legionella* na działanie wysokiej temperatury, zaleca się wykonanie dodatkowych technik [32]. Należy do nich metoda polegająca na dodaniu do próbki z materiałem klinicznym lub środowiskowym 0.2M mieszaniny KCl-HCl o pH 2.2 [19].

Tabela 1. Przegląd metod diagnostycznych wykorzystywanych przy wykrywaniu *Legionella* spp. w materiale klinicznym [3, 6, 8, 14]

Metoda	Czułość (%)	Swoistość (%)	Czas trwania testu	Wady	Zalety
Izolacja bakterii z materiału klinicznego oraz ich hodowla			2-4 dni (do nawet 14 dni)	Długi czas oczekiwania na wynik; zmienna czułość metody w zależności od rodzaju próbki	Możliwość wykrycia wszystkich gatunków i serogrup <i>Legionella</i> ; stanowi wsparcie badań epidemiologicznych
Płwocina	5-70	100			
BAL/aspirat tchawiczy	30-90	100			
Wycinek tkanki płucnej	90-99	100			
Krew	10-30	100			
Testy serologiczne			Od 2 godzin do 1 dnia	Wynik pojedynczego miana przeciwciał może być mylący z powodu wystąpienia uprzedniej seroprewalencji; możliwe wystąpienie reaktywności krzyżowej	Test pomocny w przypadku bakterii trudno hodowlanych na podłożach standardowych
Test IFA (próbki surowicy)	40-80	95-100			

Test DFA (próbki krwi, płwociny, wydzieliny i tkanki płucnej)	25-75	95-100	Okolo 2 godziny	Mozliwe trudności w interpretacji wyników z powodu reaktywności krzyżowej; brak standaryzowanych odczynników dla gatunków innych niż <i>L. pneumophila</i>	Niedrogie, komercyjnie dostępne odczynniki do identyfikacji i typowania bakterii
Test aglutynacji	≥ 89	≥ 97	1-2 godziny	Mozliwa reaktywność krzyżowa; niższa czułość detekcji gatunków innych niż <i>L. pneumophila</i>	Niedrogie, komercyjnie dostępne odczynniki do identyfikacji i typowania bakterii
Testy wykrywające antygeny w moczu			3-4 godzin	Mozliwa detekcja <i>L. pneumophila</i> sg1; niższa czułość detekcji innych gatunków i serogrup; zróżnicowane wydalanie antygenów z moczem	Krótki czas oczekiwania na wynik; łatwa dostępność próbek do analizy; możliwość wykrycia obecności antygenów pomimo zakończenia antybiotykoterapii
Test ELISA	70-90	95-100	15-30 min		
Test ICT					
Testy oparte na PCR			4-6 godzin	Czułość i specyficzność testu zależna od rodzaju i sposobu przygotowania próbki do analizy	Mozliwość wykrycia wszystkich gatunków <i>Legionella</i> ; kryterium determinującym przydatność próbki do analizy PCR jest możliwość wyizolowania z niej kwasów nukleinowych
Test PCR (próbki pobrane z dróg oddechowych)	85-92	94-99			
Test PCR (próbki moczu, surowicy)	33-70	95-98			
Inne testy molekularne			Okolo 15 min	Wymaga użycia izolatu bakteryjnego w postaci czystej kultury; czułość metody zależna od analizowanego gatunku	Szybka identyfikacja <i>Legionella</i> spp. w przypadku wyspecjalizowanych placówek diagnostycznych
MALDI-TOF MS	90-99	-			
Amplifikacja izotermiczna	Okolo 100	> 90	Okolo 1 godzina	Sprawność i efektywność testu zależy od przyjętej	Stosunkowo krótki czas oczekiwania na wyniki; niższa

				metodyki jego wykonania	wrażliwość na inhibitory w porównaniu do zwykłego testu PCR
--	--	--	--	-------------------------	---

## 6. System punktowy wykorzystywany przy diagnozowaniu legionellozy

W szpitalu uniwersyteckim w Winthrop w Nowym Jorku w USA został opracowany system punktowej oceny parametrów klinicznych i laboratoryjnych pacjenta, który pozwala na szybką identyfikację zapalenia płuc nabytego w miejscu zamieszkania wywołanego przez pałeczki *Legionella*. Przekroczenie 15 punktów z 41-punktowej skali oznacza wysokie prawdopodobieństwo pneumonii wywołanej infekcją bakteriami *Legionella*. Ocenianymi cechami klinicznymi jest m.in.: temperatura ciała, występowanie bólów głowy, brzucha, klatki piersiowej, dysfunkcje nerek, wrażliwość na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe, a parametrami laboratoryjnymi: RTG klatki piersiowej, poziom jonów sodu i potasu w osoczu, bilirubina całkowita, dehydrogenaza mleczanowa (LDH), kinaza fosfokreatynowa (CPK), białko C-reaktywne (CRP) [26].

Poważnym problemem diagnostycznym jest odróżnienie zapalenia płuc wywołanego przez *L. pneumophila* i *Streptococcus pneumoniae*. Obraz zapalenia płuc wywołanego przez te gatunki bakterii widoczny na RTG klatki piersiowej jest bardzo podobny. W tym przypadku pomocny okazuje się 4-punktowy system różnicujący, w którym ocenia się względną bradykardię, poziom LDH w osoczu wynoszący  $\geq 292$  IU/L, poziom CRP  $\geq 21$  mg/dL oraz poziom sodu  $\leq 137$  meq/L. Wynik równy lub przekraczający 3 wskazuje na infekcję *L. pneumophila* [88].

## 7. Hodowla mikrobiologiczna

Pierwsze próby izolacji bakterii *Legionella* z materiału klinicznego polegały na hodowli tych bakterii w zarodkach kurzych lub w organizmie świnek morskich [71, 4]. Obecnie metoda izolacji *Legionella* z materiału klinicznego poprzez wykonanie posiewu mikrobiologicznego na odpowiednim podłożu stanowi złoty standard diagnostyczny legionellozy [81].

Po raz pierwszy wzrost *L. pneumophila* na sztucznym podłożu uzyskano na pożywce Mueller–Hinton suplementowanej hemoglobina i odczynnikiem IsoVitaleX (podłoże MH-IH). Hemoglobina stanowiła niezbędne źródło rozpuszczalnej formy żelaza, a IsoVitaleX zawierał wymaganą do wzrostu tych patogenów L-cysteinę. W celu ustalenia optymalnego składu podłoża MH-IH, determinującego możliwie szybki wzrost bakterii *Legionella* wyizolowanych z tkanek pacjenta, wprowadzono w nim kilka modyfikacji. IsoVitaleX zastąpiono chlorowodorkiem L-cysteiny, a hemoglobinę rozpuszczalnym pirofosforanem żelaza. W ten sposób otrzymano nowe podłoże Feeley-Gorman (podłoże F-G), które w temperaturze 35°C, przy 2,5% stężeniu CO<sub>2</sub> oraz pH równym 6,9 zapewniało szybsze pojawienie się większej liczby kolonii *Legionella* w porównaniu do podłoża MH-IH [38]. Kolejna modyfikacja podłoża F-G, polegająca na zastąpieniu ekstraktu wołowego i skrobi wyciągiem drożdżowym z dodatkiem węgla aktywowanego (agar YCE – charcoal-yeast extract), pozwoliła na skrócenie czasu pojawienia się makroskopowo widocznych kolonii *L. pneumophila* z czterech do trzech dni. Wyciąg drożdżowy stanowi główne źródło aminokwasów,

a węgiel aktywowany pełni rolę czynnika detoksyfikującego, który pochłania nadmiar CO<sub>2</sub> oraz modyfikuje napięcie powierzchniowe. Dlatego inkubacja bakterii *Legionella* na agarze YCE może przebiegać w warunkach tlenowych, a w przypadku podłoża F-G w powietrzu z 2,5% stężeniem CO<sub>2</sub>. Inkubacji bakterii na obu podłożach nie powinno towarzyszyć zbyt wysokie stężenie CO<sub>2</sub>, ponieważ spadek pH podłoża wpływa hamująco na wzrost *L. pneumophila*. Porównując agar CYE do podłoża F-G, należy zwrócić uwagę na jego wyższą czułość diagnostyczną oraz brak widocznych, przydatnych w diagnostyce cech morfologicznych kolonii *L. pneumophila*. Kolonie *L. pneumophila* rosnące na agarze CYE nie posiadają charakterystycznego kryształowego połysku oraz nie produkują brązowego pigmentu. Dodanie tyrozyny do stężenia obecnego w podłożu F-G koryguje tę wadę [37]. Obecnie rutynowo wykorzystywanym podłożem do izolacji gatunków z rodzaju *Legionella* z materiału klinicznego jest zbuforowany agar z wyciągiem drożdżowym i węglem aktywowanym oraz  $\alpha$ -ketoglutaranem (BCYE- $\alpha$  – *buffered charcoal yeast extract agar with  $\alpha$ -ketoglutarate*) [71]. Na tym podłożu po 72-96 godzinach inkubacji bakterie *Legionella* rosną w postaci okrągłych, gładkich na całej powierzchni kolonii o wypukłym profilu i charakterystycznym kryształowym lub opalizującym wyglądem. Większość szczepów *Legionella* jest oksydazo-zmienna i daje negatywny wynik standardowo wykonywanych testów biochemicznych sprawdzających m.in. zdolność redukcji azotanów, wykorzystywania ureazy i węglowodanów. Pałeczki *Legionella* posiadają także aktywność  $\beta$ -laktamazy oraz zdolność upłynniania żelatyny [103].

W celu uzyskania poprawy wzrostu niektórych gatunków *Legionella* na agarze BCYE zalecany jest dodatek surowiczej albuminy wołowej [41]. Przykładem podłoża wspomagającego wzrost *L. micdadei* i *L. bozemanii* serogrupy 1 i 2 jest podłoże BCYE $\alpha$  z dodatkiem 1% albuminy (ABCYE- $\alpha$ ). Związek ten pozwala ominąć konieczność rozcieńczenia inoculum tkankowego pobranego od pacjenta, które ze względu na posiadane właściwości antybakteryjne może utrudniać wzrost bakterii *Legionella*. Albumina surowicy wołowej dodatkowo wykazuje działanie neutralizujące toksyczny wpływ produktów ubocznych metabolizmu *Legionella* spp. [71]. Selektywne podłoża do izolacji *Legionella* spp. mogą zawierać także indykatory w postaci barwników. Na przykład dodatek fioletu bromokrezolowego i błękitu bromotymolowego do agaru BCYE pozwala na makroskopowe odróżnienie jasnozielonych kolonii *L. pneumophila* od niebieskoszarych kolonii *L. micdadei* (znanej także pod nazwą *Tatlockia micdadei*) [101]. Ponadto w celu ograniczenia wzrostu towarzyszącej flory bakteryjnej i grzybowej w próbkach pochodzenia klinicznego lub środowiskowego, stosuje się agar BCYE- $\alpha$  z dodatkiem pojedynczego antybiotyku lub ich mieszaniny. Obecność polimyksyny w podłożu ogranicza wzrost bakterii Gram-ujemnych, anizomycyna hamuje wzrost drożdży, a cefamandol lub wankomycyna bakterii Gram-dodatnich [65].

Czułość metody hodowlanej mieści się w granicach od 50% do 80% i wzrasta u pacjentów hospitalizowanych z przewlekłą postacią legionellozy w porównaniu do pacjentów z zapaleniem płuc nabytym w miejscu zamieszkania. Wynika to z faktu większej liczby pałeczek *Legionella* obecnych w próbkach z dróg oddechowych. W przypadku próbek pobranych od pacjenta w czasie pierwszych dwóch dni od przyjęcia do szpitala prawdopodobieństwo izolacji wzrasta do 80%. Czas oczekiwania

na dodatni wynik posiewu na podłożu BCYE sięgający 3-5 dni jest podstawową wadą tej metody [81]. Okres ten wydłuża się, gdy pacjent jest w trakcie antybiotykoterapii lub gdy w wysianym materiale obecne są inne drobnoustroje [4]. Techniki służące oczyszczeniu materiału klinicznego, etapy wirowania lub filtracji przed wykonaniem posiewu, a także obecność innych mikroorganizmów mogących wpływać na wzrost *Legionella* przyczynia się do obniżenia czułości metody [24]. Poza tym szacuje się, iż próbki pochodzące od ponad 50% pacjentów z chorobą legionistów nie są odpowiednim materiałem klinicznym do prowadzenia hodowli mikrobiologicznej [63].

### 7.1. Współhodowla bakterii *Legionella* z amebami

Podstawową metodą izolacji *Legionella* spp. z materiału klinicznego jest posiew na agarze BCYE z dodatkiem  $\alpha$ -ketoglutaranu i L-cysteiny. Jednak w przypadku niektórych gatunków *Legionella* wynik izolacji pałeczek metodą posiewu może być negatywny, pomimo obecności patogenów w analizowanym materiale. Rozwiązaniem tego problemu jest metoda polegająca na hodowli naturalnych gospodarzy pałeczek *Legionella* – wolnożyjących jednokomórkowych ameb, do której wprowadza się materiał kliniczny potencjalnie mogący zawierać bakterie *Legionella*. Dla przykładu opisano przypadek izolacji *L. anisa* z próbki płwociny pacjenta po jej inokulacji z hodowlą *Acanthamoeba polyphaga* [90,30]. Współhodowla ameb z bakteriami obecnymi w analizowanym materiale klinicznym z układu oddechowego pacjenta poprawia wskaźnik izolacji *Legionella*, zwłaszcza w przypadku próbki zanieczyszczonej florą ustno-gardłową. Przyczyną tej poprawy jest prawdopodobnie trawienie przez amebę towarzyszącej flory ograniczającej wzrost *Legionella* [28]. Kokultury mogą być prowadzone w formie płynnej hodowli ameb (LAC – *liquid-based amoebic coculture*) lub płytkowego testu amebowego (APT – *amoeba plate test*) [27].

### 8. Wykrywanie antygeny *Legionella* w moczu

Pierwszym testem wykrywającym obecność antygeny *Legionella* w moczu (LUAT – *Legionella urinary antigen test*) był poliklonalny test immunoenzymosorpcyjny (ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*) [95]. Obecnie testy do wykrywania antygeny *Legionella* w moczu są dostępne głównie w dwóch formach: testu EIA w postaci 96-dołkowej płytki lub testu ELISA oraz szybkiego testu immunochromatograficznego (ICT – *immunochromatographic test*) w kształcie pasków lub kart diagnostycznych [69].

Wykrywanym antygenem jest bakteryjny termostabilny [77] lipopolisacharyd (LPS), którego zróżnicowanie strukturalne i antygenowość są podstawą przy identyfikacji serogrup *L. pneumophila*. Panel Dresden *Legionella* LPS mAb jest przykładem testu umożliwiającego wykrycie zróżnicowania antygenowego LPS-u. Na podstawie reakcji przeciwciał monoklonalnych mAb3/1 z epitopami zlokalizowanymi na cząsteczce LPS-u serogrupa 1 (sg1) *L. pneumophila* została podzielona na 9 podgrup przyporządkowanych do dwóch grup głównych szczepów: szczepu mAb3/1-pozytywnego lub Pontiac (Philadelphia, Knoxville, Benidorm, France/Allentown) oraz szczepu mAb3/1-negatywnego lub non-Pontiac (Bellingham, Oxford, OLDA, Heysham, Camperdown) [83, 50].



Obecność antygeny *L. pneumophila* w moczu wykrywa się już w pierwszych 2-3 dniach po wystąpieniu objawów klinicznych, a okres ich wydalania z moczem sięga od kilku dni do 10 miesięcy (według niektórych źródeł do 12 miesięcy) [3], nawet pomimo trwania antybiotykoterapii. Zazwyczaj antygen wykrywany jest przez 1 do 2 miesięcy po zakończeniu terapii [69]. Jednak tak długi czas utrzymywania się antygeny w moczu wpływa na obniżenie specyficzności testów [2]. Istnieje także możliwość przeniknięcia antygeny *L. pneumophila* z przesączu kłębuszkowego nerek do surowicy, gdyż antygen ze względu na masę cząsteczkową lub ładunek elektryczny może nie przedostawać się przez ściany sieci naczyń włosowatych kłębuszka nerkowego trafiając bezpośrednio do surowicy, która staje się wtedy odpowiednim źródłem materiału diagnostycznego do badań [9].

Zaletą testów LUAT jest krótki czas oczekiwania na wynik, bardzo wysoka specyficzność sięgająca 100% i stosunkowo wysoka czułość [40]. W przypadkach legionellozy wywołanej infekcją szczepami mAb3/1-pozytywnymi czułość wynosi około 96%, a dla szczepów mAb3/1-negatywnych sgl1 poniżej 71%. Z kolei szczepy mAb3/1-negatywne nienależące do sgl1 są wykrywane z najmniejszą częstością. Dlatego częste wykorzystywanie testów LUAT jako pierwszej metody z wyboru może być przyczyną błędnego oszacowania częstości wywoływania legionellozy przez szczepy mAb3/1-negatywne [49]. Testy LUAT są rekomendowane dla pacjentów hospitalizowanych z pneumonią nabytą w miejscu zamieszkania. Detekcja antygeny w moczu jest możliwa do czasu, gdy pacjent oddaje duże ilości moczu, a przechowywanie próbek nie wymaga użycia inwazyjnych metod [1]. Pozytywny wynik testu LUAT pozwala uniknąć wyboru antybiotykoterapii skierowanej przeciwko patogenom innym niż *Legionella*, co wiąże się z ograniczeniem skutków ubocznych niewłaściwego doboru antybiotyku, zmniejszeniem ryzyka narastania antybiotykooporności, a także zmniejszeniem kosztów leczenia [45]. Detekcja antygeny *L. pneumophila* w moczu jest najbardziej efektywna u pacjentów z przewlekłą postacią legionellozy. Test LUAT może dać fałszywie negatywny wynik u pacjentów z łagodną formą legionellozy, stąd konieczność przeprowadzania dodatkowych testów weryfikujących poprawność uzyskanego wyniku [12].

### 8.1. Test immunoenzymatyczny ELISA wykrywający antygeny w moczu

Pierwszy opracowany poliklonalny test ELISA służył detekcji antygeny *L. pneumophila* sgl1 w moczu. Test ten polega na swoistym związaniu antygeny obecnego w moczu z przeciwciałami zimmobilizowanymi na płycie mikrotitracyjnej uzyskanymi z hiperimmunizowanej surowicy zwierzęcej. Następnie w celu detekcji koniugatów wykorzystuje się przeciwciała monoklonalne sprzężone z izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC – *fluorescein isothiocyanate*), a wynik odczytuje się metodą spektrofotometryczną. Wykorzystanie w teście przeciwciał monoklonalnych pozwala uniknąć problemu reprodukcyjności przeciwciał poliklonalnych oraz niespecyficznego wiązania z antygenami o podobnej strukturze [10]. Czynnikiem komplikującym wykorzystanie przeciwciał monoklonalnych jest możliwość jednoczesnego reagowania antygeny wydalanej z moczem pacjenta z wieloma przeciwciałami monoklonalnymi. Do sytuacji tej dochodzi, gdy pacjent zakażony jest więcej niż jedną podgrupą

*L. pneumophila* sg1 lub gdy na cząsteczce antygeny *L. pneumophila* sg1 znajdują się epitopy mogące reagować z różnymi przeciwciałami monoklonalnymi [60].

Opracowano testy ELISA o szerokim zakresie wykorzystywanych przeciwciał, zdolne do jednoczesnej detekcji wielu antygenów wydalanych z moczem. Ich czułość wynosi maksymalnie 70%, a specyficzność 99%. Zastosowanie ich w praktyce wiąże się z trudnościami np. niezdolnością do precyzyjnej identyfikacji antygeny obecnego w moczu, brakiem skuteczności w przypadku niskiego poziomu antygeny w moczu oraz nieefektywnym wykrywaniu antygeny przez przeciwciała IgG anty-*Legionella* zastosowane w danym teście ELISA [98,99]. Jednym z ostatnio opracowanych LUAT jest pośredni „kanapkowy” test ELISA oparty na wykrywaniu lipoproteiny związanej z peptydoglikanem (PAL – *peptidoglycan – associated lipoprotein*), dotychczas przetestowany na szczurach zainfekowanych dotchawiczo *L. pneumophila* [46]. Obecny w moczu PAL jest wysoce konserwatywnym immunodominującym antygenem zewnątrz-błonowym o masie 19 kDa, powszechnie występującym wśród gatunków *Legionella*. Test ten wykazuje lepszą czułość w porównaniu do komercyjnych testów immunoenzymatycznych, szczególnie w wykrywaniu *L. pneumophila* innych niż sg1, a także innych gatunków *Legionella*. PAL może służyć jako alternatywny antygen przy opracowywaniu nowych testów diagnostycznych [58].

## 8.2. Test immunochromatograficzny wykrywający antygeny w moczu

W latach 2009-2010 na obszarze Europy 80% przypadków zachorowania na legionellozę zostało wstępnie zdiagnozowane przy użyciu testów wykrywających obecność antygeny *Legionella* w moczu [8]. Kolorymetryczny test ICT (np. BinaxNOW® *Legionella*) służy szybkiej jakościowej detekcji antygeny *L. pneumophila* sg 1 w moczu. Test opiera się na wykorzystaniu przeciwciał anty-*L. pneumophila* sg 1 pochodzenia króliczego jako elementu wychwytyjącego specyficzne antygeny obecne w moczu pacjenta oraz przeciwciał przeciwko specyficznym antygenom bakterii *L. pneumophila* sg 1 sprzężonych z cząsteczkami koloidalnego złota. Wynik uzyskuje się w czasie 15 min [105]. W porównaniu do testów immunoenzymatycznych testy ICT wykazują niższą czułość [85]. W celu poprawy czułości niektórych testów ICT dostępnych komercyjnie zaleca się przedłużenie czasu inkubacji [18], wykonywanie dodatkowych odczytów testu przez 4 godziny od czasu jego rozpoczęcia [51] lub zagęszczenie próbki moczu poprzez ultrafiltrację, co poprawia wykrywalność antygeny *Legionella* zwłaszcza u pacjentów z legionellozą o łagodnym przebiegu [109]. Termostabilność wykrywanego, rozpuszczalnego w moczu antygeny *Legionella* pozwala na podgrzanie próbki moczu w celu ograniczenia rozwoju flory towarzyszącej, zwłaszcza w przypadku długotrwałego transportu próbki do laboratorium [96].

Innym przykładem testu ICT jest test oparty na bocznej chromatografii przepływowej połączonej z analizatorem automatycznie odczytującym wynik w postaci sygnału autofluorescencyjnego (Sofia *Legionella* FIA – *fluorescent immunoassay*). Zastąpienie detekcji kolorymetrycznej metodą fluorescencyjną poprawia czułość testu [8]. Nowym rozwiązaniem, które pozwala na odróżnienie pneumokokowego zapalenia płuc od choroby legionistów jest test ICT służący do jakościowej jednoczesnej detekcji antygeny *S. pneumoniae* oraz *L. pneumophila* w moczu (ImmuView® *S. pneumoniae*

and *L. pneumophila*). Test ten umożliwia postawienie szybkiej diagnozy, co jest kluczowym czynnikiem pozwalającym na wdrożenie odpowiedniej antybiotykoterapii [56].

## 9. Wykrywanie antygenów w tkankach

Mikroskopowe badanie próbek z wykorzystaniem barwienia techniką bezpośredniej fluorescencji przeciwciał (DFA – *direct fluorescent antibody*) po raz pierwszy przeprowadzono w celu wykrycia pałeczek *Legionella* w tkance płucnej z materiału autopsyjnego i biopsyjnego oraz wydzielin układu oddechowego [41]. Zasada działania metody DFA polega na sprzężeniu przeciwciał skierowanych bezpośrednio przeciwko antygenom *Legionella* z FITC. Następnie analizowana próbka utrwalona na szkiełku mikroskopowym poddawana jest inkubacji z wcześniej przygotowanym koniugatem. Wybór optymalnej proporcji między fluorochromem a znakowanym przeciwciałem determinuje poprawne kontrolowanie warunków reakcji znakowania oraz gwarancję otrzymania jej jak najwyższej specyficzności. Po związaniu antygenów obecnych w próbce ze znakowanymi przeciwciałami wynik odczytywany jest przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego [22, 52]. Kryteria interpretowania wyników DFA są identyczne, jak te przyjęte dla testu immunofluorescencji pośredniej (IFA – *indirect immunofluorescence assays*). Ocenia się morfologię, intensywność fluorescencji oraz liczbę bakterii, niezależnie od tego, czy wynik jest pozytywny, czy negatywny [17].

Obecnie do testów wykrywających antygen *L. pneumophila* na rynku dostępne są zarówno przeciwciała monoklonalne, jak i poliklonalne. Przeciwciała poliklonalne wykazują mniejszą swoistość w porównaniu z monoklonalnymi, zdolnymi do reagowania ze wszystkimi grupami serologicznymi *L. pneumophila* [31,64]. Odczynniki do techniki DFA oparte na przeciwciałach monoklonalnych wykazują wyższą czułość i specyficzność niż te zawierające przeciwciała poliklonalne, problematyczne także pod względem występowania reaktywności krzyżowej mogącej być przyczyną fałszywie dodatnich wyników [100]. Wystąpienie reakcji krzyżowych z antygenem *L. pneumophila* sgl stwierdzono m.in. w surowicach zawierających przeciwciała skierowane przeciwko *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter* spp., *Rickettsia* spp., *Coxiella burneti*, *Bacteroides* spp., *Haemophilus* spp. oraz *Citrobacter freundii* [16].

Barwienie metodą DFA jest technicznie trudne, a odczytanie wyników wymaga dużych umiejętności. Specyficzność DFA wynosi około 94%, a czas oczekiwania na wynik to 4 godziny [72]. Czułość barwienia DFA próbki pobranej po płukaniu oskrzelowo-pęcherzykowym wynosi zaledwie 33%, a w przypadku wycinków tkanki płucnej zatopionych w parafinie czułość wzrasta do 44% [56]. Czułość metody hodowlanej znacznie przewyższa tą uzyskaną za pomocą DFA [56]. Pozytywny wynik DFA bez potwierdzenia za pomocą innych testów nie jest wystarczający do postawienia jednoznacznej diagnozy w kierunku legionellozy [92].

## 10. Oznaczanie poziomu swoistych przeciwciał

Do testów serologicznych opracowanych w celu detekcji przeciwciał anty-*Legionella* spp. należy test IFA, test mikroaglutnacji i aglutynacji lateksowej, test pośredniej hemaglutynacji oraz test przeciwprądowej elektroforezy (CIE – *counter immunoelectrophoresis*) [41]. Opisany wcześniej test ELISA oprócz wykrywania antygenów w moczu, służy także do wykrywania swoistych przeciwciał *L. pneumophila* sgl w surowicy, także w próbkach sekcyjnych [33]. Na płycie mikrotitracyjnej

zimmobilizowane są antygeny lub całe komórki bakteryjne. Wykorzystując do tego celu zinaktywowane temperaturą bakterie, muszą one ulec co najmniej częściowej denaturacji, co ze względu na zmianę determinant antygenowych może wpłynąć na zdolność wiązania się antygenów z przeciwciałami. Z kolei testy wykorzystujące żywe komórki bakteryjne mogą przeprowadzać wyłącznie laboratoria z klasą BSL-2 lub 3 [39]. Do testu ELISA zazwyczaj pozyskuje się pojedynczą próbkę surowicy pobraną od pacjenta z przewlekłą postacią legionellozy, jednak w celu rozpoznania serokonwersji zalecane jest pobranie dwóch próbek surowicy z co najmniej 10-, 14-dniowym odstępem czasowym [85].

Test IFA był pierwszym testem wykorzystanym do detekcji przeciwciał skierowanych przeciwko *L. pneumophila* [29]. Za pomocą tej techniki można oznaczyć poziom przeciwciał IgM, IgG oraz IgA w surowicy. Należy zaznaczyć, że większość technik serologicznych, z wyjątkiem wykrywania IgA przez IFA, wykazuje wyższą czułość w porównaniu z detekcją antygenów [84]. Test IFA wykonuje się dla próbek wydzieliny pobranej z dróg oddechowych, płuc oraz płynu opłucnowego. U około 75% pacjentów z infekcją wywołaną przez *L. pneumophila* sg1 potwierdzoną poprzez wykonanie posiewu w ciągu pierwszych 1-9 tygodni trwania legionellozy wykrywa się czterokrotny wzrost miana przeciwciał w surowicy [4].

Przeprowadzenie testu IFA opiera się na inkubacji analizowanej próbki z hiperimmunizowaną surowicą oraz wizualizacji powstałego koniugatu poprzez zastosowanie fluorescencyjnego znakowania związkami FITC przeciwciała anty – *Legionella*. Technika wymaga zastosowania kontroli pozytywnej (ludzkiej surowicy referencyjnej) oraz negatywnej (ludzkiej surowicy zdrowej osoby) [86]. Antygen *L. pneumophila* sg1 wykorzystywany do testu IFA pierwotnie opracowanego przez Centrum Kontroli i Zapobiegania Chorób w Atlancie (CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*) otrzymywano z bakterii namnażanych w zainfekowanych pęcherzykach żółtkowych kurzych jaj [107].

Walidacja zinaktywowanego temperaturą antygenu *L. pneumophila* sg1 z surowicami skutkowałą ustaleniem czułości testu na poziomie 78-91%, a specyficzności 99% [41]. Diagnostyka serologiczna infekcji *Legionella* została poddana całkowitej standaryzacji tylko dla *L. pneumophila* sg1 [36].

Opracowano także techniki IFA dla kilku serotypów np. IgG-specyficzny test IFA dla *L. pneumophila* sg1-6. Jednak w ogólnej ocenie tego typu testy nie powinny być podstawą do postawienia ostatecznej diagnozy infekcji wywołanej przez *Legionella*. Przy wykonywaniu testów przesiewowych wykrywających wiele serotypów należy analizować próbki w co najmniej dwóch powtórzeniach, gdyż w przypadku analizy pojedynczej próbki istnieje możliwość uzyskania fałszywie zawyżonego wyniku miana przeciwciał spowodowanego dużą ilością przeciwciał obecnych w tle próbki pobranej od pacjenta [66].

Komercyjnie produkowane przeciwciała monoklonalne (mAb) znakowane FITC skierowane przeciwko białku błony zewnętrznej *L. pneumophila* są rekomendowane dla testów IFA ze względu na wyższą specyficzność w porównaniu z przeciwciałami poliklonalnymi. Zaletą zastosowania przeciwciał monoklonalnych w testach jest możliwość wykrywania wszystkich serogrup *L. pneumophila* [64].

## 11. Wykrywanie bakteryjnego DNA metodą PCR

Diagnostyka molekularna legionellozy oparta na technice PCR oraz różnych jej modyfikacjach jest użytecznym narzędziem diagnostycznym umożliwiającym szybkie wykrywanie infekcji spowodowanych różnymi gatunkami i serogrupami *Legionella* z wysoką czułością i specyficznością przekraczającą 90%. Laboratoria diagnostyczne coraz częściej wykorzystują technikę PCR do rutynowego wykrywania bakterii *Legionella* [104].

Celem testów PCR jest wykrywanie obecności różnych części genomu *Legionella* służących jako molekularne markery np. 5S rRNA, 16S rRNA, wewnątrzgenowy rejon 23S-5S rRNA, gen kodujący czynnik wzmacniający infekcyjność makrofagów (*mip* – *macrophage infectivity potentiator*), gen kodujący  $\beta$  podjednostkę bakteryjnej polimerazy RNA – *rpoB* i podjednostkę B gyrazy – *gyrB*. Gen *mip* początkowo służył jako specyficzny marker *L. pneumophila*, do czasu potwierdzenia jego obecności w genomach innych gatunków *Legionella* [20]. W diagnostyce pałeczek *Legionella* wykorzystywane są także geny *pcs* – kodujące syntazę fosfatydylocholiny oraz *pmtA* – kodujące metylotransferazę zaangażowane w syntezę fosfatydylocholiny, ważnego dla patogenności składnika osłon bakteryjnych [55]. Doboru genów wykorzystywanych jako molekularne markery w testach PCR dokonuje się poprzez multigenomowe analizy sekwencji genomów *Legionella* spp. w porównawczej hybrydyzacji geno-mowej (CGH – comparative genomic hybridization) [59].

Materiałem klinicznym wykorzystywanym do analizy metodą PCR należą: BAL, wymazy gardłowe i nosowo-gardłowe, jednojądrzaste komórki z krwi obwodowej, mocz i surowica [13]. Większość próbek pobranych z dróg oddechowych jest użyteczna do testów PCR. Analiza PCR próbek pobranych w początkowym stadium rozwoju infekcji *Legionella* z niższych części dróg oddechowych wykazuje wyższą czułość w porównaniu do metody hodowlanej. Poza tym skuteczność PCR w diagnozowaniu łagodnych przypadków legionellozy również przewyższa metodę hodowlaną [79, 15].

## 12. Multipleksowe testy PCR

Wdrażanie nowych testów PCR w czasie rzeczywistym (rt-PCR – *real-time PCR*) służy tworzeniu nowych algorytmów diagnostycznych usprawniających identyfikację legionellozy wywołanej przez *L. pneumophila*, a także gatunki, które są rzadziej izolowane od pacjentów [25]. Oprócz krótkiego czasu oczekiwania na wynik (około 4 godz.) rt-PCR pozwala także na bezpośrednią ocenę ilościową *Legionella*. Przykładem testu rt-PCR jest multipleksowy test pozwalający na jednoczesną detekcję i różnicowanie *Legionella* spp., *L. pneumophila* oraz *L. pneumophila* sg1 przy wykorzystaniu zestawów starterów do amplifikacji genów *ssrA*, *mip* oraz *wzm* [6]. Inne multipleksowe testy rt-PCR umożliwiają różnicowanie gatunków *Legionella*, *L. pneumophila* oraz *L. pneumophila* sg1 wykorzystując geny *groES*, *cpX*, *rfaA* [59]. Ostatnio opracowaną modyfikacją testu rt-PCR jest test multipleksowy służący do jednoczesnej detekcji kilku gatunków *Legionella* innych niż gatunek *L. pneumophila* (*L. anisa*, *L. bozemanii*, *L. longbeachae*, *L. micdadei*). Test ten poprzez amplifikowanie pojedynczego wewnątrzgenowego rejonu 23S-5S minimalizuje liczbę wykorzystywanych sond oligonukleotydowych w mieszaninie reakcyjnej, redukując

tym samym ryzyko wystąpienia reakcji krzyżowych [25]. Multipleksowe testy rt-PCR umożliwiają jednoczesną detekcję np. dziewięciu gatunków (*L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. longbeachae*, *L. feeleii*, *L. anisa*, *L. paristensis*, *L. tucsonensis* sg 1 i 3 oraz *L. sainthelensis* sg 1 i 2). Opcjonalnie w celu rozróżnienia możliwych polimorfizmów nukleotydowych występujących wewnątrz specyficznie amplifikowanych fragmentów kwasu nukleinowego wykonuje się rt-PCR z analizą profilu topnienia w wysokiej rozdzielczości (HRM – *high-resolution melt*) [7]. Liczba próbek klinicznych wykorzystywanych do testowania nowo opracowanych technik multipleksowego rt-PCR jest stosunkowo niewielka. Dlatego konieczne jest poddanie tych testów rygorystycznym analizom z wykorzystaniem paneli klinicznych z obszernym zakresem badanych próbek [59].

### 12.1. Ilościowe testy PCR

Testy oparte na wykorzystaniu reakcji PCR wykrywające gatunki *Legionella* wykonuje się także w formie PCR ilościowego (qrt-PCR), który wykazuje słabszą czułość niż testy LUAT, jednak umożliwia wykrycie bakterii *Legionella* w przypadkach, gdy wynik LUAT był negatywny. Dlatego zaleca się połączenia tych dwóch technik w praktyce diagnostycznej. Poza tym qrt-PCR okazuje się być przydatny w identyfikacji żywych, niehodowlanych form bakterii (VBNC – *viable but not culturable*), które mogą występować w próbkach pobranych z dolnych dróg oddechowych i stanowić przyczynę negatywnych wyników posiewów na podłożach. Duża ilość DNA *L. pneumophila* wykrywana w tego typu próbkach za pomocą qrt-PCR może odzwierciedlać stopień zakażenia, gdyż stwierdzono korelację pomiędzy wzrastającą ilością wykrywanego DNA bakteryjnego w próbkach a wyższym stopniem zaawansowania choroby [68, 76]. Podstawową wadą ilościowego PCR jest brak możliwości odróżnienia DNA żywych i martwych komórek bakteryjnych. Test qPCR (v-qPCR – *viability qPCR*) pozwala na selektywną detekcję i amplifikację DNA wyłącznie żywych bakterii. Zasada działania tego testu polega na zastosowaniu fotoaktywnego barwnika (np. PMA – monoazan propidyny), który selektywnie wnika do komórek z uszkodzoną błoną, następnie pod wpływem światła widzialnego dochodzi do fotoaktywacji i kowalencyjnego związania barwnika z DNA, czego konsekwencją jest zahamowanie amplifikacji DNA w martwych komórkach [61]. Jednak w przypadku wysokiej zawartości martwych komórek w próbce lub nierównomiernej ekspozycji na światło może dochodzić do nieefektywnego blokowania amplifikacji DNA martwych bakterii. Poza tym grupa azydkowa PMA ulega konwersji do wysoce reaktywnego rodnika nitrowego, który z kolei oprócz reagowania z DNA, może reagować także z substancjami organicznymi, nieorganicznymi oraz wodą. Stąd konieczność optymalizacji warunków przeprowadzania techniki v-qPCR [89].

Techniką wyróżniającą się podobną zasadą działania do reakcji PCR jest izotermiczna amplifikacja materiału genetycznego (LAMP – *loop-mediated isothermal amplification*). LAMP w porównaniu do PCR nie wymaga specjalistycznego wyposażenia, jest mniej czasochłonna i generuje mniejsze koszty ze względu na ominięcie etapu ekstrakcji DNA oraz braku konieczności wykorzystania termocyklera. Poza tym technika LAMP jest mniej podatna na wpływ czynników hamujących typowych dla reakcji PCR [82].

## 12.2. Mikromacierze DNA oparte na PCR

Alternatywą dla tradycyjnej procedury serotypowania obarczonej częstymi błędami związanymi z reaktywnością krzyżową jest test PCR oparty na oligonukleotydowej mikromacierzy. Do zalet tej metody należy wysoka przepustowość w zakresie badanych próbek oraz zdolność detekcji szczepów O-szorstkich, pojawiających się w konsekwencji mutacji w obrębie grup genów kodujących O-antygeny. Przykładem jest test opierający się na polimorfizmie w obrębie sekwencji rejonu 16S-23S umożliwiający jednoczesną identyfikację 11 patogennych gatunków *Legionella*. Technika ta wyróżnia się wysoką czułością umożliwiającą detekcję 1.0 ng genomowego DNA, wyizolowanego z komórek patogenów [20]. Opracowano także test wykrywający 15 odrębnych serogrup *L. pneumophila* w oparciu o zmienność form O-antygeny (O1 do O15). Mikromacierze DNA oparte na technice PCR są przydatne szczególnie w porównawczej detekcji i identyfikacji patogenów analizowanych w badaniach epidemiologicznych na szeroką skalę [21]. Wyniki otrzymane tą metodą powinny być zweryfikowane poprzez przeprowadzenie np. typowania z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych lub techniki bezpośredniego sekwencjonowania (SBT – *sequence-based typing*). Te dwie techniki wykorzystuje się w standardowej procedurze epidemiologicznego typowania, w której po typowaniu za pomocą przeciwciał monoklonalnych nieodróżnialne izolaty *L. pneumophila* poddaje się SBT [80], sekwencjonując siedem genomowych loci, dla których istnieje oficjalna baza danych sekwencji zatwierdzona przez Europejską Grupę Pracującą nad Zakażeniami *Legionella* (EWGLI – *European Working Group Legionella Infection*) [47]. Do starszych technik genotypowania *L. pneumophila*, które w większości nie uległy standaryzacji, należy elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym (PFGE – *pulsed-field gel electrophoresis*) oraz polimorfizm długości powielonych fragmentów DNA (AFLP – *amplified fragment length polymorphism*) umożliwiający różnicowanie oraz ustalanie klonalnych powiązań pomiędzy klinicznymi i środowiskowymi szczepami *L. pneumophila* [62, 42].

## 13. Pozostałe metody identyfikacji *Legionella*

Obiecującym narzędziem diagnostyki mikrobiologicznej szczepów klinicznych oraz środowiskowych jest desorpcja/ionizacja laserem wspomagana matrycą z pomiarem czasu przelotu jonów sprzężona ze spektrometrią masową (MALDI-TOF MS – *matrix-assisted laser desorption ionization time-offlight mass spectrometry*). Wiele doniesień naukowych potwierdza wysoką skuteczność techniki MALDI-TOF w identyfikacji ludzkich patogenów izolowanych z próbek materiału klinicznego [87]. Technika MALDI-TOF okazała się być skuteczna przy detekcji bakterii obecnych we krwi, płynie mózgowo-rdzeniowym, kale, a także przy wykrywaniu infekcji dróg moczowych i oddechowych. Wiele analiz potwierdza przewagę MALDI-TOF nad konwencjonalnymi metodami diagnostycznymi pod kątem szybkości i precyzyjności wykrywania zwłaszcza infekcji w obrębie układu krążenia [93]. Identyfikacja gatunków *Legionella* przy wykorzystaniu MALDI-TOF MS jest szybką, łatwą w wykonaniu techniką i mniej kosztowną niż technika SBT. Zaletą tej techniki jest niewielka ilość wymaganego do analizy materiału pobranego z biomasy bakteryjnej co najmniej jednej

kolonii. Za pomocą MALDI-TOF MS identyfikuje się zarówno białka, jak i lipidy bakterii *Legionella* [44, 75].

W diagnostyce pałeczek *Legionella* wykorzystuje się cytometrię przepływową (FC – *flow cytometry*), która pozwala na detekcję *L. pneumophila* w próbkach z układu oddechowego. Technika ta pozwala na ocenę wrażliwości bakterii na działanie antybiotyków pierwszego wyboru, które indukują pojawienie się zwiększonej zawartości nieprawidłowego DNA wykrywanego w specjalnych detektorach. FC ułatwia wybór efektywnej celowanej antybiotykoterapii, co jest niezwykle istotne zwłaszcza w przypadku pacjentów z atypową postacią pneumonii [35].

Nowoczesną wysokoprępastową techniką jest sekwencjonowanie nowej generacji (NGS – *Next Generation Sequencing*) umożliwiające detekcję bakterii *Legionella* na poziomie gatunku i serogrupy na podstawie DNA wyizolowanego z płwociny pacjenta, bez konieczności wykonywania potwierdzających technik hodowlanych. NGS wykorzystując amplikony genu 16S rRNA pozwala na dokładną analizę profilu gatunkowego obecnego w próbce pod kątem różnorodności i stosunku liczebności wykrytych rodzajów bakterii, co jest niezwykle istotne przy szybkiej diagnozie koinfekcji wielogatunkowych [70].

#### 14. Podsumowanie

Obecnie stosowane metody diagnostyczne zakażeń *Legionella* opierają się głównie na hodowli drobnoustrojów, testach wykrywających obecność antygeny *Legionella* w moczu lub tkankach, testach serologicznych stwierdzających poziom swoistych przeciwciał w surowicy oraz na technikach biologii molekularnej.

Metodą uważaną za złoty standard w badaniach mikrobiologicznych, ze względu na niemal 100% swoistość, jest izolacja i hodowla pałeczek *Legionella* na odpowiednich podłożach. Istotnym ograniczeniem tej metody jest dobór odpowiedniego rodzaju badanego materiału wykorzystanego do posiewu oraz długi okres oczekiwania na wzrost bakterii, co znacznie opóźnia czas postawienia diagnozy. Testy opierające się na detekcji antygeny *Legionella* w moczu lub w tkankach wykazują znacznie wyższą czułość w porównaniu do hodowli bakterii na podłożu BCYE. Poza tym badania te są szybkie, tanie i umożliwiają wykrycie infekcji *Legionella* we wczesnym stadium rozwoju choroby. Istotną wadą metod wykrywających antygen *Legionella* jest ryzyko wystąpienia nieswoistych reakcji krzyżowych z przeciwciałami przeciwko innym bakteriom. Inną stosowaną obecnie metodą o stosunkowo wysokiej specyficzności i czułości jest oznaczanie miana swoistych przeciwciał w surowicy za pomocą odczynu immunoenzymatycznego. Do najważniejszych ograniczeń tej metody należy czas niezbędny do rozwinięcia odpowiedzi humoralnej chorego do poziomu mierzalnego przy pomocy testów serologicznych. Obecnie do wykrywania obecności *Legionella* w materiale klinicznym wykorzystuje się także testy PCR amplifikujące konkretne fragmenty genomowego DNA patogena przy użyciu starterów specyficznych dla wykrywanego genu. Jednak brak dobrej standaryzacji i stosunkowo wysokie koszty specjalistycznej aparatury utrudniają rutynowe wykorzystanie tych testów w diagnostyce.

Ze względu na niespecyficzne objawy, zapalenie płuc wywołane przez pałeczki *Legionella* jest często nierozpoznawalną klinicznie jednostką chorobową, która może



przybierać formę epidemiczną lub sporadyczną. Dlatego kluczowym zadaniem jest udoskonalanie metod diagnostycznych pod kątem wysokiej czułości i specyficzności, pozwalających na szybką i wiarygodną detekcję gatunków *Legionella* oraz odróżnianie zakażeń *L. pneumophila* od innych gatunków. Diagnostyka legionellozy wymaga także walidacji i weryfikacji na poziomie międzynarodowym, by umożliwić opracowywanie referencyjnych paneli odczynników do tego typu testów. Istnieje także potrzeba wnikliwego analizowania czynników wirulencji pałeczek *Legionella* z wykorzystaniem analiz molekularnych i genetycznych, gdyż stanowią one podstawę opracowania nowoczesnych i precyzyjnych testów diagnostycznych.

## Literatura

1. Athlin S., Iversen A., Özenci V., *Comparison of the Immu View and the Binax NOW antigen tests in detection of Streptococcus pneumoniae and Legionella pneumophila in urine*, European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 36, 2017, s. 1933-1938.
2. Avni T., Bieber A., Green H., Steinmetz T., Leibovici L., Paul M., *Diagnostic accuracy of PCR alone and compared to urinary antigen testing for detection of Legionella spp.: a systematic review*, Journal of Clinical Microbiology, 2, 2016, s. 401-411.
3. Barigou M., Cavalie L., Daviller B., Dubois D., Manton B., Delobel P., Debard A., Prere M-F., Marchou B., Martin-Blondela G., *Isolation on chocolate agar culture of Legionella pneumophila isolates from subcutaneous abscesses in an immunocompromised patient*, Journal of Clinical Microbiology, 11, 2015, s. 3683-3685.
4. Bartram J., Chartier Y., Lee J.V., Pond K., Surman-Lee S., *Legionella and the prevention of legionellosis*, World Health Organization, 2007, ISBN 92 4 156297 8.
5. Benin A.L., Benson R.F., Besser R.E., *Trends in Legionnaires disease, 1980-1998: declining mortality and new patterns of diagnosis*, Clinical Infectious Diseases, 35, 2002, s. 1039-1046.
6. Benitez A.J., Winchel J.M., *Clinical application of a multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of Legionella species, Legionella pneumophila, and Legionella pneumophila serogroup 1*, Journal of Clinical Microbiology, 1, 2013, s. 348-351.
7. Benitez A.J., Winchell J.M., *Rapid detection and typing of pathogenic nonpneumophila Legionella spp. isolates using a multiplex real-time PCR assay*, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 84, 2016, s. 298-303.
8. Beraud L., Gervasoni K., Freydiere A., Descours G., Ranc A.G., Vandenesch G., Lina G., Gaia V., Jarraud S., *Comparison of Sofia Legionella FIA and Binax NOW® Legionella urinary antigen card in two national reference centers*, European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 34, 2015, s. 1803-1807.
9. Bibb W.F., Amow P.M., Thacker L., McKinney R.M., *Detection of soluble Legionella pneumophila antigens in serum and urine specimens by enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal and polyclonal antibodies*, Journal of Clinical Microbiology, 3, 1984, s. 478-482.
10. Birtles R.J., Harrison T.G., Samuel D., Taylor A.G., *Evaluation of urinary antigen ELISA for diagnosing Legionella pneumophila serogroup 1 infection*, Journal of Clinical Pathology, 43, 1990, s. 685-690.
11. Blackmon J.A., Chandler F.W., Cherry W.B., England III A.C., Feeley J.C., Hicklin M.D., McKinney R.M., Wilkinson H.W., *Legionellosis*, The American journal of pathology, 3, 1981, s. 429-465.
12. Blázquez R.M., Espinosa F.J., Martínez-Toldos C.M., Alemany L., García-Orenes M.C., Segovia M., *Sensitivity of urinary antigen test in relation to clinical severity in a large*

- outbreak of Legionella pneumonia in Spain*, European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 24, 2005, s. 488-491.
13. Boer J.W.D., Yzerman E.P.F., *Diagnosis of Legionella infection in Legionnaires' disease*, European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 23, 2004, s. 871-878.
  14. Borges V., Nunes A., Sampaio D.A., Vieira L., Machado J., Simões M.J., Gonçalves P., Gomes J.P., *Legionella pneumophila strain associated with the first evidence of person-to-person transmission of Legionnaires' disease: a unique mosaic genetic backbone*, Scientific Reports, 6, 2016, s. 1-11.
  15. Botelho-Nevers E., Grattard F., Viallon A., Allegra S., Jarraud S., Verhoeven P., Marcuccilli A., Lucht F., Pozzetto B., Berthelot P., *Prospective evaluation of RT-PCR on sputum versus culture, urinary antigens and serology for Legionnaire's disease diagnosis*, Journal of Infection, 73, 2016, s. 123-128.
  16. Brown R.B., *Legionella pneumonia. The spectrum continues to expand*, CHEST, 125, 2003, s. 1979-1980.
  17. Brown S.L., Bibb W.F., McKinney R.M., *Retrospective examination of lung tissue specimens for the presence of Legionella organisms: comparison of an indirect fluorescent-antibody system with direct fluorescent-antibody testing*, Journal of Clinical Microbiology, 4, 1984, s. 468-472.
  18. Bruin J.P., Diederer B.M., *Evaluation of Meridian TRU Legionella®, a new rapid test for detection of Legionella pneumophila serogroup 1 antigen in urine samples*, European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 32, 2013, s. 333-334.
  19. Buesching W.J., Brust R.A., Ayers L.W., *Enhanced primary isolation of Legionella pneumophila from clinical specimens by low-pH treatment*, Journal of Clinical Microbiology, 6, 1983, s. 1153-1155.
  20. Cao B., iu X., Yu X., Chen M., Feng L., Wang L., *A new oligonucleotide microarray for detection of pathogenic and non-pathogenic Legionella spp.*, PLOS One, 3, 2014, s. 1-17.
  21. Cao B., Yao F., Liu X., Feng L., Wang L., *Development of a DNA microarray method for detection and identification of all 15 distinct O-antigen forms of Legionella pneumophila*, Applied and Environmental Microbiology, 21, 2013, s. 6647-6654.
  22. Cherry W.B., Pittman B., Haris P.P., Herbert A., Thomas B.M., Thacker L., Weaver R. E., *Detection of Legionnaires disease bacteria by direct immunofluorescent staining*, Journal of Clinical Microbiology, 3, 1978, s. 329-338.
  23. Collins M.T., *Legionella infections in animals*. Israel Journal of Medical Sciences, 22, 1986, s. 662-673.
  24. Conza L., Casati S., Gaia V., *Detection limits of Legionella pneumophila in environmental samples after co-culture with Acanthamoeba polyphaga*, BMC Microbiology, 13, 2013, s. 1-6.
  25. Cross K.E., Mercante J.W., Benitez A.J., Brown E.W., Diaz M.H., Winchell J.M., *Simultaneous detection of Legionella species and L. anisa, L. bozemanii, L. longbeachae and L. micdadei using conserved primers and multiple probes in a multiplex real-time PCR assay*, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 85, 2016, s. 295-301.
  26. Cunha B.A., *Severe Legionella pneumonia: rapid presumptive clinical diagnosis with Winthrop-University Hospital's weighted point score system (modified)*, Heart & Lung, 4, 2008, s. 311-320.
  27. Descours G., Hannetel H., Reynaud J.V., Ranc A.G., Beraud L., Kolenda C., Campese C., Lina G., Ginevra C., Jarrauda S., *Adaptation of amoeba plate test to recover Legionella strains from clinical samples*, Journal of Clinical Microbiology, 5, 2018, s. 1-7.
  28. Descours G., Suet A., Ginevra C., Campese C., Slimani S., Ader F., Che D., Lina G., Jarrauda S., *Contribution of amoebic coculture to recovery of Legionella isolates from*

- respiratory samples: prospective analysis over a period of 32 months, *Journal of Clinical Microbiology*, 5, 2012, s. 1725-1726.
29. Diederer B.M., Kluytmans J.A.J.W., Peeters M.F., *Evaluation of vircell enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay for detection of antibodies against Legionella pneumophila*, *Clinical and Vaccine Immunology*, 3, 2006, s. 361-364.
  30. Edagawa A., Kimura A., Kawabuchi-Kurata T., Adachi S., Furuhashi K., Miyamoto H., *Investigation of Legionella contamination in bath water samples by culture, amoebic co-culture, and Real-Time Quantitative PCR methods*, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12, 2015, s. 13118-13130.
  31. Edelstein P.F., *Laboratory diagnosis of infections caused by Legionellae*, *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 1, 1987, s. 4-10.
  32. Edelstein P.H., Snitzer J.B., Bridge J.A., *Enhancement of recovery of Legionella pneumophila from contaminated respiratory tract specimens by heat*, *Journal of Clinical Microbiology*, 6, 1982, s. 1061-1065.
  33. Elder E.M., Brown A., Remington J.S., Shonnard J., Naot Y., *Microenzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin G and immunoglobulin M antibodies to Legionella pneumophila 1*, 1983, s. 112-121.
  34. Falkinham III J.O., Hilborn E.D., Arduino M.J., Pruden A., Edwards M.A., *Epidemiology and ecology of opportunistic premise plumbing pathogens: Legionella pneumophila, Mycobacterium avium, and Pseudomonas aeruginosa*, *Environmental Health Perspectives*, 8, 2015, s. 749-758.
  35. Faria-Ramos I., Costa-de-Oliveira S., Barbosa J., Cardoso A., Santos-Antunes J., Rodrigues A.G., Pina-Vaz C., *Detection of Legionella pneumophila on clinical samples and susceptibility assessment by flow cytometry*, *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 31, 2012, s. 3351-3357.
  36. Faris B., Faris C., Schousboe M., Heath Ch.H., *Legionellosis from Legionella pneumophila serogroup 13*, *Emerging Infectious Diseases*, 9, 2005, s. 1405-1409.
  37. Feeley J.C., Gibson R.J., Gorman G.W., Langford N.C., Rasheed J.K., Mackel D.C., Baine W.B., *Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for Legionella pneumophila*, *Journal of Clinical Microbiology*, 4, 1979, s.437-441.
  38. Feeley J.C., Gorman G.W., Weaver R.E., Mackel D.C., Smith H.W., *Primary isolation media for Legionnaires disease bacterium*, *Journal of Clinical Microbiology*, 3, 1978, s. 320-325.
  39. Féraudet-Tarisse C., Vaisanen-Tunkelrott M-L., Moreau K., Lamourette P., Créminon Ch., Volland H., *Pathogen-free screening of bacteria-specific hybridomas for selecting high-quality monoclonal antibodies against pathogen bacteria as illustrated for Legionella pneumophila*, *Journal of Immunological Methods*, 391, 2013, s. 81-94.
  40. Ferreira-Coimbra J., Rebelo S., Cunha A.L., Guimarães J.T., Bettencourt P., *Legionella urinary antigen test – a contribute towards a more rational use*, *European Journal of Internal Medicine*, 59, 2019, s. 20-21.
  41. Fields B.S., Benson R.F., Besser R.E., *Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation*, *Clinical Microbiology Reviews*, 3, 2002, s. 506-526.
  42. Fontana S., Scaturro M., Rota M.C., caporali M.G., Ricci M.L., *Molecular typing of Legionella pneumophila serogroup 1 clinicalstrains isolated in Italy*, *International Journal of Medical Microbiology*, 304, 2014, s. 597-602.
  43. Franco-Garcia A., Varughese T.A., Lee Y.J., Papanicolaou G., Rosenblum M.K., Hollmann T.J., Koehne G., Boulad F., Babady N.E., Tang Y-W., Seo S.K., *Diagnosis of extrapulmonary legionellosis in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients by direct 16S ribosomal ribonucleic acid sequencing and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*, *Open Forum Infectious Diseases*, 3, 2017, s. 1-3.

44. Gaia V., Casati S., Tonolla M., *Rapid identification of Legionella spp. by MALDI-TOF MS based protein mass fingerprinting*, Systematic and Applied Microbiology, 34, 2011, s. 40-44.
45. Garbino J., Bornand J-E., Uçkay I., Fonseca S., Sax H., *Impact of positive legionella urinary antigen test on patient management and improvement of antibiotic use*, Journal of Clinical Pathology, 57, 2004, s. 1302-1305.
46. Gholipour A., Moosavian M., Makvandi M., Galehdari H., Alvandi A., Mard S.A., *Development of an indirect sandwich ELISA for detection of urinary antigen, using Legionella pneumophila PAL protein*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 30, 2014, s. 1463-1471.
47. Ginevra Ch., Lopez M., Forey F., Reyrolle M., Meugnier H., Vandenesch F., Etienne J., Jarraud S., Molmeret M., *Evaluation of a nested-PCR-derived sequence-based typing method applied directly to respiratory samples from patients with Legionnaires' disease*, Journal of Clinical Microbiology, 4, 2009, s. 981-987.
48. Hayden R.T., Uhl J.R., Qian X., Hopkins M.K., Aubry M.C., Limper A.H., Lloyd R.V., Cockerill F.R., *Direct detection of Legionella species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of light cycler PCR, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture*, Journal of Clinical Microbiology, 7, 2001, s. 2618-2626.
49. Helbig J.H., Bernander S., Castellani Pastoris M., Etienne J., Gaia V., Lauwers S., Lindsay D., Lück P.C., Marques T., Mentula S., Peeters M.F., Pelaz C., Struelens M., Uldum S.A., Wewalka G., Harrison T.G., *Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of Legionella pneumophila serogroups and monoclonal subgroups*, European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 21, 2002, s. 710-716.
50. Helbig J.H., Kurtz J.B., Pastoris M.C., Pelaz C., Lück P.Ch., *Antigenic lipopolysaccharide components of Legionella pneumophila recognized by monoclonal antibodies: possibilities and limitations for division of the species into serogroups*, Journal of Clinical Microbiology, 11, 1997, s. 2841-2845.
51. Held J., *Increasing the sensitivity of the BinaxNOW Legionella urinary antigen immunochromatographic test by additional readings at later time points*, Journal of Medical Microbiology, 6, 2012, s. 884-885.
52. Herbert G.A., Pittman B., McKinney R.M., *Optimal fluorescein-to-protein ratios of bacterial direct fluorescent-antibody reagents*, Journal of Clinical Microbiology, 3, 1981, s. 498-502.
53. Hilbi H., Jarraud S., Hartland E., Buchrieser C., *Update on Legionnaires' disease: pathogenesis, epidemiology, detection and control*, Molecular Microbiology, 76, 2010, s. 1-11.
54. Ingram J.G., Plouffe J.F., *Danger of sputum purulence screens in culture of Legionella species*, Journal of Clinical Microbiology, 1, 1994, s. 209-210.
55. Janczarek M., Palusińska-Szys M., *PCR method for the rapid detection and discrimination of Legionella spp. based on the amplification of pcs, pmtA, and 16S rRNA genes*, Journal of Applied Genetics, 57, 2016, s. 251-261.
56. Jørgensen Ch.S., Uldum S.A., Sørensen J.F., Skovsted I.C., Otte S., Elverdal P.I., *Evaluation of a new lateral flow test for detection of Streptococcus pneumoniae and Legionella pneumophila urinary antigen*, Journal of Microbiological Methods, 116, 2015, s. 33-36.
57. Kalicki B., Placzyńska M., Milart J., Żyłak A., Rustecka A., Jung A., *Zakażenia pałeczkami Legionella pneumophila – opis przypadku*, Pediatria i Medycyna Rodzinna, 4, 2011, s. 415-419.

58. Kim M.J., Sohn J.W., Park D.W., Park S.Ch., Chun B.Ch., *Characterization of a lipoprotein common to Legionella species as a urinary broad-spectrum antigen for diagnosis of Legionnaires' disease*, Journal of Clinical Microbiology, 7, 2003, s. 2974-2979.
59. Kim S.M., Jeong Y., Sohn J.W., Kim M.J., *Multiplex real-time PCR assay for Legionella species*, Molecular and Cellular Probes, 29, 2015, s. 414-419.
60. Kohler R.B., Wilde III Ch., Johnson W., Joly J., Wheat L.J., Baker R., Misfeldt M., *Immunologic diversity among serogroup 1 Legionella pneumophila urinary antigens demonstrated by monoclonal antibody enzyme-linked immunosorbent assays*, Journal of Clinical Microbiology, 10, 1988, s. 2059-2063.
61. Kontchou J.A., Nocker A., *Optimization of viability qPCR for selective detection of membrane-intact Legionella pneumophila*, Journal of Microbiological Methods, 156, 2019, s. 68-76.
62. Lévesque S., Lalancette C., Bernard K., Pacheco A.L., Dion R., Longtin J., Tremblay C., *Molecular typing of Legionella pneumophila isolates in the province of Quebec from 2005 to 2015*, PLOS One, 10, 2016, s. 1-12.
63. Lindsay D.S.J., Abraham W.H., Findlay W., Christie P., Johnston F., Edwards G.F.S., *Laboratory diagnosis of legionnaires' disease due to Legionella pneumophila serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods*, Journal of Medical Microbiology, 53, 2004, s. 183-187.
64. Lück P.C., Helbig J.H., Schuppler M., *Epidemiology and laboratory diagnosis of Legionella infections*, Journal of Laboratory Medicine, 26, 2002, s. 174-182.
65. Maiwalda M., Helbig J.H., Lück P.Ch., *Laboratory methods for the diagnosis of Legionella infections*, Journal of Microbiological Methods, 33, 1998, s. 59-79.
66. Malan A.K., Martins T.B., Jaskowski T.D., Hill H.R., Litwin Ch.M., *Comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays with an immunofluorescence assay for detection of Legionella pneumophila types 1 to 6*, Journal of Clinical Microbiology, 7, 2003, s. 3060-3063.
67. Marrie T.J., Garay J.R., Weir E., *Legionellosis: Why should I test and report?*, Canadian Medical Association Journal, 182, 2010, s. 1538-1541.
68. Maurin M., Hammer L., Gestin L., Timsit J.F., Rogeaux O., Delavena F., Tous J., Epaulard O., Brion J.P., Croize' J., *Quantitative real-time PCR tests for diagnostic and prognostic purposes in cases of legionellosis*, Clinical Microbiology and Infection, 4, 2010, s. 379-384.
69. Mercante J.W., Winchell M., *Current and emerging Legionella diagnostics for laboratory and outbreak investigations*, Clinical Microbiology Reviews, 1, 2015, s. 95-133.
70. Mizrahi H., Peretz A., Lesnik R., Aizenberg-Gershtein Y., Rodríguez-Martínez S., Sharaby Y., Pastukh N., Brettar I., Manfred G., Halpern H&M., *Comparison of sputum microbiome of legionellosis-associated patients and other pneumonia patients: indications for polybacterial infections*, Scientific Reports, 7, 2016, s. 1-11.
71. Morrill W.E., Barbaree J.M., Fields B.S., *Increased recovery of Legionella micdadei and Legionella bozemanii on buffered charcoal yeast extract agar supplemented with albumin*, Journal of Clinical Microbiology, 3, 1990, s. 616-618.
72. Mrozińska M., *Zapalenie płuc o etiologii Legionella pneumophila (Lp) u trojga dzieci – opis przypadków*, Przegląd Epidemiologiczny, 59, 2005, s. 851-857.
73. Murdoch D.R., *Diagnosis of Legionella infection*, Medical Microbiology, 36, 2003, s. 64-69.
74. Murdoch D.R., Podmore R.G., Anderson T.P., Barratt K., Maze M.J., French K.E., Young S.A., Chambers S.T., Werno A.M., *Impact of routine systematic polymerase chain reaction testing on case finding for Legionnaires' disease: a pre-post comparison study*, Clinical Infectious Diseases, 57, 2013, s. 1275-1281.

75. Palusinska-Szys M., Szuster-Ciesielska A., Kania M., Janczarek M., Chmiel E., Danikiewicz W., *Legionella dumoffii* utilizes exogenous choline for phosphatidylcholine synthesis, *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 2014, s. 8256-8279.
76. Palusińska-Szys M., Cendrowska-Pinkosz M., *Występowanie i chorobotwórczość bakterii z rodziny Legionellaceae*, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 62, 2008, s. 337-353.
77. Patel R., Moore M.R., Fields B.S., *Legionellosis*, [w:] Brachman P., Abrutyn E., Bacterial infections of humans. Epidemiology and control, Springer, Boston, 2009, s. 395-413.
78. Pearce M.M., Theodoropoulos N., Mandel M.J., Brown E., Reed K.D., Cianciotto N.P., *Legionella cardiaca* sp. nov., isolated from a case of native valve endocarditis in a human heart, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 2012, s. 2946-2954.
79. Peci A., Winter A-L., Gubbay J.B., *Evaluation and comparison of multiple test methods, including real-time PCR, for Legionella detection in clinical specimens*, *Frontiers in Public Health*, 175, 2016, s. 1-8.
80. Petzold M., Ehrlich R., Slickers P., Pleischl S., Brockmann A., Exner M., Monecke S., Lück Ch., *Rapid genotyping of Legionella pneumophila serogroup 1 strains by a novel DNA microarray-based assay during the outbreak investigation in Warstein, Germany 2013*, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 220, 2017, s. 673-678.
81. Phin N., Parry-Ford F., Harrison T., Stagg H.R., Zhang N., Kumar K., Lortholary O., Zumla A., Abubakar I., *Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease*, *The Lancet Infectious Diseases*, 14, 2014, s. 1011-1021.
82. Pierre D.M., Baron J., Yu V.L., Stout J.E., *Diagnostic testing for Legionnaires' disease*, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 59, 2017, s. 1-4.
83. Ranc A-G., Carpentier M., Beraud L., Descours G., Ginevra Ch., Maisonneuve E., Verdon J., Berjeaud J-M., Lina G., Jarraud S., *Legionella pneumophila LPS to evaluate urinary antigen tests*, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 89, 2017, s. 89-91.
84. Rojas A., Navarro M.D., Forne's F.E., Serra E., Simarro E., Rojas J., Ruiz J., *Value of serological testing for diagnosis of Legionellosis in outbreak patients*, *Journal of Clinical Microbiology*, 8, 2005, s. 4022-4025.
85. Rokosz N., Rastawicki W., Zasada A.A., Baczewska-Rej M., *Mikrobiologiczna diagnostyka zakażeń układu oddechowego wywołanych przez pałeczki Legionella pneumophila*, *Pneumonologia i Alergologia Polska*, 1, 2010, s. 54-59.
86. Rose N.R., Hamilton R.G., Detrick B., *Manual of clinical laboratory immunology*, ASM Press, Washington DC, 2002, s. 1282.
87. Sala-Comorera L., Vilaró C., Galofré B., Blanch A.R., García-Aljara C., *Use of matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight (MALDI–TOF) mass spectrometry for bacterial monitoring in routine analysis at a drinking water treatment plant*, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 219, 2016, s. 577-584.
88. Saraya T., Nunokawa H., Ohkuma K., Watanabe T., Sada M., Inoue M., Honda K., Oda M., Ogawa Y., Tamura M., Yokoyama T., Kurai D., Kimura H., Ishii H., Goto H., Takizawa H., *A novel diagnostic scoring system to differentiate between Legionella pneumophila pneumonia and Streptococcus pneumoniae pneumonia*, *Internal Medicine*, 57, 2018, s. 2479-2487.
89. Scaturro M., Fontana S., Dell'eva I., Helfer F., Marchio M., Stefanetti M.V., Cavallaro M., Miglietta M., Montagna M.T., Giglio O.D., Cuna T., Chetti L., Sabattini M.A.B., Carlotti M., Viggiani M., Stenico A., Romanin E., Bonanni E., Ottaviano C., Franzin L., Avanzini C., Demarie V., Corbella M., Cambieri P., Marone P., Rota M.C., Bella A., Ricci M.L., *A multicenter study of viable PCR using propidium monoazide to detect Legionella in water samples*, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 85, 2016, s. 283-288.

90. Scola B.L., Mezi L., Weiller P.L., Raoult D., *Isolation of Legionella anisa using an amoebic coculture procedure*, Journal of Clinical Microbiology, 1, 2001, s. 365-366.
91. Sharma L., Losier A., Tolbert T., Cruz Ch.S.D., Marion Ch.R., *Pneumonia updates on Legionella, Chlamydomphila, and Mycoplasma pneumonia*, Clinics in Chest Medicine, 38, 2017, s. 45-58.
92. She R.C., Billetdeaux E., Phansalkar A.R., Petti C.A., *Limited applicability of direct fluorescent-antibody testing for Bordetella sp. and Legionella sp. specimens for the clinical microbiology laboratory*, Journal of Clinical Microbiology, 7, 2007, s. 2212-2214.
93. Singhal N., Kumar M., Kanaujia P.K., Virdi J.S., *MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis*, Frontiers in Microbiology, 791, 2015, s. 1-16.
94. Stojek N.M., *Zagrożenie bakteriami z rodzaju Legionella w środowisku pracy*, Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy, 3, 2004, s. 61-67.
95. Stout J.E., *Laboratory diagnosis of Legionnaires' disease: the expanding role of the Legionella urinary antigen test*, Clinical Microbiology Newsletter, 22, 2000, s. 62-64.
96. Stypułkowska-Misiurewicz H., Krogulska B., Pancer K., Matuszewska R., *Legionella sp. – laboratoryjne rozpoznawanie zakażeń u ludzi i wykrywanie w środowisku wodnym*, Roczniki Państwowego Zakładu Higieny, 1, 2001, s. 1-18.
97. Stypułkowska-Misiurewicz H., Pancer K., *Legionelloza – nowe zagrożenie w Polsce*, Przegląd epidemiologiczny, 4, 2002, s. 567-576.
98. Tang P.W., Toma S., *Broad-spectrum enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Legionella soluble antigens*, Journal of Clinical Microbiology, 4, 1986, s. 556-558.
99. Tang P.W., Toma S., Rajkumar W.D., *Detection of urinary antigens of Legionella pneumophila serogroup 12 by broad-spectrum enzyme-linked immunosorbent assay*, Journal of Clinical Microbiology, 4, 1989, s. 783-784.
100. Tenover F.C., Edelstein P.H., Goldstein L.C., Sturge J.C., Plorde J.J., *Comparison of cross-staining reactions by Pseudomonas spp. and fluorescein-labeled polyclonal and monoclonal antibodies directed against Legionella pneumophila*, 3, 1986, s. 647-649.
101. Tossa P., Deloge-Abarkan M., Zmirou-Navier D., Hartemann P., Mathieu L., *Pontiac fever: an operational definition for epidemiological studies*, BMC Public Health, 112, 2006, s. 1-10.
102. Vaccaro L., Izquierdo F., Magnet A., Hurtado C., Salinas M.A., Gomes T.S., Angulo S., Salso S., Pelaez J., Tejada M.I., Alhambra A., Gómez C., Enríquez A., Estirado E., Fenoy S., Aguila C., *First case of Legionnaire's disease caused by Legionella anisa in Spain and the limitations on the diagnosis of Legionella nonpneumophila infections*, PLOS One, 7, 2016, s. 2-12.
103. Vance P.H., Schaeffer F., Trevino E., Weissfeld A.S., *Legionella: a fascinating bacterium uncovered in the twentieth century*, Clinical Microbiology Newsletter, 15, 2015, s. 119-123.
104. Vickers R.M., Brown A., Garrity G.M., *Dye-containing buffered charcoal-yeast extract medium for differentiation of members of the family Legionellaceae*, Journal of Clinical Microbiology, 2, 1981, s. 380-382.
105. Wever P.C., Yzerman E.P.F., Kuijper E.J., Speelman P., Dankert J., *Rapid diagnosis of Legionnaires' disease using an immunochromatographic assay for Legionella pneumophila serogroup 1 antigen in urine during an outbreak in the Netherlands*, Journal of Clinical Microbiology, 7, 2000, s. 2738-2739.
106. Whiley H., Bentham R., *Legionella longbeachae and legionellosis*, Emerging Infectious Diseases, 4, 2011, s. 579-583.
107. Wilkinson H.W., Fikes B.J., Cruce D.D., *Indirect immunofluorescence test for serodiagnosis of Legionnaires disease: evidence for serogroup diversity of Legionnaires*

- disease bacterial antigens and for multiple specificity of human antibodies, *Journal of Clinical Microbiology*, 3, 1979, s. 379-383.
108. Yiallourou P.K., Papadouri T., Karaoli Ch., Papamichael E., Zeniou M., Pieridou-Bagatzouni D., Papageorgiou G.T., Pissarides N., Harrison T.G., Hadjidemetriou A., *First outbreak of nosocomial Legionella infection in term neonates caused by a cold mist ultrasonic humidifier*, *Clinical Infectious Diseases*, 57, 2013, s. 48-56.
109. Yzerman E.P.F., Boer J.W., Lettinga K.D., Schellekens J., Dankert J., Peeters M., *Sensitivity of three urinary antigen tests associated with clinical severity in a large outbreak of Legionnaires' disease in the Netherlands*, *Journal of Clinical Microbiology*, 9, 2001, s. 3232-3236.
110. Zhan X.-Y., Hu Ch.-H., Zhu Q.-Y., *Research advances of Legionella and Legionnaires' disease*, *Frontiers of Medicine in China*, 4, 2010, s. 166-176.

## Diagnostyka pałeczek *Legionella* w materiale klinicznym

### Streszczenie

Przedstawiciele rodziny *Legionellaceae* to Gram-ujemne bakterie tlenowe, które są częścią mikroflory naturalnych ekosystemów wodnych oraz sztucznych systemów wodnych. Bakterie te należą do względnych patogenów wewnątrzkomórkowych wolno żyjących ameb oraz makrofagów płucnych człowieka, wymagających ściśle określonych warunków fizykochemicznych do namnażania wewnątrz komórki gospodarza eukariotycznego. Transmisja patogennych bakterii zachodzi zazwyczaj poprzez inhalację zakażonego aerozolu lub aspirację wody zawierającej pałeczki *Legionella*. Bakterie te są czynnikiem etiologicznym zarówno grypopodobnej gorączki Pontiac, jak i wielopłatowego zapalenia płuc (choroby legionistów). Zakażenia mają charakter epidemii lub występują endemicznie. Najgroźniejsze przypadki dotyczą pacjentów z obniżoną sprawnością funkcjonowania układu odpornościowego. Wskaźnik umieralności na legionellozowe zapalenie płuc determinowany jest głównie przez dobór wiarygodnej metody diagnostycznej oraz zastosowanie terapii przeciwbakteryjnej na wczesnym etapie infekcji. *L. pneumophila* serogrupy 1 jest odpowiedzialna za występowanie 70-80% przypadków legionellozy potwierdzonej testami laboratoryjnymi na terenie Europy i USA.

Obecnie stosowane metody, które pozwalają na wykrycie pałeczek *Legionella* w materiale klinicznym polegają na hodowli i izolacji bakterii, wykrywaniu antygeny *Legionella* w moczu i tkankach, oznaczaniu miana swoistych przeciwciał oraz metodach genetycznych. Najnowsze techniki oparte na proteomice lub analizie kwasu nukleinowego patogenów pozwalają na rozwój wysokoprzepustowych technik diagnostycznych precyzyjnie identyfikujących drobnoustroje obecne w materiale klinicznym.

Słowa kluczowe: *Legionella*, legionelloza, antygen w moczu

## Diagnostics of *Legionella* bacilli in clinical material

### Abstract

Representatives of the family *Legionellaceae* are Gram-negative aerobic bacteria and part of the microflora of natural aquatic ecosystems and artificial water systems. These bacteria belong to facultative intracellular pathogens of free-living amoebas and pulmonary macrophages, which require strictly defined physicochemical conditions for multiplication inside the eukaryotic host cell. These pathogenic bacteria are transmitted through inhalation of infected aerosols or aspiration of water containing *Legionella* bacilli. The bacteria are the etiological factor of flu-like Pontiac fever and multilobar pneumonia (Legionnaires' disease). *Legionella* infections are either epidemic or endemic. The most serious cases are diagnosed in immunocompromised patients. The mortality rate in legionellosis is mainly determined by selection of a reliable diagnostic method and application of antibacterial therapy at the early stage of infection. *L. pneumophila* serogroup 1 is implicated in 70-80% of legionellosis cases confirmed by laboratory tests in Europe and the USA.

The methods used currently for detection of *Legionella* bacilli in clinical material consist in culture and isolation of bacteria, detection of the *Legionella* antigen in urine and tissues, determination of specific antibodies titres, and genetic methods. The latest techniques based on proteomics or analysis of pathogen nucleic acid facilitate the development of high-throughput diagnostic techniques that identify microorganisms in the clinical material precisely.

Keywords: *Legionella*, legionellosis, antigen in urine



# Zastosowanie procesów mikrobiologicznej dehalogenacji związków organicznych w inżynierii środowiska

## 1. Wstęp

Halogenowane związki organiczne (HZO) są chemikaliami powszechnie wykorzystywanymi przez człowieka w różnych gałęziach przemysłu, na przykład do produkcji farb, klejów, rozpuszczalników, chłodziw, materiałów ogniotrwałych, materiałów sztucznych, farmaceutyków. Są także stosowane w rolnictwie jako środki ochrony roślin – herbicydy, fungicydy, insektycydy. Wprowadzane do środowiska syntetyczne HZO, wykazują trwałość, oporność na biodegradację, akumulację w środowiskach beztlenowych, w których ich rozkład jest jeszcze trudniejszy. Wraz ze wzrostem ilości podstawników halogenowych obserwowane jest zmniejszenie rozpuszczalności w wodzie i podatności na degradację w warunkach tlenowych oraz zwiększenie rozpuszczalności w tłuszczach [1]. HZO definiowane są jako niebezpieczne substancje chemiczne, odporne na transformację i degradację, akumulujące się w środowisku i tkankach tłuszczowych, o toksycznym wpływie na organizmy, w tym człowieka, wykazujące wpływ teratogeny oraz kancerogeny [2]. Konieczne jest zatem ograniczenie uwalniania HZO do środowiska oraz usuwanie zanieczyszczeń wywołanych ich rozprzestrzenieniem się. Metodami obecnie stosowanymi do remediacji środowisk zdegradowanych są metody fizyczno-chemiczne oraz biologiczne, wykorzystujące potencjał metaboliczny organizmów.

Niniejsza praca obejmuje przegląd danych dotyczących zastosowania procesów mikrobiologicznej dehalogenacji związków organicznych.

## 2. Potencjał mikroorganizmów do bioremediacji środowiska zanieczyszczonego HZO

W bioremediacji środowiska zanieczyszczonego HZO wprowadzonymi przez człowieka kluczową funkcję pełnią mikroorganizmy. Drobnoustroje są zdolne do transformacji związków organicznych zawdzięczają przede wszystkim ogromnej różnorodności produkowanych enzymów oraz zdolnościom adaptacyjnym do zmieniających się warunków środowiska i tolerancji na często wysokie stężenia toksycznych substancji. Bakterie charakteryzują się szybkim cyklem rozwojowym, powszechnością występowania, w niemal każdym, nawet ekstremalnym środowisku (gorące źródła, powierzchnie rowów tektonicznych w dnie morskim, wieczna zmarzlina). Występujący u bakterii horyzontalny transfer genów, gwarantuje szybsze dostosowanie się do zmian zachodzących w środowisku, poprzez szybką dystrybucję genów odpowiedzialnych za oporność na metale ciężkie, antybiotyki, jak również genów odpowiadających za transformację HZO. Bakterie samoczynnie adaptując się do środowiska są w stanie przetrwać w warunkach wysokich stężeń toksycznych

---

<sup>1</sup> Zakład Biologii, Wydział Instalacji Budowlanych, Hydrotechniki i Inżynierii Środowiska, Politechnika Warszawska, ul. Nowowiejska 20, 00-653 Warszawa.

substancji, np.: chlorowcopochodnych węglowodorów, a co więcej wykształciły mechanizmy służące wykorzystaniu ich jako źródła węgla i energii. Niezwykłe właściwości adaptacyjne drobnoustrojów w połączeniu z ich ogromną liczebnością (biomasa mikroorganizmów porównywalna jest z biomasą wszystkich wyższych organizmów na Ziemi) i szybkim cyklem reprodukcyjnym, zainteresowała naukowców do wykorzystywania ich w procesach oczyszczania środowisk z różnego rodzaju skażeń [3]. Dodatkowo wykorzystanie technik współczesnej biologii molekularnej pozwala poznać dokładniej szlaki metabolizmu i transformacji HZO. Wiedza ta połączona z nieocenionym potencjałem mikroorganizmów umożliwia opracowanie technologii przeznaczonej do efektywnej i wydajnej remediacji terenów zanieczyszczonych [4]. Najczęściej wśród mikroorganizmów transformujących halogenowane związki organiczne można znaleźć bakterie należące do rodzajów: *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Ralstonia*, *Flavobacterium*, *Nocardioidea*, *Bradyrhizobium*, *Ochrobactrum*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas*, *Dehalobacterium*, *Acetobacterium*, *Dehalospirillum*, *Desulfomonile* i wiele innych [5] oraz grzyby, głównie wymieniane są w literaturze tzw.: grzyby białej zgnilizny (ang. *white rot fungi*), np.: *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Panus tigrinus* [6].

### 3. Biologiczne procesy oczyszczania środowisk zanieczyszczonych

Powszechnie stosowanym procesem oczyszczania środowiska gruntowo-wodnego zanieczyszczonego substancjami, takimi jak: metale ciężkie, węglowodory ropowohodne, dioksyny, związki azotowe, halogenowane związki organiczne jest bioremediacja. Metoda ta wykorzystuje metabolizm organizmów (bakterii, grzybów, glonów jednokomórkowych, roślin wyższych – wówczas nazywana fitoremediacją) prowadzący do usunięcia skażeń z różnych środowisk, takich jak: osady denne, gleby, wody gruntowe. W tego typu biotechnologii można wykorzystać mikroflorę autochtoniczną, czyli organizmy naturalnie zasiedlające tereny zanieczyszczone lub allochtoniczne mikroorganizmy, które pochodzą z innego miejsca, w którym wystąpiły podobne czynniki antropopresji i zanieczyszczenie podobnymi substancjami. Organizmy allochtoniczne zdążyły jednak przystosować swój metabolizm do znacznie podwyższonych stężeń czynnika wywołującego zanieczyszczenie, stąd wprowadzone do nowego środowiska mogą je natychmiast aktywnie metabolizować. W zależności od miejsca przeprowadzenia procesu oczyszczania można wyróżnić bioremediację *in situ* (w miejscu skażenia) oraz *ex situ* (w innym niż miejsce skażenia). Ze względu na sposób wykorzystania drobnoustrojów, można podzielić bioremediację na naturalną oraz inżynierską, w ramach której wyróżnia się biostymulację oraz bioaugmentację [7-9].

### 4. Monitoring środowiska

Przed podjęciem decyzji o wdrożeniu biotechnologii celem oczyszczenia terenu, kluczowym etapem jest dokładna analiza – monitoring środowiska. Analiza taka powinna prowadzić do określenia typu zanieczyszczenia, jego skali, określić właściwości niezbędne do zaplanowania prac bioremediacyjnych, takie jak: pH, wilgotność, temperatura, potencjał redoks, obecność, ilość oraz rodzaj donorów i akceptorów elektronów, właściwości sorpcyjne (w przypadku gruntów), twardość

wody, skład chemiczny, powierzchnię, jaką zajmuje zanieczyszczenie, jego dokładną lokalizację, określenie kierunków migracji skażenia, kierunek przepływu wód gruntowych oraz obecność innych współwystępujących zanieczyszczeń (np.: metalami ciężkimi) [10, 11]. Ponadto należy przeprowadzić ocenę kondycji mikroflory autochtonicznej. Ocena ta najczęściej jest wykonywana poprzez określenie liczebności bakterii heterotroficznych. Liczebność szacowana powyżej  $10^4$ - $10^5$  jtk (jednostek tworzących kolonię)  $g^{-1}$  s.m. gleby uważana jest za wystarczającą do przeprowadzenia skutecznej bioremediacji [8].

## **5. Bioremediacja naturalna**

Wykorzystanie mikroflory autochtonicznej w procesach oczyszczania środowiska, z jednoczesnym zminimalizowaniem ingerencji człowieka jest właściwe dla procesów bioremediacji naturalnej, określanej też mianem bioremediacji pasywnej [12]. Dokładny monitoring środowiska wraz z charakterystyką mikroflory natywnej pozwala na oszacowanie potencjału mikroorganizmów do usuwania skażenia, skuteczności procesu oraz jego tempa. Jeśli analiza sytuacji wskazuje na skuteczne wyeliminowanie zanieczyszczenia i przywrócenie równowagi w zdegradowanym ekosystemie za sprawą wykorzystania naturalnie przebiegających procesów samooczyszczania, a więc poprzez naturalną bioremediację, nie ma konieczności stosowania bardziej kosztownych typów bioremediacji. Bioremediacja pasywna jednak jest najwolniejszą metodą bioremediacji, co również należy wziąć pod uwagę planując proces oczyszczania.

## **6. Bioremediacja inżynieryjna**

W przypadku, gdy endogenna mikroflora występuje w zbyt małej ilości lub też nie wykazuje aktywności metabolicznej wobec danego czynnika wywołującego zanieczyszczenie, albo gdy tempo procesu oczyszczania jest niezadowalające, należy wdrożyć dodatkowe działania bioremediacyjne. Wśród metod inżynieryjnych wyróżnia się biostymulację i bioaugmentację, prowadzące do intensyfikacji procesów rozkładu czy transformacji skażenia.

Biostymulacja ma za zadanie uaktywnić mikroflorę autochtoniczną poprzez pobudzenie jej metabolizmu wobec czynnika wywołującego zanieczyszczenie, zapewniając optymalne warunki dla rozwoju. Może to być związane z zapewnieniem odpowiedniej wilgotności, warunków tlenowych (napowietrzanie), dostarczaniem właściwej ilości biogenów: azotu i fosforu dla otrzymania optymalnej proporcji C:N:P odpowiadającej 100:10:1, gwarantującej osiągnięcie wysokiej aktywności metabolicznej [7, 13].

Bioaugmentacja oparta jest na wprowadzaniu do środowiska puli mikroorganizmów, wykazujących zdolność do rozkładu czy transformacji zanieczyszczenia. Proces poprzedzony jest selekcją szczepów zdolnych do utylizacji konkretnego rodzaju związku czy też grupy związków wywołujących skażenie oraz symulacjami ich rozkładu. Mikroorganizmy wprowadzane są do objętego skażeniem środowiska w formie biopreparatu, inaczej szczepionki bioremediacyjnej złożonej z namnożonych drobnoustrojów jednego szczepu lub częściej konsorcjum złożonego z kilku szczepów. Często bioaugmentacja wspomagana jest metodami stosowanymi w biostymulacji dla spotęgowania efektu oczyszczania [8, 14].

## **7. Mikroorganizmy wobec halogenowanych związków organicznych**

Przeprowadzana przez mikroorganizmy dehalogenacja najczęściej odbywa na drodze reakcji rozerwania wiązania węgiel-grupa halogenowa katalizowanej przez specyficzny enzym, a halogenowany związek organiczny wykorzystywany jest jako źródło węgla i energii. Proces dehalogenacji jest zatem wstępnym etapem umożliwiającym enzymatyczne rozerwanie szkieletu węglowego, prowadzące do pozyskania węgla. Halogenowany związek organiczny może stanowić również alternatywny akceptor elektronów w procesie oddychania beztlenowego (dehalorespiracja), w rezultacie którego mikroorganizmy wytwarzają energię. Dehalogenacja może stanowić, także mechanizm obronny mikroorganizmów prowadzący do detoksykacji, nie dostarczając energii, ani węgla [1, 15-17]. Bardzo często do dehalogenacji syntetycznych HZO, takich jak perchloroetylen (PCE), heksachlorobenzen (HCB), pentachlorofenol (PCP), polichlorowane bifenyly (PCBs), polihalogenowane dioksyiny, dochodzi na drodze kometabolizmu, a więc przypadkowych reakcji enzymatycznych. Mikroorganizmy produkując enzymy np.: 2,3-dioksygenazę katecholową, monooksygenazę metanową, monooksygenazę fenolową w szlaku metabolicznym degradacji innego związku, prowadzą pośrednio (przypadkowo) do transformacji HZO. Wielu autorów [1, 17] przyjmuje, że ksenobiotyczne HZO wykazują oporność na dehalogenację w warunkach tlenowych, metabolizowane mogą być jedynie w środowisku braku dostępu tlenu na drodze redukcyjnej dehalogenacji. Z kolei HZO naturalnego pochodzenia, takie jak chlorometan, chlorooctan, chlorofenol mogą stanowić substrat odżywczy dla mikroorganizmów i tym samym być przez nie metabolizowane w warunkach tlenowych. Głównymi typami reakcji katalizowanych przez odpowiednie tlenowe dehalogenazy są: utlenienie i redukcja, podstawienie, dehydrogenacja i eliminacja, przy czym reakcje utleniania i redukcji mogą angażować enzymy, których udział bezpośrednio nie prowadzi do rozerwania wiązania węgiel – halogen. Udział tych enzymów natomiast doprowadza do osłabienia wiązania, które na drodze kolejnych już reakcji, samoistnie ulega rozerwaniu doprowadzając do dehalogenacji związku [17-19].

## **8. Bioremediacja halogenowanych związków organicznych – perspektywy i ograniczenia**

Wykorzystanie mikrobiologicznych procesów dehalogenacji w bioremediacji terenów zanieczyszczonych wydaje się być obiecującym sposobem usuwania zanieczyszczeń halogenowanymi związkami organicznymi. Obok metod fizyczno-chemicznych, metody biologicznego oczyszczania środowiska z HZO uważane są za efektywne i ekonomiczne rozwiązanie. Procesy naturalnej bioremediacji są wykorzystywane w inżynierii i ochronie środowiska. W Grindsted Stream (Jutland, Dania) usuwano zanieczyszczenie wody chlorowanymi etenami: tetrachloroetenem (PCE), trichloroetenem (TCE) i produktami ich degradacji cis-1,2-dichloroetenem (cis-DCE) i chlorkiem winylu (VC) [20]. W River Tame (Birmingham, Wielka Brytania) stwierdzono zachodzenie w strefie hyporeicznej rzeki procesów biologicznej dechloracji i usuwania TCE dopływającego z zanieczyszczonymi wodami gruntowymi [21]. Podobne zjawisko obserwowano w Zenne River (Vilvoorde, Belgia), gdzie woda

zanieczyszczona była cis-DCE i VC [22] czy River Tern, (Shropshire, Wielka Brytania), gdzie występowało zanieczyszczenie wody TCE [23].

Simsir i współpracownicy [24] badali proces naturalnej bioremediacji środowiska gruntowo wodnego w pobliżu zamkniętej galwanizerni znajdującej się w Third Creek, Knoxville (Tennessee, USA) Oczyszczenie wód gruntowych z PCE i TCE mogło zachodzić na drodze beztlenowej dehalogenacji, na co wskazywała obecność bakterii z rodzajów *Dehalococcoides*, *Dehalobacter* i *Dehalogenimonas*. Obecność 2 szczepów metanotrofów z rodziny *Methylococcaceae* wskazywała na możliwość usuwania tych związków także w warunkach tlenowych na drodze kometabolizmu. Prowadzone badania wykazały jednak, że zachodzące procesy przemian biochemicznych nie wystarczały, aby zapobiec przedostawaniu się zanieczyszczeń do pobliskiej rzeki. Skuteczność procesów bioremediacyjnych w głównej mierze zależy bowiem od dostępności donorów i akceptorów elektronów. Przykładowo wodór odgrywa kluczową rolę w transformacji PCE do etenu w procesie redukcyjnej dehalogenacji jako donor elektronów wykorzystywany przez *Dehalococcoides ethenogenes*. Jednak dodanie donora elektronów nie działa specyficznie, powoduje aktywację metabolizmu różnych grup mikroorganizmów, nie tylko prowadzących dehalogenację, ale również tych mających negatywny wpływ na procesy transformacji HZO jak np.: organizmów metanogennych.

Kolejny problem stanowi biodostępność substancji i jej podatność na biodegradację. Na biodegradowalność wpływają cechy samego substratu, tzn.: rozpuszczalność w wodzie, masa cząsteczkowa, struktura, obecność grup funkcyjnych. Wiele spośród HZO wykazuje oporność na rozkład biochemiczny, stanowiąc problem dla biotechnologii. Duży kłopot stanowi sorpcja HZO do substancji organicznej naturalnie obecnej w glebie jak np.: kwasy humusowe, blokując w ten sposób dostęp dla drobnoustojów.

Szybkość i efektywność biodegradacji zależy również od stężenia substratu, jego toksyczności, dostępności tlenu, obecności fosforu i azotu oraz innych makro- i mikroelementów (wiele metali wchodzi w skład centrów aktywnych dehalogenaz), optymalnej wilgotności, temperatury, pH, równowagi sorpcyjnej, alternatywnych substratów wzrostowych obecnych w środowisku, a także braku inhibitorów – np.: toksycznych metali i metaloidów jak As, Se, Cd, Pb [7, 8].

Kolejnym niezwykle ważnym aspektem, który musi być uwzględniony w planowaniu procesów bioremediacji, są produkty pośrednie metabolizmu HZO. Niektóre drobnoustroje są w stanie przeprowadzać pełną transformację halogenowanego związku organicznego, jak wspomniany wyżej *D. ethenogenes*, natomiast dla większości mikroorganizmów jest to niemożliwe, np. *Dehalobacter restrictus*, *Dehalospirillum multivorans*, *Desulfomonile tiedjei*, biorąc udział w dehalogenacji PCE do TCE i dalej do DCE jednak pochodne tego ostatniego nie są dalej transformowane. Powoduje to szybkie nagromadzenie się produktu toksycznego, który może działać hamująco na mikroorganizmy. Dodatkowym problemem jest to, że niektóre mikroorganizmy dehalogenujące mogą przeprowadzać proces halogenacji związku organicznego, co może skutkować wtórnym nagromadzeniem halogenowanych pochodnych związków organicznych. Procesy naturalnej bioremediacji mogą zatem prowadzić do powstania bardziej toksycznych produktów. W takich sytuacjach jedynym rozwiązaniem wydaje się być wdrożenie bioaugmentacji z zastosowaniem odpowiedniego

zaszczepienia lub zmiana warunków prowadzenia procesu, np.: poprzez wprowadzenie napowietrzania i dodatkowego źródła węgla stymulującego tlenowe procesy kometabolicznego usuwania HZO [25, 26].

Warto zwrócić uwagę, iż na powodzenie metod bioremediacji *in situ* wpływa cała społeczność mikroorganizmów i ich wzajemne relacje jak np.: konkurencja o substrat, donor elektronów, transfer genów, wymiana metabolitów. Zrozumienie interakcji zachodzących w środowisku pomiędzy drobnoustrojami pozwoli na wyeliminowanie czynników hamujących i osiągnięcie zadowalających wyników w pracach bioremediacyjnych. Jest to jednak zadanie trudne i na pomoc przychodzą techniki izotopowe, jak np.: stabilne frakcjonowanie izotopowe umożliwiające identyfikację i pomiar efektywności procesów biodegradacji. Metoda ta opiera się na obecności dwóch stabilnych izotopów wodoru i węgla w cząsteczkach organicznych, gdzie mikroorganizmy chętniej rozkładają izotopowo lżejsze cząsteczki ( $^{12}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ ) [27]. Również pomocne są metody stosowane we współczesnej biologii molekularnej, takie jak wysokoprzepustowe sekwencjonowanie nowej generacji, mikromacierze, analizy metagenomiczne, metatranskryptomyczne i metaproteomiczne, których wykorzystanie umożliwia bardziej wnikliwą analizę zależności między mikroorganizmami w ekosystemach, co jest niezbędne do zaplanowania i wdrożenia właściwej technologii oczyszczania.

## 9. Podsumowanie

Wzrost zapotrzebowania przemysłu i rolnictwa na halogenowane związki organiczne skutkuje ich coraz większym uwalnianiem do środowiska. Bioremediacja jako metoda przyjazna środowisku, efektywna i stosunkowo niedroga wydaje się być remedium na zanieczyszczenia HZO. Jednak niezwykle istotny, przed podjęciem decyzji o wdrożeniu biotechnologii, jest dokładny monitoring środowiska, który umożliwi wytypowanie odpowiedniej strategii bioremediacji. Do tej pory wiele prób wdrożenia strategii bioremediacji zakończyła się sukcesem. Jednak dalsze badania są niezbędne do zwiększenia efektywności prac bioremediacyjnych, a bardziej wnikliwa analiza pozwoli na zrozumienie interakcji zachodzących pomiędzy mikroorganizmami w zanieczyszczonych ekosystemach.

## Literatura

1. Haggblom M.M., Bossert I.D., *Dehalogenation: Microbial Processes and Environmental Applications*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2003.
2. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs), United Nations Environment Programme, Stockholm, 22 May 2001, [https://www.chemsafetypro.com/Topics/Convention/Stockholm\\_Convention\\_on\\_Persistent\\_Organic\\_Pollutants\\_POPs.html](https://www.chemsafetypro.com/Topics/Convention/Stockholm_Convention_on_Persistent_Organic_Pollutants_POPs.html)
3. Kunicki-Goldfinger W.J.H., *Życie Bakterii*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1994.
4. Gadd G.M., *Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization*, Current Opinion in Biotechnology 11, 2000, 271-279.
5. Löffler F.E., Cole J.R., Ritalahti K.M., Tiedje J.M., *Diversity of dechlorinating bacteria*, [w:] Haggblom M.M., Bossert I.D., *Dehalogenation: Microbial Processes and Environmental Applications*, Kluwer Academic, Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2003.

6. Rubilar O., Diez M.C., Gianfreda L., *Transformation of Chlorinated Phenolic Compounds by White Rot Fungi*, Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 38, 2008, 227-268.
7. Łebkowska M., Klimiuk E., *Biotechnologia w Ochronie Środowiska*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
8. Błaszczak M., *Mikroorganizmy w ochronie środowiska*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007.
9. Shahsavari E., Poi G., Aburto-Medina A., Haleyr N., Ball A.S., *Bioremediation Approaches for Petroleum*, Enhancing Cleanup of Environmental Pollutants, 2017, 21-41.
10. Groudev S., Georgiev P., Spasova I., Nicolova M., *Bioremediation of acid mine drainage in a uranium deposit*, Hydrometallurgy, 94, 2008, 93-99.
11. Nikolaou A.D., Meric S., Lekkas D.F., Naddeo V., Belgiornob V., Groudevd S., Tanike A., *Multi-parametric water quality monitoring approach according to the WFD application in Evros trans-boundary river basin: priority pollutants*, Desalination, 226, 2008, 306-320.
12. Vidali M., *Bioremediation. an overview*, Pure and Applied Chemistry, 73, 2001, 1163-1172.
13. Agarry S.E., Ogunleye O.O., *Box-Behnken design application to study enhanced bioremediation of soil artificially contaminated with spent engine oil using biostimulation strategy*, International Journal of Energy and Environmental Engineering, 3, 2012.
14. Tyagi M., Fonseca M.M.R., Carvalho C.C.C.R., *Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes*, Biodegradation, 22, 2011, 231-241.
15. Hug L.A., Edwards E.A., *Diversity of reductive dehalogenase genes from environmental samples and enrichment cultures identified with degenerate primer PCR screens*, Frontiers in Microbiology, 4, 2013, 341.
16. Hug L.A., Maphosa F., Leys D., Löffler F.E., Smidt H., Edwards E.A., Adrian L., *Overview of organohalide-respiring bacteria and a proposal for a classification system for reductive dehalogenases*, Philosophical Transactions of the Royal Society B Biology Science, 368, 2013, 20120322.
17. Atashgahi S., Haggblom M.M., Smidt H., *Organohalide respiration in pristine environments: implications for the natural halogen cycle*, Environmental microbiology, 20, (3), 2018, 934-948.
18. Fetzner S., *Bacterial dehalogenation*, Applied Microbiology and Biotechnology, 50, 1998, 633-657.
19. van Pee K.H., Unversucht S., *Biological dehalogenation and halogenation reactions*, Chemosphere, 52, 2003, 299-312.
20. Sonne A.T., McKnight U.S., Rønde V., Bjerg P.L., *Assessing the chemical contamination dynamics in a mixed land use stream system*, Water Research, 125, 2017, 141-151.
21. Freitas J.G., Rivett M.O., Roche R.S., Durrant M., Walker C., Tellam J.H., *Heterogeneous hyporheic zone dechlorination of a TCE groundwater plume discharging to an urban river reach* Science of The Total Environment, 505, 2015, 236-252.
22. Atashgahi S., Lu Y., Ramiro-Garcia J., Peng P., Maphosa F., Sipkema D., Dejonghe W., Smidt H., Springael D., *Geochemical parameters and reductive dechlorination determine aerobic cometabolic vs aerobic metabolic vinyl chloride biodegradation at oxic/anoxic interface of hyporheic zones*, Environmental Science Technology, 51, (3), 2017, 1626-1634.
23. Weatherill J., Krause S., Joyce K., Drijfhout F., Levy A., Cassidy N., *Nested monitoring approaches to delineate groundwater trichloroethene discharge to a UK lowland stream at multiple spatial scales*, Journal of Contaminant Hydrology, 158, 2014, 38-54.

24. Simsir B., Yan J., Im J., Graves D., Löffler F.E., *Natural attenuation in streambed sediment receiving chlorinated solvents from underlying fracture networks*, Environmental Science Technology, 51, (9), 2017, 4821-4830.
25. Fennel D.E., Gossett J.M., *Microcosms for site-specific evaluation of enhanced biological reductive dehalogenation*, 15, 2003, 385-394, [w:] Haggblom M.M., Bossert I.D., *Dehalogenation: Microbial Processes and Environmental Applications*, 116-157, Kluwer Academic, Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2003.
26. Reineke W., Mandt C., Kaschabek S.R., Pieper D.H., *Chlorinated Hydrocarbon Metabolism*, [w:] eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2011.
27. Bombach P., Richnow H.H., Kastner M., Fischer A., *Current approaches for the assessment of in situ biodegradation*, Applied Microbiology and Biotechnology, 86, 2010, 839-852.

### **Zastosowanie procesów mikrobiologicznej dehalogenacji związków organicznych w inżynierii środowiska**

#### **Streszczenie**

Wytwarzane przez człowieka halogenowane związki organiczne (HZO) coraz częściej ulegają uwalnianiu do środowiska, powodując jego zanieczyszczenie. HZO są substancjami toksycznymi, o kancerogennym, teratogennym wpływie na organizmy, akumulującymi się w środowisku, tkankach tłuszczowych człowieka i zwierząt stałocieplnych oraz opornymi na degradację. Niezwykle istotne jest sprawowanie kontroli nad uwalnianiem i rozprzestrzenianiem się tych związków, a także stworzenie optymalnych systemów oczyszczania skażonych terenów. Obiecującymi metodami remediacji wydają się być biologiczne metody usuwania HZO. Wykorzystują one aktywność metaboliczną mikroorganizmów, zdolnych do biotransformacji HZO do mniej toksycznych lub neutralnych produktów, jak również ich wysoką tolerancję wobec szkodliwych substancji oraz umiejętność przystosowania się do ekstremalnych środowisk. Praca stanowi przegląd literatury obejmujący procesy bioremediacyjne w kontekście usuwania HZO.

Słowa kluczowe: bioremediacja, halogenowane związki organiczne, mikroorganizmy, biotransformacja

### **Application of microbial dehalogenation processes of organic compounds in environmental engineering**

#### **Abstract**

Manufactured of halogenated organic compounds (HZO) by humans in an increasing amount are more often released into the environment, causing its contamination. HZO are toxic substances with carcinogenic and teratogenic effects on organisms, accumulating in environment, and in human and warm-blooded fatty tissues, and resistant to degradation. It is extremely important to control the release and spread of these compounds, as well as to create optimal systems for cleaning contaminated sites. Promising methods of remediation are biological approach of removing HZO. They use the metabolic activity of microorganisms (endogenous or exogenous) capable to biotransformation of HZO to less toxic or neutral products, as well as their high tolerance to hazardous substances and the ability to adapt to extreme environments. The work is a literature review covering bioremediation processes in the context of HZO removal.

Keywords: bioremediation, halogenated organic compounds, microorganisms, biotransformation



## Mikrobiologiczne procesy dehalogenacji związków organicznych

### 1. Wstęp

Halogenowane związki organiczne (HZO) powstają na skutek przyłączenia grupy halogenowej, którą stanowią pierwiastki wchodzące w skład 17. grupy układu okresowego (głównie fluor, chlor, brom i jod) z węglem organicznym. Przyłączenie podstawnika halogenowego do związku organicznego zmienia znacząco jego właściwości fizyczne i chemiczne, np.: powodując zmniejszenie rozpuszczalności w wodzie, przy jednoczesnym wzroście rozpuszczalności w tłuszczach, co wpływa na ograniczenie biodostępności takich cząsteczek i znacząco zmniejsza poziom ich biodegradacji. Zwiększa to ryzyko ich odkładania w głównej mierze w tkankach tłuszczowych zwierząt wyższych i człowieka oraz może zwiększać toksyczność węglowodoru w stosunku do organizmów. Zwykle obserwowany jest wzrost toksyczności związku organicznego wraz ze wzrostem ilości podstawników halogenowych. Związki te charakteryzują się ponadto wysokim stopniem trwałości i akumulacji w środowisku, a także teratogennością i kancerogennością. Konwencja Sztokholmska [1] wymienia 23 trwale zanieczyszczenia organiczne (ang. *persistent organic pollutants* – POPs), są definiowane jako niebezpieczne, trwałe substancje chemiczne, odporne na transformacje i degradacje, akumulujące w środowisku i tkankach tłuszczowych, o toksycznym wpływie na organizmy w tym człowieka. Wszystkie spośród 23 wymienionych w Konwencji Sztokholmskiej związków są związkami halogenoorganicznymi.

Związki organiczne o właściwościach halogenowych znalazły szerokie zastosowanie w przemyśle i rolnictwie. Wykorzystywane są do produkcji rozpuszczalników, chłodziw, tworzyw sztucznych, farb, antybiotyków, farmaceutyków, biocydów i niektórych środków ochrony roślin. Niestety szybkie tempo rozwoju przemysłu, a także intensywny system produkcji rolnej wprowadza do środowiska coraz większe ilości halogenowanych związków organicznych, powodując lokalne zanieczyszczenia, stanowiące zagrożenie dla organizmów i problem dla środowiska [2-5].

Do niedawna uważano również, że halogenowane węglowodory aromatyczne są ksenobiotykami, dziś wiadomo, że mogą być pochodzenia naturalnego [8]. Halogenowe związki organiczne były obecne na Ziemi przed pojawieniem się człowieka nie stanowiąc wówczas poważnego zagrożenia dla ekosystemów oraz powłoki ozonowej. Obecnie poznanych zostało około 5000 HZO naturalnego pochodzenia, choć badacze szacują, że jest ich znacznie więcej, a około 200 nowych związków jest odkrywanych każdego roku [6, 7]. Do niedawna również uważano, że halogenowane węglowodory aromatyczne są ksenobiotykami, dziś wiadomo, że mogą być pochodzenia naturalnego [8].

---

<sup>1</sup> Zakład Biologii, Wydział Instalacji Budowlanych, Hydrotechniki i Inżynierii Środowiska, Politechnika Warszawska, ul. Nowowiejska 20, 00-653 Warszawa.

Najliczniej występującymi w środowisku naturalnym związkami halogenoorganicznymi są te zawierające chlor i brom, a w mniejszej ilości jod. Najmniej licznie reprezentowane są HZO zawierające fluor. Pochodzenie naturalnych HZO związane jest z przemianami geochemicznymi związanymi z wysoką temperaturą oraz podwyższonym ciśnieniem, a zatem na skutek erupcji wulkanów, pożarów lasów oraz spalania biomasy zawierającej nieorganiczne związki chloru, bromu, fluoru czy jodu, które w takich warunkach mogą łączyć się ze związkiem organicznym tworząc jego halogenową pochodną [2, 9]. HZO mogą być także produkowane przez najróżniejsze organizmy, jak np.: bakterie, grzyby, gąbki, porosty, glony, rośliny, mięczaki, meduzy, owady czy ssaki [10, 11, 12]. I tak na przykład szacuje się, że roczna produkcja bromometanu w oceanach to około 56 tys. ton, a bromoformu 1-2 milionów ton. Pożary biomasy emitują od 20 tys. do 50 tys. ton bromometanu rocznie [13], podczas gdy całkowita produkcja przemysłowa bromometanu w 1990 wynosiła ok. 66 tys. ton. Według Haggblom i Bossert [2003] naturalna produkcja chlorometanu wynosi rocznie nawet do 8 milionów ton, co przewyższa stukrotnie ilość przemysłowo syntetyzowanego związku. Przykładowe ilości produkowanych przez człowieka HZO przedstawia tabela 1.

Tabela 1. Roczna produkcja wybranych halogenowanych związków organicznych.

Związek	Ilość [tony]	Rok	Kraj	Źródło
<b>chloroeten</b> (chlorek winylu)	62 mln	2016	świat	[17]
<b>chloroform</b> (trichlorometan)	254 000	1994	USA	[17]
<b>1,2-dichloroeten</b>	8 mln	1993	USA	[16]
<b>chlorometan</b>	358 000	1993	USA	[16]
<b>1,1,1-trichloroetan</b>	205 000	1993	USA	[16]
<b>dichloroetan</b>	160 000	1993	USA	[16]
<b>tetrachlorometan</b>	140 000	1991	USA	[16]
<b>tetrachloroeten</b>	125 000	1993	USA	[16]
<b>chloroetan</b>	70 000	1990	USA	[16]
<b>DDT</b>	3772	2014	świat	[18]

Produkowanymi przez organizmy HZO są np.: metabolity, hormony (np.: trijodotyronina, tyroksyna), antybiotyki (np.: chloramfenikol, chlorotetracyklina), biocydy. Głównym celem ich produkcji przez organizmy ma być ochrona przed drapieżnikami i obrastaniem przez inne osobniki. Wciąż jednak funkcje wielu naturalnych HZO pozostają nieznane [12-15].

Wprowadzane do środowiska przez człowieka związki halogenoorganiczne są trudno degradowalne i akumulują, w znacznej mierze w środowisku beztlenowym, w którym ich rozkład jest jeszcze trudniejszy. Obserwuje się, że im wyższa ilość przyłączonych grup halogenowych, tym niższa podatność na tlenową degradację takich związków [16].

Zwiększenie ilości halogenowanych związków organicznych wprowadzanych jako zanieczyszczenia do środowiska i ich kumulowanie się w organizmach żywych powoduje coraz poważniejsze zagrożenie dla życia i zdrowia człowieka i zaburzenia w naturalnym funkcjonowaniu ekosystemów lądowych i wodnych. Wraz z postępującym zagrożeniem pojawiła się potrzeba poznania mechanizmów oddziaływania tych związków na środowisko i metod ich usuwania, w tym możliwości ich rozkładu w warunkach naturalnych. Niniejsza praca obejmuje przegląd danych dotyczących mechanizmu procesów dehalogenacji halogenowanych związków organicznych

## **2. Przemiany HZO w środowisku**

Przemiany abiotyczne halogenowanych związków organicznych zachodzą pod wpływem procesów fizyczno-chemicznych tj.: takie jak utlenianie, hydroliza oraz transformacje fotochemiczne i chemiczne [19, 20].

W procesach przemian HZO do mniej toksycznych produktów, a w rezultacie do ich całkowitej mineralizacji, bardzo ważną funkcję pełnią mikroorganizmy. Biodegradacja naturalnego pochodzenia HZO nie przysparza drobnoustrojom większych trudności, w toku ewolucji wykształciły one odpowiednie szlaki metaboliczne ich rozkładu. Inaczej jednak wygląda ten proces w przypadku dehalogenacji związków pochodzenia antropogenicznego, które są bardzo odporne na biodegradacyjne działanie mikroorganizmów [21]. Przyczyny tego zjawiska naukowcy upatrują w zbyt krótkim czasie adaptacji mikroorganizmów do nowopowstałych związków, nieobecnych wcześniej w środowisku naturalnym. Drobnoustroje nie zdążyły wykształcić specyficznych mechanizmów, szlaków metabolicznych prowadzących do transformacji i degradacji syntetycznych halogenowych związków organicznych. Najczęściej umiejętność mikrobów do degradacji ksenobiotycznych HZO wynika z przemian, w których biorą udział enzymy i metabolity produkowane przez mikroorganizmy do przeprowadzenia zupełnie innych procesów w ich komórkach lub też na drodze podobieństwa HZO do naturalnie występujących w środowisku związków rozkładanych na drodze szeregu reakcji wchodzących w skład istniejących już szlaków metabolicznych. Taki proces biodegradacji nazywany jest kometabolizmem. Do biodegradacji HZO może również dochodzić dzięki zajściu mutacji efektem czego organizmy nabywają zdolności do dehalogenowania nowych związków organicznych. Mikrobiologiczna dehalogenacja oparta jest na wykorzystaniu przez mikroorganizm HZO jako źródła węgla i energii. Proces dehalogenacji jest zatem wstępnym etapem umożliwiającym enzymatyczne rozerwanie szkieletu węglowego, prowadzące do pozyskania węgla. Halogenowany związek organiczny może stanowić również alternatywny akceptor elektronów w procesie oddychania beztlenowego, wówczas proces taki nazywany jest dehalorespiracją, w rezultacie której mikroorganizmy wytwarzają energię. Dehalogenacja może stanowić także mechanizm obronny mikroorganizmów, prowadzący do detoksykacji związku i zmniejszenia jego toksyczności, ale wówczas nie dostarcza on energii, ani węgla [16, 22-24]. Wykorzystanie mechanizmów transformacji organohalogenków przez drobnoustroje zależy od struktury związku, jego właściwości, potencjału redoks, czy rodzaju donorów i akceptorów elektronów obecnych w środowisku [16].

## 2.1. Metabolizm halogenowych związków organicznych

HZO naturalnego pochodzenia, takie jak chlorometan, chlorooctan, chlorobenzoesan, chlorofenol mogą stanowić substrat odżywczy dla mikroorganizmów i tym samym być przez nie metabolizowane w warunkach tlenowych. Inaczej sytuacja wygląda w przypadku syntetycznych HZO, takich jak perchloroetylen (PCE), heksachlorobenzen (HCB), pentachlorofenol (PCP), polichlorowane bifenyle (PCBs), polihalogenowane dioksyny. Związki te wykazują oporność na dehalogenację w warunkach tlenowych i są metabolizowane jedynie w środowisku braku dostępu tlenu na drodze dehalorespiracji [16, 24].

Do dehalogenacji organohalogenków przystosowanych jest wiele organizmów, np.: bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Ralstonia*, *Flavobacterium*, *Nocardioides*, *Bradyrhizobium*, *Ochrobactrum*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas*, *Dehalobacterium*, *Acetobacterium*, *Dehalospirillum*, *Desulfomonile* i wiele innych [25] oraz grzyby, głównie wymieniane są w literaturze tzw.: grzyby białej zgnilizny (ang. *white rot fungi*), np.: *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Panus tigrinus* [20]. Dehalogenacja najczęściej odbywa na drodze reakcji rozerwania wiązania węgiel-grupa halogenowa katalizowanej przez specyficzny enzym.

## 2.2. Mechanizmy dehalogenacji

Wiele enzymów zaangażowanych w procesy dehalogenacji zostały zidentyfikowane wraz z opisem ich struktur krystalograficznych, co pozwoliło zaobserwować miejsca wiązania halogenku w enzymie prowadzące do katalizowania reakcji dehalogenacji poprzez stabilizację ładunku ujemnego, skutkując rozerwaniem wiązania węgiel-halogen. Głównymi typami reakcji katalizowanych przez odpowiednie tlenowe dehalogenazy są: podstawienie, utlenienie, dehydrogenacja i eliminacja, przy czym reakcje utleniania i redukcji mogą angażować enzymy, których udział bezpośrednio nie prowadzi do rozerwania wiązania węgiel – halogen. Udział tych enzymów natomiast doprowadza do osłabienia wiązania, które na drodze kolejnych już reakcji, samoistnie ulega rozerwaniu doprowadzając do dehalogenacji związku [24, 26, 27].

### 2.2.1. Dehalogenacja substytucyjna

#### 2.2.1.1. Dehalogenacja hydrolityczna

Hydrolityczne dehalogenazy stanowią najliczniejszą grupę opisanych dehalogenaz. Enzymy te katalizują reakcje dehalogenacji związków alifatycznych, heterocyklicznych oraz aromatycznych. Najlepiej zbadanym przykładem hydrolitycznej dehalogenazy jest haloalkanowa dehalogenaza pochodząca z *Xanthobacter autotrophicus* GJ10, bakterii zdolnej do degradacji 1,2-dichloroetanu. Wśród mikroorganizmów produkujących hydrolityczne dehalogenazy można wyróżnić również gatunki należące do rodzajów: *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Nocardia*, *Corynebacterium* oraz *Rhodococcus corallinus*, *Sphingomonas chlorophenolica* [26]. Mechanizm reakcji katalizowanej przez ten enzym został dokładnie zbadany i opisany dzięki wykorzystaniu wyników analizy krystalografii rentgenowskiej i ukierunkowanej mutageniezie. Na

drodze reakcji hydrolitycznej dehalogenacji grupa halogenowa jest podstawiana grupą hydroksylową pochodzącą z wody [28]. Rzecz wygląda nieco inaczej w przypadku związków aromatycznych, gdzie dehalogenacja następuje kilkietapowo. Transformacja halobenzoesanu do hydroksybenzoesanu, wymaga udziału trzech enzymów katalizujących trzy następujące po sobie reakcje. Konwersję halobenzoesanu do halobenzoilo-CoA katalizuje odpowiednia ligaza halobenzoeso-CoA, konwersję halobenzoilo-CoA do hydroksybenzoilo-CoA katalizuje dehalogenaza halobenzoilo-CoA, a hydroksybenzoilo-CoA do hydroksybenzoesanu odpowiednia tioesteraza hydroksybenzoilo-CoA. Rodzaj enzymu zależy od grupy halogenowej przyłączonej do pierścienia oraz od miejsca jego podstawienia [26, 29].

### 2.2.1.2. Dehalogenacja tiolityczna

Dehalogenacja tiolityczna jest katalizowana przez indukowaną odpowiednią dehalogenazę należącą do klasy glutationowej S-transferazę, w wyniku czego ulega uwolnieniu grupa halogenowa oraz powstaje nietrwały i niestabilny S-halometyloglutation, który ulega hydrolizie, tworząc halogen, glutation i formaldehyd. Mikroorganizmami, u których zaobserwowano ten typ reakcji są np.: *Hyphomicrobium sp.* oraz *Methylophilus sp.* [26, 27, 30].

### 2.2.1.3. Dehalogenacja przez substytucję wewnątrzcząsteczkową

Dehalogenazy haloalkoholowe (występujące również pod nazwą dehalogenazy halohydrynowej, liazy halohydrynowej halogeno-wodorowej) katalizują reakcje wewnątrzcząsteczkowego podstawienia chlorowca grupą hydroksylową w halogenowanych alkoholach i ketonach z wytworzeniem produktu przejściowego – epoksydu. Mikroorganizmami wytwarzającymi haloalkoholowe dehalogenazy są m.in.: *Pseudomonas sp.*, *Arthrobacter sp.*, oraz bakterie z rodzaju *Corynebacterium* [28, 31].

### 2.2.2. Dehydrohalogenacja

Na drodze dehydrohalogenacji z udziałem odpowiednich dehydrohalogenaz jest usuwany kwas halogenowodorowy (np.: HCl, HBr), prowadząc do powstania w związku organicznym wiązania podwójnego. Przykładem dehydrohalogenacji z udziałem dehydrohalogenazy może być dehalogenacja  $\gamma$ -heksachlorocykloeksanu [27].

### 2.2.3. Dehalogenacja oksydacyjna

Dehalogenacja oksydacyjna ma duże znaczenie w procesie biologicznej degradacji wszelkich związków halogenowanych, zarówno alifatycznych, jak i aromatycznych. Kooksydacja wielu organohalogenków zachodzi z udziałem odpowiednich mono- i dioksygenaz produkowanych m.in. przez bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Alcaligenes*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*. Udział oksygenaz w procesie odłączenia grupy halogenowej polega na utworzeniu niestabilnego związku, np.: epoksydu, który w kolejnym etapie ulega samoistnemu rozpadowi z uwolnieniem jonu halogenowego. Procesy kooksydacji nie przynoszą komórce żadnych korzyści, HZO współzawodniczą z substratami odżywczymi o miejsce aktywne w oksygenazie. Oksygenazy mogą aktywnie dehalogenować związki organiczne w warunkach tlenowych na drodze opisanej powyżej oraz w warunkach beztlenowych, wówczas jednak do rozerwania wiązania węgiel-halogen dochodzi w procesie redukcyjnej dehalogenacji [32, 33].

## 2.2.4. Dehalogenacja przez transfer grupy metylowej

W procesie transferu grupy metylowej z cząsteczki chlorometanu uczestniczy dehalogenaza chlorometanowa, indukowana obecnością chlorometanu. Grupa metylowa z chlorometanu zostaje przeniesiona na tetrahydrofolian, w rezultacie powstaje metylo-tetrahydrofolian i jon chlorkowy. Metylo-tetrahydrofolian jest degradowany do octanu. Dehalogenaza chlorometanowa zbudowana jest z czterech białek, z czego jedno niesie kofaktor korenoidowy, w którym zredukowany atom kobaltu (I) stanowi akceptor grupy metylowej. Tworzony jest korenoid metylokobaltu (III), który stanowi donor grupy metylowej dla metylotransferazy, wytwarzając chlorometylo-tetrahydrofolian, rozpadający się dalej spontanicznie na jon chlorkowy i metylo-tetrahydrofolian. Dalszy metabolizm metylo-tetrahydrofolianu do octanu przebiega poprzez reakcje szlaku acetylo-CoA. Dehalogenacja przez transfer grupy metylowej została zaobserwowana u bakterii tlenowych i ściśle beztlenowych wykorzystujących chlorometan i dichlorometan jako jedyne źródło węgla [26, 34, 35].

## 2.2.5. Redukcyjna dehalogenacja

Proces redukcyjnej dehalogenacji odgrywa znaczącą rolę w procesie dehalogenacji poli-halogenowanych związków organicznych, wykazujących najwyższy stopień trwałości, akumulacji w środowisku oraz wyzwanie w bioremediacji.

### 2.2.5.1. Kometaboliczna redukcyjna dehalogenacja

Wiele badań nad procesami degradacji HZO dowiodło powszechności wykorzystywania redukcyjnej dehalogenacji przez bakterie fakultatywnie i ściśle beztlenowe. Wiele gatunków spośród bakterii matanogennych, redukujących siarczany i redukujących żelazo prezentuje zdolność do kometabolicznej redukcyjnej dehalogenacji, nieprzynoszącej komórce żadnych korzyści [36]. W procesie biorą udział związane z białkiem kofaktory tetrapirolowe, takie jak porfiryny żelaza (II), korynoidy, czynnik F<sub>430</sub> oraz kompleksy flawoproteinowo-flawinowe, czy ferredoksyna. I tak na przykład Cob(I)alamina (witamina B12) i czynnik F<sub>430</sub> pośredniczą w redukcyjnej dehalogenacji pentachloroetyleny do etenu. Donorami elektronów niezbędnymi do aktywności enzymów są metabolity komórkowe. Również cytochromy typu c (np.: cytochrom P<sub>450-cam</sub>) wytwarzane podczas wzrostu mikroaerofilnego są zaangażowane w reakcje redukcyjnego odłączania chloru [37-39]. Wśród mikroorganizmów prowadzących kometaboliczną redukcyjną dehalogenację można wymienić *Clostridium bifermentans* szczep DPH-1, *Shewanella putrefaciens*, *Methanosarcina thermophila*, *Escherichia coli* czy *Pseudomonas putida* [26].

### 2.2.5.2. Redukcyjna dehalogenacja w warunkach tlenowych

Redukcyjne reakcje dehalogenacji nie ograniczają się wyłącznie do warunków beztlenowych, mogą zachodzić również w warunkach tlenowych. Dzięki redukcyjnej dehalogenacji dochodzi do asymilacji odpowiednich kwasów karboksylowych przez bakterie. I tak na przykład zależna od glutationu dehalogenaza tetrachlorohydrochinonowa katalizuje reakcję redukcyjnej dehalogenacji tetrachloro-p-hydrochinonu do trichlorohydrochinonu, a następnie dichlorohydrochinonu. Wymieniona zależna od glutationu redukcyjna dehalogenaza katalizuje również degradację  $\gamma$ -heksachlo-

rocykloheksanu. *Azotobacter chroococcum* MSB-1 jest zdolny do degradacji herbicydu kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego jako jedynego źródła węgla na drodze redukcyjnej dehalogenacji do kwasu 4-chlorofenoksyoctowego [27, 40].

### 2.2.5.3. Dehalorespiracja – redukcyjna dehalogenacja w warunkach beztlenowych

W redukcyjnej dehalogenacji, prowadzonej przez bakterie w warunkach beztlenowych, odłączenie grupy halogenowej od związku organicznego jest związane z metabolizmem energetycznym komórki. HZO, takie jak, pentachlorofenol, tetrachloroeten, trichloroeten stanowią ostateczny akceptor elektronów, natomiast H<sub>2</sub> lub związek organiczny np.: octan, mrówczan czy fumaran stanowią donor elektronów w procesach oddechowych [41]. Bakteryjne enzymy – redukcyjne dehalogenazy – katalizują proces, pośredniczą w przekazywaniu elektronów z donora elektronów na HZO, będący ich akceptorem. Jest to możliwe dzięki specyficznej budowie enzymu. Redukcyjna dehalogenaza tetrachloroetenowa pochodząca z *Dehalobacter multivorans* zawiera w swej strukturze korynoid stanowiący prawdopodobnie miejsce aktywne enzymu, żelazo oraz kwasowo labilną siarkę, natomiast ten sam enzym pochodząca z *Dehalobacter restrictus*, zawiera żelazowo-siarkowy klaster oraz kobalaminę stanowiącą miejsce aktywne enzymu. Oba enzymy związane są z błoną komórkową. Korynoid, klaster Fe-S oraz kobalamina znane są jako przenośniki elektronów. U *D. multivorans* i *D. restrictus* hydrogenaza związana z błoną komórkową dostarcza elektrony pochodzące z wodoru (z każdej cząsteczki H<sub>2</sub> dostarczane są przez hydrogenazę dwa elektrony) na redukcyjną dehalogenazę tetrachloroetenową, która u *D. restrictus* związana jest z błoną komórkową natomiast u *D. multivorans* znajduje się w cytoplazmie. Dwa protony wodorowe powstałe na skutek aktywności hydrogenazy zostają uwolnione na zewnątrz błony komórkowej, redukcja tetrachloroetenu następuje wewnątrz komórki zużywając jeden proton wodorowy na uwolnienie jednego atomu jonu chlorowego. Powstały gradient elektrochemiczny generuje syntezę ATP w komórce [42, 43].

## 3. Podsumowanie

Postępujący rozwój gospodarczy spowodował zwiększenie różnorodności i ilości halogenowanych związków organicznych wprowadzanych jako zanieczyszczenia do środowiska. Związki te mogą pozostawać w środowisku i kumulować się w organizmach, powodując coraz poważniejsze zagrożenie dla życia i zdrowia człowieka i zaburzenia w naturalnym funkcjonowaniu ekosystemów lądowych i wodnych. Wraz z postępującym zagrożeniem pojawiła się potrzeba poznania mechanizmów oddziaływania tych związków na środowisko, ich kumulacji i możliwości ich rozkładu w warunkach naturalnych. Kluczem do skutecznego oczyszczenia i przywrócenia środowisku naturalnemu równowagi sprzed ingerencji człowieka jest jednak dokładne zbadanie procesów dehalogenacji, zależności pomiędzy nimi a czynnikami abiotycznymi, jak np.: obecnością akceptorów i donorów elektronów czy potencjałem redoks. Niniejsza praca zawiera przegląd literaturowy dotyczący mechanizmu procesów dehalogenacji halogenowanych związków organicznych.

## Literatura

1. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs), United Nations Environment Programme. Stockholm, 22 May 2001, [https://www.chemsafetypro.com/Topics/Convention/Stockholm\\_Convention\\_on\\_Persistent\\_Organic\\_Pollutants\\_POPs.html](https://www.chemsafetypro.com/Topics/Convention/Stockholm_Convention_on_Persistent_Organic_Pollutants_POPs.html).
2. Gribble G.W., *The natural production of chlorinated compounds*, Environmental Science Technology, 28 (7), 1994, 310-319.
3. Song B., Palleroni N.J., Haggblom M.M., *Isolation and characterization of diverse halobenzoate-degrading denitrifying bacteria from soils and sediments*, Applied Environmental Microbiology, 66 (8), 2000, 3446-3453.
4. Rubilar O., Diez M.C., Gianfreda L., *Transformation of Chlorinated Phenolic Compounds by White Rot Fungi*, Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 38, 2008, 227-268.
5. Adrian L., Löffler F.E., *Organohalide-Respiring Bacteria*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2016, 52-55.
6. Gribble G.W., *Natural organohalogenes*, Science dossier, Eurochlor 17, 2004.
7. Gribble G.W., *Naturally occurring organohalogen compounds – a comprehensive update*, Progress in the chemistry of organic natural products, 91, 2010, 1-613.
8. Gribble G.W., *Naturally occurring organohalogen compounds a survey*, Journal of Natural Products (Lloydia), 55, 1992, 1353-1395.
9. Jordan A., Harnisch J., Borchers R., Le Guern F., Shinohara H., *Volcanogenic halocarbons*, Environmental Science Technology, 34, 2000, 1122-1124.
10. Oberg G., *Chloride and organic chlorine in soil*, Acta Hydrochimica et Hydrobiologica, 26, 1998, 137-144.
11. Hoekstra E.J., de Weerd H., de Leer E.W.B., Brinkman U.A.T., *Natural formation of chlorinated phenols, dibenzo-p-dioxins and dibenzo furans in soil of Douglas fir forest*, Environmental Science Technology, 33m, 1999, 2543-2549.
12. Gribble G.W., *A recent survey of naturally occurring organohalogen compounds*, Environmental Chemistry, 12, 2015, 396-405.
13. Gribble G.W., *The diversity of naturally occurring organobromine compounds*, Chemical Society Reviews, 28, 1999, 335-346.
14. Gribble G.W., *Recently discovered naturally occurring heterocyclic organohalogen compounds*, Heterocycles, 84, 2012, 157-207.
15. Agarwal V., Miles Z.D., Winter J.M., Eustaquio A.S., El Gamal A.A., Moore B.S., *Enzymatic Halogenation and Dehalogenation Reactions: Pervasive and Mechanistically Diverse*. Chemical Reviews, 117, 2017, 5619-5674.
16. Haggblom M.M., Bossert I.D., *Dehalogenation: Microbial Processes and Environmental Applications*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2003.
17. Schellerer K.M., Kufner T., Mieden O., Vogel E., *Polyvinyl chloride (PVC)*, Kunststoffe International, 10, 2016, 28-32.
18. van den Berg H., Manuweera G., Konradsen F., *Global trends in the production and use of DDT for control of malaria and other vector-borne diseases*, Malaria Journal, 16, 2017, 401.
19. Schecter A., Gasiewicz T.A., *Dioxins and health*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2003.
20. Rubilar O., Diez M.C., Gianfreda L., *Transformation of Chlorinated Phenolic Compounds by White Rot Fungi*, Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 38, 2008, 227-268.
21. Satpathy R., Konkimalla V.B., Ratha J., *Microbial Dehalogenation: 3-Chloropropanoic Acid (3-CPA) Degradation as a Case Study*, Microbiology, 86 (1), 2017, 32-41.



22. Hug L.A., Edwards E.A., *Diversity of reductive dehalogenase genes from environmental samples and enrichment cultures identified with degenerate primer PCR screens*, *Frontiers in Microbiology*, 4, 2013, 341.
23. Hug L.A., Maphosa F., Leys D., Löffler F.E., Smidt H., Edwards E.A., Adrian L., *Overview of organohalide-respiring bacteria and a proposal for a classification system for reductive dehalogenases*, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biology Science*, 368, 2013, 20120322.
24. Atashgahi S., Haggblom M.M., Smidt H., *Organohalide respiration in pristine environments: implications for the natural halogen cycle*, *Environmental microbiology*, 20 (3), 2018, 934-948.
25. Löffler F.E., Cole J.R., Ritalahti K.M., Tiedje J.M., *Diversity of dechlorinating bacteria*, [w:] *Haggblom M.M., Bossert I.D., Dehalogenation: Microbial Processes and Environmental Applications*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2003.
26. Fetzner S., *Bacterial dehalogenation*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, 1998, 633-657.
27. van Pee K.H., Unversucht S., *Biological dehalogenation and halogenation reactions*, *Chemosphere*, 52, 2003, 299-312.
28. Slater J.H., Bull A.T., Hardman D.J., *Microbial dehalogenation of halogenated alkanoids, alcohols and alkanes*, *Advances in Microbial Physiology*, 38, 1997, 133-176.
29. Luo L., Taylor K.L., Xiang H., Wie Y., Zhang W., Dunaway-Mariano D., *Role of active site binding interactions in 4-chlorobenzoyl-coenzyme A dehalogenase catalysis*, *Biochemistry*, 40, 2001, 15684-15692.
30. Gisi D., Willi L., Traber H., Leisinger T., Vuilleumier S., *Effects of bacterial host and dichloromethane dehalogenase on the competitiveness of methylotrophic bacteria growing with dichloromethane*, *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1998, 1194-1202.
31. Wijngaard A.J. van den, Janssen D.B., Witholt B., *Degradation of epichlorohydrin and halohydrins by bacterial cultures isolated from freshwater sediment*, *Journal of General Microbiology*, 135, 1989, 2199-2208.
32. Koe G.S., Vilker V.L., *Dehalogenation by cytochrome P-450cam: effect of oxygen level on the decomposition of 1,2-di-bromo-3-chloropropane*, *Biotechnol Progress*, 9, 1993, 608-614.
33. Fetzner S., Lingens F., *Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics, and biotechnological applications*, *Microbiology Review.*, 58(4), 1994, 641-685.
34. Meßmer M., Reinhardt S., Wohlfarth G., Diekert G., *Studies on methyl chloride dehalogenase and O-demethylase in cell extracts of the homoacetogen strain MC based on a newly developed coupled enzyme assay*, *Archives of Microbiology*, 165, 1996, 18-25.
35. Coulter C., Hamilton J.T.G., McRoberts W.C., Kulakov L., Larkin M.J., Harper D.B., *Halomethane:bisulfide/halide ion methyltransferase, an unusual corrinoid enzyme of environmental significance isolated from an aerobic methylotroph using chloromethane as the sole carbon source*, *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1999, 4301-4312.
36. Adrian N.R., Sulfito J.M., *Anaerobic biodegradation of halogenated and nonhalogenated N-, S-, and O- heterocyclic compounds in aquifer slurries*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13, 1994, 1551-1557.
37. Holliger C., Regeard C., Diekert G., *Dehalogenation by anaerobic bacteria*, [w:] *Haggblom M.M., Bossert I.D. Dehalogenation: Microbial Processes and Environmental Applications*. 116-157. Dordrecht, The Netherlands. Kluwer Academic, Publishers, 2003.
38. Fincker M., Spormann A.M., *Biochemistry of catabolic reductive dehalogenation*, *Annual Review of Biochemistry*, 86, 2017, 357-386.
39. Moe W.M., Rainey F.A., Yan J., *The genus Dehalogenimonas in Organohalide-Respiring Bacteria*, eds L. Adrian and F. E. Löffler (Berlin: Springer), 2016, 137-151.

40. Schuhmacher W., Holliger C., Zehnder A.J.B., Hagen W.R., *Redox chemistry of cobalamin and iron–sulfur cofactors in the tetrachloroethene reductase of Dehalobacter restrictus*, FEBS Letters, 409, 1997, 421-425.
41. Cole J.R., Cascarelli A.L., Mohn W.W., Tiedje J.M., *Isolation and characterization of a novel bacterium growing via reductive dehalogenation of 2-chlorophenol*, Applied and Environmental Microbiology, 60, 1994, 3536-3542.
42. Holliger C., Schumacher W., *Reductive dehalogenation as a respiratory process*, Antonie van Leeuwenhoek, 66, 1994, 239-246.
43. Holliger C., Hahn D., Harmsen H., Ludwig W., Schumacher W., Tindall B., Vazquez F., Weiss N., Zehnder A.J.B., *De-halobacter restrictus gen. nov. and sp. nov., a strictly anaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetra- and trichloro- ethene in an anaerobic respiration*, Archives of Microbiology, 169, 1998, 313-321.

### **Mikrobiologiczne procesy dehalogenacji związków organicznych**

#### Streszczenie

Halogenowane związki organiczne (HZO) stanowią szeroko rozpowszechnioną, toksyczną, kancerogenną grupę związków chemicznych. Wraz z rozwijającym się przemysłem i rolnictwem produkowane są w coraz większej ilości. Przyczynia się to do ich uwalniania do środowiska skutkującym jego zanieczyszczeniem. Ze względu na negatywny wpływ tych substancji na całe ekosystemy oraz człowieka, niezwykle istotne jest ograniczenie rozprzestrzeniania się chemikaliów oraz oczyszczenie miejsc objętych skażeniem. W rozwiązaniu tego problemu mogą posłużyć drobnoustroje – kluczowe ogniwo w procesach transformacji i degradacji HZO. Mikroorganizmy wykształciły wiele mechanizmów i strategii prowadzących do przekształcenia HZO w produkty mniej toksyczne lub neutralne. Potrafią wykorzystywać te niebezpieczne substancje jako źródło węgla i energii. Niniejsza praca stanowi przegląd bakteryjnych mechanizmów transformacji halogenowanych związków organicznych.

Słowa kluczowe: Halogenowane związki organiczne, mikroorganizmy, biotransformacja, biodegradacja

### **Microbial processes of dehalogenation of organic compounds**

#### Abstract

Halogenated organic compounds (HZO) are a widespread, toxic, carcinogenic group of chemical compounds. Together with the developing industry and agriculture, they are produced in increasing amounts. This contributes to their release into the environment resulting in its pollution. Due to the negative impact of these substances on entire ecosystems and humans, it is extremely important to limit the spread of chemicals and to clean up the places affected by contamination. The problem can be solved by microorganisms – a key link in the processes of transformation and degradation of HZO. Microorganisms have developed many mechanisms and strategies leading to the transformation of HZO into less toxic or neutral products. They can use these hazardous substances as a source of carbon and energy. This work is a review of bacterial mechanisms of transformation of halogenated organic compounds.

Keywords: Halogenated organic compounds, microorganisms, biotransformation, biodegradation

## Czynniki wirulencji bakterii z rodzaju *Aeromonas* sp. izolowanych od ryb

### 1. Bakterie z rodzaju *Aeromonas* sp.

#### 1.1. Wprowadzenie

Bakterie z rodzaju *Aeromonas* to Gram-ujemne, fakultatywnie beztlenowe, niewytwarzające przetrwalników heterotroficzne pałeczki. Powszechnym miejscem ich bytowania jest środowisko wodne, gdzie tworzą autochtoniczną mikrobiotę. Mogą przeżywać i namnażać się w wodzie o temperaturze od -2 do +10°C [1], jednak preferują środowiska o podwyższonej temperaturze [2]. Pałeczki *Aeromonas* występują także w glebie [3, 4], mięsie, warzywach, rybach, owocach morza i przetworzonej żywności [2]. Ze względu na zdolność do adhezji i tworzenia biofilmu m.in. w systemach dystrybucji wody mogą być przyczyną wtórnego zanieczyszczenia wody pitnej, czyli tzw. regrowth [3, 4]. W porównaniu do innych bakterii Gram-ujemnych *Aeromonas* cechują się większą zdolnością do wykorzystywania związków węgla. Ich wzrost w środowisku wodnym następuje nawet w obecności niewielkiej ilości biodegradowalnych, rozpuszczonych związków węgla organicznego [1].

Pałeczki *Aeromonas* są głównie patogenami zwierząt zmiennocieplnych: ryb, płazów i gadów, ale także stałocieplnych oraz człowieka, dla którego źródłem zakażenia są zwierzęta, żywność lub zanieczyszczona woda [5].

Wśród tych bakterii najczęściej wyodrębnia się dwie grupy: gatunki nieruchliwe i psychrofilne np. *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* i *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* oraz gatunki ruchliwe i mezofilne, do których zalicza się m.in.: *A. hydrophila*, *A. caviae* i *A. sobria* [2]. Ruchliwe pałeczki posiadają dwa typy urzęsienia: polarne i peritrichalne. Pierwszy umożliwia im ruch w środowisku płynnym, drugi jest wytwarzany w specyficznych warunkach i zwiększa zdolności adhezyjne oraz zdolność do tworzenia biofilmu [3, 4]. Badania wykazały, że patogenne szczepy *Aeromonas* mają prawie 20 razy większą zdolność przylegania do skóry karpia niż szczepy niepatogenne [1].

Bakterie z rodzaju *Aeromonas* są przyczyną chorób ryb głównie gatunków słodkowodnych (*Cyprinus carpio* i inne ryby z rodziny Cyprinidae, *Oncorhynchus mykiss*, *Ictalurus punctatus*, *Anguilla anguilla*, *Tilapia* i *Trichopodus trichopterus*), ale także i ryb morskich (z gatunku *Dorosoma cepedianum*, należącego do rodziny Clupeidae).

<sup>1</sup> mariakurzylewska@wp.pl, Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

<sup>2</sup> pakiet.kat@gmail.com, Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

<sup>3</sup> nataliawalczak010@gmail.com, Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Weltbox Lublin.

<sup>4</sup> aturska@hektor.umcs.lublin.pl, Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

Czynnikami etologicznym infekcji u ryb w Polsce są głównie gatunki mezofilne *A. hydrophilia*, *A. sobria* i *A. caviae*, które występują powszechnie w wodzie, w zawiesinach organicznych unoszących się w toni wodnej oraz w osadach dennych, gdzie biorą udział w ich rozkładzie i mineralizacji. Bakterie z rodzaju *Aeromonas* stanowią także składnik mikrobiomu przewodu pokarmowego ryb i uczestniczą w procesie trawienia. W czasie zimy bytują w pustych przewodach pokarmowych nieżerujących karp. U zdrowych ryb obecność bakterii na skórze, w skrzelach czy w obrębie jelita nie wywołuje infekcji. Jednakże uszkodzenie naskórka lub skóry bądź niekorzystne warunki termiczne i żywieniowe, mogą sprawić, że osobniki z obniżoną odpornością staną się podatne na zachorowania współbytująca, oportunistyczną mikrobiotą oraz na zakażenia występującymi w środowisku drobnoustrojami. Obserwuje się wówczas niewielkie płaskie wrzody na skórze oraz ubytki w obrębie płetw. W sprzyjających warunkach bytowania ryb dochodzi do samowyleczenia nawet bez zastosowania terapeutyków [6]. Jednak ponowne pogorszenie warunków może doprowadzić do nawrotu choroby następstwem, którego są owrzodzenia skóry postępujące w głąb tkanek aż do mięśni. W przypadkach znacznego zaawansowania choroby rozległe zmiany martwicze obejmują narządy wewnętrzne i ostatecznie prowadzą do śmierci osobników [7,8].

## 1.2. Systematyka rodzaju *Aeromonas*

Powszechnie stosowany podział bakterii *Aeromonas* na gatunki nieruchliwe i psychrofilne oraz gatunki ruchliwe i mezofilne nie oddawał różnorodności poznanych do tej pory gatunków fenotypowych i genotypowych.

Obecnie rodzaj *Aeromonas* wraz z czterema innymi rodzajami: *Telumonas*, *Oceanimonas*, *Oceanisphaera* i *Zobellella* należy do rodziny *Aeromonadaceae* [9, 10]. Wcześniejsza przynależność taksonomiczna, na podstawie cech fenotypowych, do rodziny *Vibrionaceae*, po uwzględnieniu wyników badań molekularnych wdrażanych od lat 80. XX wieku wymagała weryfikacji. Zauważono, że pokrewieństwo filogenetyczne między *Aeromonas* i *Vibro* jest stosunkowo niskie, poniżej 10%, co świadczyło o znacznej odległości ewolucyjnej między obydwoma grupami i wiązało się z koniecznością utworzenia nowej rodziny [11]. Od późnych lat 70. ubiegłego wieku w badaniach filogenetycznych zaczęto wykorzystywać technikę hybrydyzacji DNA-DNA, która pozwalała na wyjaśnienie związków taksonomicznych wśród gatunków *Aeromonas*. Pierwszy podział mezofilnych *Aeromonas* na trzy gatunki fenotypowe: *A. hydrophila*, *A. caviae* i *A. sobria*, po uwzględnieniu technik biologii molekularnej, okazał się niewystarczający, gdyż w każdym z nich występowały grupy różniące się genotypowo. Obecne uwzględnienie cech fenotypowych i genotypowych pozwoliło na wyodrębnienie w rodzaju *Aeromonas* 17 grup hybrydyzacyjnych DNA, (HG) odpowiadających gatunkom genomowym oraz 36 gatunków fenotypowych [12].

Włączenie od lat 90. ubiegłego wieku metody RFLP-16S rDNA (*Restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA*), akceptowanej obecnie przez większość naukowców w badaniach filogenetycznych, polegającej na analizie restrykcyjnej polimorfizmu konserwatywnego regionu genu dla 16S rRNA, pozwoliło na zidentyfikowanie i określenie przynależności systematycznej licznych gatunków różnionych

do tej pory głównie na podstawie cech fenotypowych. Klasyfikacja fenotypowa nie była łatwa i obciążona błędami ze względu na duże zróżnicowanie biochemiczne w obrębie grupy mezofilnych *Aeromonas*. Obecnie, poza wspomnianą metodą RFLP-16S rDNA, do identyfikacji gatunków wykorzystuje się także analizę sekwencji fragmentu genu dla 16S rRNA oraz genów metabolizmu podstawowego (*housekeeping genes*) tj., *gyrB* kodującego podjednostkę B gyrazy, białka uczestniczącego w przekształcaniu DNA w formę superhelisy i odpowiedzialnego za jego relaksację oraz genów kodujących polimerazę RNA (*rpoA*, *rpoB*, *rpoC*). Analiza porównawcza takich sekwencji z tymi dla gatunków referencyjnych pozwala ustalić ściśle pokrewieństwo i przynależność systematyczną [13]. Charakterystykę fenotypową członków *Aeromonadaceae* uzupełnia się także o analizy chemotaksonomiczne tj. profil kwasów tłuszczowych polarnych lipidów błonowych.

Obecnie do szybkiego i rutynowego identyfikowania izolatów w materiałach klinicznych wykorzystuje się metodę spektrometrii mas MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight), która znajduje zastosowanie także do typowania bakterii z rodzaju *Aeromonas*, w oparciu o występowanie w profilach białek rybosomalnych jonów wspólnych dla 17 badanych gatunków. Niektórzy badacze wskazują, że system MALDI-TOF MS (*Matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry*) jest najdokładniejszą i najszybszą metodą identyfikacji taksonomicznej aeromonadów i podkreślają większą rozdzielczość tej techniki w identyfikowaniu szczepów do gatunku w porównaniu do analizy nukleotydowej sekwencji genów metabolizmu podstawowego m.in. *rpoB* [11].

### 1.3. Choroby ryb

Mezofilne, ruchliwe gatunki *Aeromonas* wywołują zakażenia ryb w postaci ostrej, chronicznej lub utajonej. Przebieg choroby zależy od zjadliwości szczepu, warunków środowiskowych i stopnia odporności populacji. W ostrej postaci choroby śnięcie ryb może wystąpić, zanim jeszcze pojawią się objawy infekcji, do których zalicza się wytrzeszcz oczu, obrzęk i przekrwienie okolicy brzusznej, wysadzenie i przekrwienie odbytu oraz wrzody pojawiające się w różnych częściach ciała. Ogólna infekcja organizmu charakteryzuje się wystąpieniem rozległych zmian martwiczych w narządach wewnętrznych, wątroba przybiera kolor bladej bądź zielonkawej, nerka staje się obrzęknięta i włóknista, a w przewodzie pokarmowym występuje żółta śluzowata wydzielina. Z kolei, chroniczna postać choroby wywoływana przez mezofilne i wykazujące ruch *Aeromonas* przybiera postać wrzodów skórnych, a w przypadku zaawansowania choroby może dojść do zakażenia ogólnoustrojowego. Podczas utajonej postaci zakażenia nie obserwuje się wyraźnych zmian klinicznych. Występuje chudnięcie ryb i/lub pociemnienie skóry, a w narządach wewnętrznych stwierdza się zwiększoną wilgotność i czasami rozpulchnienie nerki.

Chorobę wywoływaną przez mezofilne *Aeromonas* kiedyś nazywano bakteryjną posocznicą krwotoczną, jednak obecnie przyjęto nazwę posocznica MAS (*motile Aeromonas septicaemia*). Nazwa ta nie jest słuszna w przypadkach chronicznych, kiedy zmiany chorobowe dotyczą powłok skórnych i/lub płetw. Wobec tego takie infekcje określa się jak MAI (*motile Aeromonas infection*) albo chroniczną postacią posocznicy MAS [8].

Występowanie MAS jest związane z obecnością czynników stresowych, którymi są m.in. napływające do zbiornika wraz ze ściekami azotany (w stężeniu powyżej 6 mg/l, przy temperaturze co najmie 9,5°C). Na zakażenia tymi bakteriami narażone są nie tylko ryby dziko żyjące, ale także hodowlane ze względu na czynniki stresotwórcze powstające w trakcie hodowli. Należą do nich: manipulacje rybami podczas obsadzania, sortowania i odłowu, zmiany fizykochemiczne wody w zakresie dobowych i sezonowych wahań pH, stężenia tlenu i związków azotowych oraz zanieczyszczenie zbiornika substancjami toksycznymi napływającymi ze ścieków komunalnych, przemysłowych i rolniczych.

W latach 2010-2012 bakterie te były główną przyczyną chorób ryb karpiowatych i łososiowatych w Polsce [6].

Mezofilne pałeczki *Aeromonas* sp. powodują także chorobę płetw (finrot), która występuje u wielu gatunków ryb. Objawia się ona martwicą obejmującą najpierw tkanki miękkie, a potem promienie płetw. Zmiany rozprzestrzeniają się następnie w obrębie skóry i mięśni podskórnych oraz mięśni podstawie płetw, gdzie mogą powstawać chroniczne owrzodzenia z wybroczynami.

Inną chorobą wywołaną przez mezofilne *A. hydrophila* jest „red sore”, występująca u ryb ozdobnych, objawia się ona uszkodzeniem łusek i punkcikowymi wybroczynami pokrywającymi większą część ciała.

Warto zaznaczyć, że bakterie z grupy mezofilnych *Aeromonas* sp. są wtórnymi i oportunistycznymi patogenami ryb, zakażonych przez wirusy lub inne bakterie chorobotwórcze [8].

Dobrze poznanym patogenem ryb są także bakterie należące do gatunku *A. salmonicida*, znajdującego się w grupie hybrydyzacyjnej HG3, w obrębie, którego są umieszczone gatunki nieruchliwe i psychrofilne patogenne dla ryb (*A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*, *A. salmonicida* subsp. *smithia*), oraz ruchliwy i mezofilny, niepatogenny *A. salmonicida* subsp. *pectinolytica*, który był izolowany z różnych źródeł [14].

*A. salmonicida* subsp. *salmonicida* to szczep określany jako typowy, który wywołuje czyraka mnogiego (łac. *furunculosis*) u ryb łososiowatych. Szczepy należące do pozostałych podgatunków są nietypowe i wywołują choroby wrzodziące i ogólnoustrojowe u wielu gatunków ryb słodkowodnych i morskich [15]. Czyraczność (wrzodzielnica) ryb łososiowatych [6] jest chorobą, która występuje w dwóch postaciach: skórnej oraz jelitowej. W postaci skórnej na powłokach zewnętrznych powstają wrzody, a w postaci uogólnionej wybroczyny na różnych częściach ciała oraz ogniska martwicze w narządach wewnętrznych. Postać jelitowa charakteryzuje się zapaleniem śluzówki przewodu pokarmowego [16].

U ryb akwariowych, jak i ryb karpiowatych *A. salmonicida* może powodować zakażenie zapalne skóry, o nazwie erythrodermatoza [4]. Najwięcej infekcji tego typu odnotowuje się na przełomie wiosny i lata. Jest to związane z występowaniem wahań temperatury wody. Wzrost temperatury w zbiornikach do 18°C, niska zawartość tlenu i duże zagęszczenie ryb sprzyjają namnażaniu się bakterii w ciele gospodarza, a co za tym idzie zwiększa się liczba zachorowań. Na erythrodermatozę chorują często ryby w wyniku uaktywnienia się, w następstwie spadku odporności, bezobjawowego nosicielstwa [6].

Za infekcje u ludzi odpowiedzialne są głównie trzy gatunki: *A. hydrophila*, *A. caviae* i *A. veronii*. U ludzi zdrowych wywołują one najczęściej choroby układu pokarmowego [4]. Są również odpowiedzialne za zakażenie tkanki łącznej i ran, ostrą biegunkę sekrecyjną, zakażenie układu moczowo-płciowego, dróg żółciowych, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, posocznice [1] oraz infekcje dróg oddechowych [5] przede wszystkim u osób z zaburzoną reaktywnością układu immunologicznego.

## 2. Czynniki wirulencji

Infekcje pałeczkami z rodzaju *Aeromonas* są spowodowane zdolnością do produkcji wielu czynników wirulencji, m.in. tych związanych z budową powierzchniowych osłon bakterii Gram-ujemnych, a także białek i enzymów wydzielanych na zewnątrz komórki. Do najważniejszych czynników determinujących patogenność *Aeromonas* można zaliczyć: białka błony zewnętrznej OMPs (*Outer membrane proteins*) [17], polisacharydy powierzchniowe: kapsularne polisacharydy (CPS, *capsular polysaccharide*), lipopolisacharyd (LPS, *lipopolysaccharide*),  $\alpha$ -glukan, warstwę powierzchniową S, fimbrie i inne czynniki adhezyjne, system wiążący żelazo, systemy sekrecyjne oraz egzotoksyny: hemolizyny, proteazy, cytotoksyny, nukleazy i acetylocholinoesterazy [18].

### 2.1. Białka błony zewnętrznej OMPs

Białka błony zewnętrznej OMPs, stanowiące ok. 50% jej masy [19], są swoistymi kanałami komunikacyjnymi bakterii ze środowiskiem zewnętrznym i zabezpieczają komórkę przed negatywnym wpływem czynników zewnętrznych [20]. Poziom ekspresji porynowych białek błonowych jest uzależniony od potrzeb komórki bakteryjnej i od czynników środowiska. Białka OMPs można podzielić na białka główne (major proteins) oraz białka drugorzędne (minor proteins). Do białek głównych należą np.: OmpA, OmpF, OmpX, które występują w komórce w dużej liczbie kopii, natomiast do białek drugorzędnych zalicza się m.in. białka FhuA i LamB, których ekspresja w błonie zewnętrznej jest zależna od potrzeb komórki. Białka OMPs bakterii Gram-ujemnych pełnią następujące funkcje: biorą udział w adhezji, będąc czynnikami wirulencji wchodzi w interakcje z komórkami i składnikami układu odpornościowego gospodarza, mogą być także receptorami dla fagów oraz kolicyn i mikrocyn [21].

Ze względu na to, że białka OMPs indukują syntezę specyficznych przeciwciał odpornościowych wzbudzają zainteresowanie jako skuteczne antygeny szczepionkowe. W błonie zewnętrznej *A. hydrophila* zidentyfikowano cztery typy białek błony zewnętrznej (Omp I-IV). Omp I jest cząsteczką o wielkości 47 kDa, wykazującą 63% pokrewieństwa z białkiem LamB *E. coli*. Omp II, to polipeptyd 39 kDa, który wykazuje 56-69% podobieństwa, na poziomie sekwencji aminokwasowej, z białkami PhoE, OmpF i OmpC *E. coli*. Omp III, to białko 36-kDa indukowane tylko w warunkach ograniczonego dostępu fosforu, podobne do OmpC (63%), PhoE (56%) i OmpF (56%) *E. coli*. Z kolei białko Omp IV, o wielkości 27 kDa, jest białkiem porynowym najbardziej swoistym dla rodzaju *Aeromonas*, nie wykazuje bowiem żadnej charakterystycznej homologii [17].

## 2.2. Polisacharyd kapsularny

Polisacharyd kapsularny (CPS) jest to struktura, która wchodzi w skład otoczki polisacharydowej u bakterii Gram-ujemnych. Łączy się z błoną zewnętrzną za pomocą łączników lipidowych. Jest zbudowany z wielokrotnych powtórzeń monosacharydów tworząc łańcuchy o charakterze heteropolimerów lub homopolimerów. CPS może wiązać nawet do 90% wody i tworząc uwodniony żel na powierzchni komórki chroni ją przed odwodnieniem. Synteza tego polisacharydu zostaje wzmożona podczas zmiany osmolarności zewnętrznej środowiska. Stanowiąc mechaniczną barierę ochronną ogranicza rozpoznanie epitopów znajdujących się na powierzchni ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych oraz ich dostępność dla składników układu odpornościowego gospodarza [2]. Jednak jak większość polisacharydów kapsularnych, z uwagi na podobieństwo do polisacharydów w tkankach gospodarza, jest słabo immunogeny [22]. Ze względu na swoją rolę w interakcjach bakterii ze środowiskiem (zapobieganie fagocytozie, ułatwianie kontaktu z innymi bakteriami i tkanką gospodarza oraz działanie jako bariera przeciwko hydrofobowym toksynom), CPS jest uważany za czynnik wirulencji, który wspólnie z warstwą białkową S i lipopolisacharydem warunkuje pałeczkom zakażenie komórek gospodarza. Przykładem szczepów *Aeromonas* wytwarzających CPS są *A. hydrophila* i *A. salmonicida* [17].

## 2.3. Lipopolisacharyd

Błona zewnętrzna (OM, *outer membrane*) bakterii Gram-ujemnych ma odmienną budowę niż błona cytoplazmatyczna (CM, *cytoplasmic membrane*) i stanowi pierwszą linię obrony tych mikroorganizmów. Jej właściwości wynikają ze składu chemicznego i organizacji tej warstwy, która zapewnia względną sztywność komórce. Jest zbudowana z fosfolipidów, białek i lipopolisacharydu, LPS. W warstwie wewnętrznej OM poza białkami występują fosfolipidy, zewnętrzna zaś zawiera głównie LPS (70-75%) [23].

LPS jest niefimbriałną adhezyną, która warunkuje przyleganie do komórek nabłonka gospodarza, chroni bakterie przed działaniem układu dopełniacza oraz fagocytozą. W ogólnym schemacie budowy lipopolisacharydu można wyróżnić trzy regiony: najbardziej konserwatywny strukturalnie lipid A, oligosacharyd rdzeniowy i polisacharyd O-swoisty (łańcuch O-swoisty, antygen O, antygen somatyczny), charakteryzujący się największą heterogennością. Gładkie szczepy bakterii Gram-ujemnych syntezują LPS zawierający wszystkie wymienione regiony, natomiast szczepy szorstkie syntezują lipooligosacharydy zbudowane jedynie z lipidu A podstawionego kompletnym lub niekompletnym oligocukrem rdzenia [24]. Naturalną cechą bakterii jest heterogenność wśród występujących w błonie zewnętrznej frakcji LPS [25]. Antygen O, jako część glikolipidu najbardziej eksponowana na zewnątrz, oddziałuje ze środowiskiem. Ze względu na unikatową budowę, nawet w obrębie szczepów, łańcuch O swoisty pełni rolę antygeny powierzchniowego bakterii i determinuje ich swoistość serologiczną [24].

Efekt biologiczny LPS, najczęściej korzystny dla zwalczania infekcji, ujawnia się w organizmie gospodarza w wyniku uwolnienia z powierzchni komórki bakteryjnej małych ilości glikolipidu w trakcie podziałów komórek albo podczas lizy bakterii. Natomiast przy masowych zakażeniach, duże ilości LPS (endotoksyny) powodują różne, niekiedy poważne w skutkach, objawy chorobowe. Zależą one od gatunku



zakażonego zwierzęcia oraz od szczepu bakteryjnego będącego dawcą endotoksyny. Toksyczność LPS jest bowiem determinowana budową lipidu A.

LPS należy do struktur określanych jako wzorce molekularne skorelowane z patogenami (PAMP, *pathogen associated molecular patterns*) i jest ligandem rozpoznawanym przez receptory PRR (PRR, *pattern recognition receptors*) komórek efektorowych układu odpornościowego, takich jak: makrofagi, komórki dendrytyczne, komórki NKT, limfocyty B oraz komórki nabłonków i śródbłonków. Receptory PRR, do których należą TLR (*Toll-like receptors*) są głównymi receptorami sygnalizującymi obecność patogenu u ssaków, jak i niższych kręgowców m.in. ryb [26]. Ich ekspresja na powierzchni makrofagów (kluczowych komórek fagocytujących u ryb) i w tzw. centrach melano-makrofagowych (pełniących funkcję węzłów limfatycznych ssaków) jest niezbędna dla zapoczątkowania odpowiedzi zapalnej i skutecznego hamowania rozwoju infekcji [27].

W komórkach ssaków, LPS uwolniony z błony zewnętrznej bakterii do krwi i płynów ustrojowych po związaniu z białkami ostrej fazy (białko LBP-LPS binding protein), jest przekazywany na kompleks receptora CD14/TLR-4/MD-2, czego efektem jest aktywacja komórek układu immunologicznego i uwalnianie mediatorów reakcji zapalnej. Uczestniczą w niej cytokiny (IL-1,-6,-8, TNF- $\alpha$ ), chemokiny, prostaglandyny, leukotrieny oraz czynnik aktywujący płytki krwi. W reakcji ligand-receptor poziom i intensywność odpowiedzi na obcy antygen zależy od budowy i struktury przestrzennej lipidu A. W pełni ufosforylowany, heksaacylowany lipid A jest strukturą najbardziej aktywną biologicznie. Dla rozwoju procesu zapalnego istotna jest rekrutacja makrofagów o właściwościach fagocytarnych, uwalnianie reaktywnych form tlenu i tlenu azotu, a także poprzez zwiększenie ekspresji antygenów zgodności tkankowej, mobilizacja komórek swoistej odpowiedzi immunologicznej, która prowadzi do eliminacji czynnika patogennego [28].

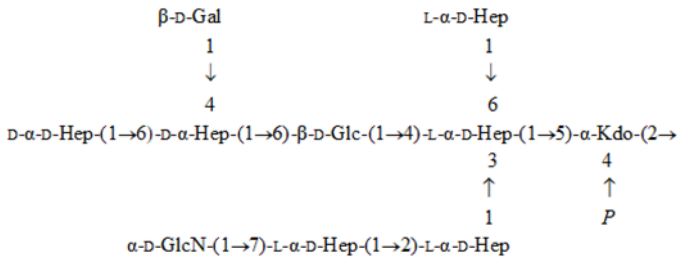
Z drugiej strony, nadmierne pobudzenie układu immunologicznego, jakie ma miejsce przy masowych zakażeniach i jest związane ze zbyt wysokim wzrostem poziomu markerów procesu zapalnego, może prowadzić do wstrząsu septycznego, endotoksycznego kończącego się śmiercią [29].

Należy zaznaczyć, że u ryb wstrząs endotoksyczny nie występuje. Ma to związek z faktem, że pomimo obecności kilkunastu odpowiedników ssaczych TLR, receptor TLR-4 jest u tych zwierząt rzadko spotykany. Jak dotąd został wykryty tylko u *Danio rerio* i karpiowatych, u których pełni prawdopodobnie inną funkcję. Przyпуска się, że u ryb w rozpoznaniu LPS biorą udział  $\beta$ -integryny, które są eksponowane w dużej ilości na jednojądrzastych komórkach fagocytujących. Za ich pośrednictwem następuje aktywacja mechanizmów odporności przeciwwzakaźnej. Natomiast TLR-4 jest angażowany w wyciszanie reakcji zapalnej podobnie jak indukowana w odpowiedzi na infekcje interleukina 10 (IL-10) [30].

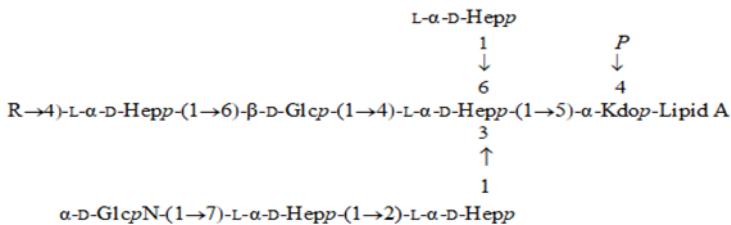
U *Aeromonas* podobnie jak i u pałeczek jelitowych rdzeń cukrowy lipidu A stanowią dwie reszty glukozyminy połączone wiązaniem  $\beta$ -1,6-glikozydowym i podstawione grupami fosforanowymi przy węglach C-1 i C-4'. Cztery łańcuchy 3-hydroksy tetradekanowych kwasów tłuszczowych, [C14:0(3-OH)] są związane amidowo (przy węglach C-2 i C-2') i estrowo (przy węglach C-3 i C-3'). Dwie kolejne reszty nasyconych kwasów tłuszczowych (najczęściej dodekanowego, C12:0

i tetradekanowego, C14:0) są przyłączone do dystalnej resztą glukozaminy tworząc podstawniki acyloksyacylowe i nadając heksaacylowanej cząsteczce lipidu A charakter asymetryczny [10, 31, 32]. Ważna jest budowa lipidu A, ponieważ to właśnie ona wpływa na toksyczność i aktywność biologiczną cząsteczki LPS [28].

Region rdzeniowy łączy część O-swoistą LPS z dystalną, nieredukującą glukozaminą lipidu A wiązaniem ketozydowym za pośrednictwem reszty Kdo (kwasu 2-keto-3-deoksy-D-manno-oktulozonowego). Chociaż region ten charakteryzuje się większą zmiennością strukturalną niż zakotwiczony w membranie lipid A, możliwe jest zaproponowanie wspólnego schematu budowy tego oligocukru w obrębie gatunku, a nawet rodzaju bakterii. W rodzinie *Enterobacteriaceae* wyróżniono dwa strukturalnie odmienne regiony rdzenia: wewnętrzny zbudowany z podregionów heptozowego i Kdo oraz zewnętrzny, najbardziej dystalny w odniesieniu do lipidu A, nazywany rdzeniem heksozowym. Odmianą budową chemiczną, odbiegającą od tej ustalonej dla pałeczek jelitowych [24], charakteryzuje się oligosacharyd rdzeniowy LPS gatunków *A. hydrophila* i *A. salmonicida* (rysunek 1 i 2) [33, 34], a także *A. bestiarum* i *A. sobria* complex [35, 36].



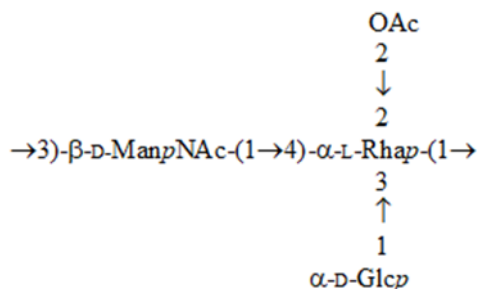
Rysunek 1. Oligosacharyd rdzeniowy LPS *A. hydrophila* [26]



Rysunek 2. Oligosacharyd rdzeniowy LPS *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* [34]

Łańcuch O-swoisty połączony jest z regionem zewnętrznym rdzenia i stanowi najbardziej eksponowaną na zewnątrz komórki część lipopolisacharydu. Zbudowany jest z powtarzających się podjednostek oligosacharydowych, w skład których najczęściej wchodzi 1-6 reszt cukrowych połączonych liniowo lub tworzących rozgałęzienia łańcucha [2]. Polisacharyd O-swoisty (O-PS), w przeciwieństwie do lipidu A, wykazuje ogromną różnorodność strukturalną. Jest ona widoczna zarówno w rodzaju i konfiguracji występujących monosacharydów, sposobie ich połączenia, jak i całkowitej długości łańcuchów [23]. Antygen O-swoisty bakterii *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* (rysunek 3) patogennej dla łososia atlantyckiego, ma strukturę rozgałęzionego heteropolimeru. Łańcuch główny tworzą powtarzające się dwucukrowe

podjednostki złożone z  $\beta$ -N-acetylo-D-mannozaminy (ManNAc) i  $\alpha$ -6-deoksy-L-mannozy (ramnozy, Rha), która jest dodatkowo podstawiona resztą glukozy (Glc), tworzącą boczne rozgałęzienie łańcucha. Co ciekawe, podjednostki O-antygeny mogą być niestechiometrycznie podstawione, nie tylko resztą glukozy, ale także grupą O-acetylową, te dwie ostatnie modyfikacje są charakterystyczne dla atypowych szczepów *A. salmonicida* zakażających inne gatunki ryb [37, 38].



Rysunek 3. Polisacharyd O-swoisty szczepu typowego *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* A449 [37]

Poznano także budowę powtarzających się podjednostek polisacharydu O-swoistego trzech mezofilnych szczepów *A. bestiarum*, patogennych dla karpia, wyizolowanych z polskich gospodarstw rybackich. Pięciodukrowa, rozgałęziona podjednostka O-antygeny szczepu *A. bestiarum* K207 (rysunek 4) jest zbudowana z czterech reszt L-ramnozy,  $\alpha$ -glikozydowo związanych przy węglu drugim lub trzecim, a resztą terminalną w oligocukrze stanowi  $\beta$ -glikozydowo związana N-acetylglukozamina (GlcNAc).

Polisacharyd O-swoisty w szczepie *A. bestiarum* P1S (rysunek 5) ma strukturę liniowego heteropolimeru, a czterocukrowa powtarzająca się podjednostka zawiera oprócz  $\beta$ -galaktozy (Gal) i  $\alpha$ -fukozaminy (FucN), rybofuranozę (Ribf) i 3-amino-6-deoksychinowozę (Qui3N), której grupa aminowa jest podstawiona resztą kwasu 3-hydroksymasłowego. Tego typu składniki nie były dotychczas identyfikowane w strukturach antygenowych pałeczek z rodzaju *Aeromonas*.

Z kolei antygen somatyczny O szczepu *A. bestiarum* K296 (rysunek 6), serotyp O18, jest zbudowany z mannozy (Man), galaktozaminy (GalN) i 6-deoksy-talozy (6dTal), niestechiometrycznie podstawionej grupami O-acetylowymi. Badania immuno-chemiczne wykazały podobieństwo strukturalne i serologiczne antygeny *A. bestiarum* K296 serogrupy O18 do *A. hydrophila* O34. Co ciekawe, szczepy o serotypie O34 są najczęściej izolowane od ludzi z posocznicą [24]. Serogrupa O18, wspólnie z immunotypami O3, O6, PGO1, PGO4 i PGO6 jest jednym z częściej identyfikowanych serotypów wśród ruchliwych pałeczek *Aeromonas* wywołujących infekcje u ryb w Polsce [39].

Ostatnie badania pozwoliły na poznanie budowy O-antygeny swoistego dla serogrupy O6. Wykazano, że łańcuch O-swoisty szczepu *A. hydrophila* JCM 3968, referencyjnego dla tego immunotypu zawiera 4-amino-4,6-dideoksy-L-mannozę, czyli L-perosaminę, która w konfiguracji L nie była dotychczas identyfikowanych w żadnych strukturach antygenowych bakterii. Antygen O-swoisty szczepu *A.*



fikacji serologicznej szczepów. Stanowi on ze względu na wysoki stopień zmienności charakterystyczny, antygenowy „odcisk palca” (fingerprint) dla bakterii.

Pałeczki *Aeromonas* stanowią najbardziej zróżnicowaną antygenowo grupę bakterii chorobotwórczych dla ryb. W latach 80. ubiegłego stulecia pojawiło się kilka schematów klasyfikowania tych bakterii, które opierały się na obecności specyficznych determinantów somatycznego antygeny O. Do tej pory, opublikowano dwa schematy: NIH – badacze japońskich Sakazaki i Shimada (1984) oraz NIPEH – holenderskich Guinee i Jansen (1987). W systemie NIH (National Institute of Health, Japan), bakterie *Aeromonas* sklasyfikowano w 44 uznanych serogrupach, natomiast w systemie NIPEH (*National Institute of Public Health and Environmental Hygiene, The Netherlands*) w 30 serogrupach. W oparciu o wspomniane systemy zdefiniowano kilka grup serologicznych istotnych w ichtiopatologii. Bakterie *Aeromonas* należące do serogrup O3, O6, O11, O16 O19, O34 oraz PGO1, PGO2 i PGO6 są związane z występowaniem infekcji MAI i posocznicy MAS karpia i pstrągów na terenie całej Polski [8, 39].

Różnorodność struktur antygenowych, głównie endotoksyny/LPS bakterii *Aeromonas* sp. sprawia, że próby opracowania skutecznej szczepionki przeciwko chorobom ryb (np. MAI/MAS u karpia i pstrąga) nie przynoszą zadowalających efektów [8]. Wielu autorów wskazuje, że endotoksyna jest dobrym kandydatem jako składnik preparatów do immunoprofilaktyki. Ryby szczepione OMP i LPS wykazują wyższą odporność na zakażenia bakteriami z rodzaju *Aeromonas*, i w tym przypadku, ze względu na odmienną budowę części O-swoistej, najlepsze efekty ochronne będzie można uzyskać po zastosowaniu odpowiednio skomponowanej szczepionki wieloważnej [46-48].

Analizy strukturalne polisacharydów O-swoistych mają także aspekt poznawczy, stanowią bowiem punkt wyjścia do badań genetycznych nad organizacją regionów determinujących ich syntezę u bakterii *Aeromonas* sp. Takie badania przyczynią się do wyjaśnienia molekularnych podstaw pokrewieństwa między pałeczkami *Aeromonas* i innymi bakteriami Gramu-jemnymi.

## 2.4. $\alpha$ -glukan

Powierzchniowy  $\alpha$ -glukan jest wspólnym elementem ściany komórkowej mezo-filnych bakterii *Aeromonas*. Spełniając funkcję molekularnego spoiwa (cementu) łączy ze sobą białka, lipidy i składniki polisacharydowe. Powyższa funkcja polimeru najlepiej jest realizowana podczas tworzenia biofilmu. Jest polimerem D-glukozy występującym w dwóch formach: nierozgałęzionej  $\alpha$ -(1,4)-glukanu i rozgałęzionej  $\alpha$ -(1,6)-glukanu. Powierzchniowy  $\alpha$ -glukan *A. hydrophila* AH-3 jest niezależnym polisacharydem powierzchniowym, pomimo tego, że w procesie jego syntezy są wykorzystywane enzymy biorące udział także w syntezie LPS, a mianowicie WecP oraz WaaL [2]. Pierwszy z tych enzymów, w biosyntezie antygeny O34 *A. hydrophila*, katalizuje transfer GalNAc-1-fosforanu na nośnik lipidowy (fosforan undekaprenylu) natomiast drugi odpowiada za ligację oligosacharydu rdzeniowego z lipidem A [23].

## 2.5. Warstwa S

Najbardziej zewnętrzną otoczkę komórek bakteryjnych *Aeromonas* pełni dodatkowa warstwa białkowa lub glikoproteinowa nazywana warstwą S (Surface – powierzchnia lub S-layer), dawniej warstwą A, która może pokrywać całą powierzchnię zjadliwych szczepów, stanowiąc tym samym, istotną barierę przed

bakteriobójczym i bakteriostatycznym działaniem antybiotyków. Warstwa S powoduje także zwiększenie hydrofobowości bakteryjnej błony komórkowej, która uniemożliwia opsonizację przez składniki układu dopełniacza i chroni przed aktywnością żerną leukocytów gospodarza [23]. Zbudowana jest z pojedynczego białka lub glikoprotein (40-200 kDa). Częsteczki ją tworzące ułożone są bardzo regularnie, nadając warstwie charakter krystaliczny. Zwykle ma od 5 do około 10 nm grubości, a na jej powierzchni występują pory o średnicy od 2 do 8 nm. Ze względu na jej umiejscowienie oddziałuje zarówno ze środowiskiem zewnętrznym, jak i strukturami komórkowymi leżącymi poniżej [2]. Stanowi dominujący antygen powierzchniowy. Warstwę S mezofilnych *Aeromonas* tworzą białka o punkcie izoelektrycznym, pI 4,6 i masie cząsteczkowej 52-53 kDa. Budowę i właściwości warstwy S najlepiej poznano u *A. hydrophila* i *A. salmonicida*. Warstwa S *A. hydrophila* TF7 ma grubość 5,6 nm. Jej syntezę warunkuje gen *ahsA*, który koduje białko AshA o długości 448 aminokwasów, masie cząsteczkowej 45,5 kDa i pI 6,72 [17]. Warstwa S szczepu *A. salmonicida* zbudowana jest z podjednostek białkowych zbudowanych z białka VapA. Ułatwia asocjację z białkami macierzy zewnątrz komórkowej, wiązanie porfiryń i immunoglobulin oraz pełni funkcję ochronną przed proteazami [2, 49]. Ponadto dzięki obecności porów stanowi swoistą przepuszczalną barierę dla zewnątrzkomórkowych czynników, zapewnia pewien rodzaj ultrafiltracji dla cząsteczek o określonej wielkości i ładunku. Zaobserwowano, że białka budujące tę strukturę ulegają zmianom konformacyjnym regulując w ten sposób wielkość porów. Właściwość tę obserwowano u *A. salmonicida*, u której owo zjawisko ułatwia wydzielanie hemolizyny i proteaz [50].

## 2.6. Fimbrie

Fimbrie (pile) to białkowe wyrostki cytoplazmatyczne o budowie rurkowatej zbudowanej z białka zwanego piliną, syntezowanego w cytoplazmie. Podział tych struktur nie jest do końca sprecyzowany. Jeden wyodrębnia fimbrie, biorące udział w adhezji i pilusy (pile) uczestniczące w koniugacji, w drugim terminy te używane są zamiennie [19].

Mimo że, rola fimbrii do końca nie jest poznana badacze są zgodni, że warunkują one proces adhezji bakterii do powierzchni błon śluzowych etap, który poprzedza kolonizację [51]. Rozpoznawane przez nie receptory są glikoproteinami lub glikolipidami tkanek gospodarza.

Gatunki *Aeromonas* posiadają dwa główne typy fimbrii: krótkie, sztywne typu I (typu S/R) oraz długie i elastyczne typu IV (typu L/W). Fimbrie S/R występują licznie na komórce i umożliwiają bakteriom autoagregację. Fimbrie L/W są mniej liczne na powierzchni i nadają bakteriom zdolność do: hemaglutynacji, adhezji do komórek nabłonka, tworzenia biofilmu oraz ruchu drgającego [52]. U *Aeromonas* występują również, chociaż rzadziej mini-pile. Fimbrie typu I stwierdzono u *A. hydrophila*. Mają one 0,6-2,0  $\mu\text{m}$  długości i masę cząsteczkową 17-20 kDa. Fimbrie typu IV są obecne u *A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. caviae* i *A. trota*. Ich masa cząsteczkowa wynosi od 20 do 23 kDa, a długość 7 nm. Zawierają na N-końcu metioninę lub tyrozynę, a nie jak u pozostałych bakterii N-metylofenyloalaninę. U *A. hydrophila* klaster genów odpowiedzialnych za ich kodowanie ma długość 5,5 kpb. Mini-pile, to nietypowe, elastyczne fimbrie wykryte u *A. hydrophila* AH26, jako 46 aminokwasowy polipeptyd o masie cząsteczkowej  $\sim$ 4 kDa. Wykazują one 91% podobieństwa do fimbrii *Vibrio*

*cholerae*. Gen strukturalny dla mini-pili (*fxp*) został zmapowany na plazmidzie o wielkości 7,6 kbp, jedynie u wspomnianego szczepu *A. hydrophila*. Nie stwierdzono także jego powszechnego występowania u innych gatunków bakterii [17].

## 2.7. System wiążący żelazo

Żelazo jest niezbędne do funkcjonowania zarówno organizmu gospodarza, jak i patogenu. Jest potrzebne do prawidłowego przebiegu procesów biochemicznych oraz stanowi składnik licznych enzymów. Szczególna rola żelaza w biokatalizatorach związana jest z jego występowaniem w dwóch stanach wartościowości Fe(II) i Fe(III).

Praktycznie całe żelazo organizmów zwierzęcych występuje w postaci związanej w żelazoproteinach (hemoglobina, mioglobina, peroksydaza, katalaza, cytochrom, oksydaza cytochromowa – żelazoproteiny hemowe, transferryna, ferrytyna, hydrolazy, oksigenazy – żelazoproteiny niehemowe). Dla bakterii najważniejszym, dostępnym źródłem żelaza jest żelazo zewnątrzkomórkowe – transferryna i laktoferyna, jednak mogą one wykorzystywać także pulę żelaza wewnątrzkomórkowego – hemoglobinę.

System pobierania i transportu żelaza ma decydujące znaczenie dla rozwoju i wzrostu bakterii [53]. Siderofory są najważniejszym sposobem pozyskiwania żelaza przez bakterie. Mają one zdolność chelatowania, czyli wiązania żelaza w formie jonów  $Fe^{3+}$  i przekazywania go za pomocą transportu aktywnego do organizmu [2]. W cytoplazmie jon  $Fe^{3+}$  albo ulega redukcji do  $Fe^{2+}$  i jest on uwalniany z sideroforu łączącego się z jonem żelazowym, albo sam związek ulega rozkładowi uwalniając jon żelazowy [51].

*Aeromonas* sp. posiadają dwa systemy wiążące żelazo. Pierwszy mechanizm jest zależny od sideroforów, a drugi od nich nie zależy. Mezofilne *Aeromonas* syntezują dwa rodzaje sideroforów: enterobaktynę i amonabaktynę. Co ciekawe *Aeromonas* wytwarzają tylko jeden z nich, nigdy dwa jednocześnie. Enterobaktyna jest produkowana także przez inne bakterie Gram-ujemne, zaś amonabaktyna jest charakterystycznym czynnikiem zjadliwości *Aeromonas* sp. Liczne szczepy *A. hydrophila* wytwarzają dwa rodzaje amonabaktyny: T i P. Amonobaktyna T zawiera tryptofan, a amonobaktyna P – fenyloalaninę. Z kolei mechanizm niezależny od sideroforu występuje u bakterii *A. salmonicida*, która w procesie pobierania żelaza korzysta z bakteryjnych białek błony zewnętrznej zdolnych do wiązania określonego białka gospodarza kompleksującego żelazo lub hem, bez pośrednictwa sideroforów [2].

## 2.8. Systemy sekrecyjne

Funkcją systemów sekrecji jest transport białek do błony cytoplazmatycznej, jak i błony zewnętrznej oraz wydzielanie ich poza komórkę. Dzięki temu procesowi wiele czynników wirulencji (toksyny, proteazy, adhezyny, inwazyjne) osiąga właściwy przedział komórkowy.

U bakterii Gram-ujemnych występują dwie błony: cytoplazmatyczna i zewnętrzna rozdzielone przestrzenią peryplazmatyczną, która stanowi barierę podczas transportu. W celu pokonania jej bakterie Gram-ujemne wykorzystują różnego typu układy sekrecji (I, II, III, IV, V i VI), które można podzielić na dwie główne grupy: zależne i niezależne od systemu Sec [2, 54]. Klasyfikacja tych sześciu ogólnych systemów sekrecji u bakterii Gram-ujemnych oparta jest na różnicach w mechanizmie transportu

i rodzaju katalizowanej reakcji [55]. Szlaki należące do systemu sekrecji ogólnej GSP, zależne od kompleksu białkowej translokazy Sec (Sec- zależne, typy II i V) wykorzystują transporter Sec do przenoszenia wydzielonego białka do przestrzeni peryklazmatycznej, z której białko zawierające domenę translokacyjną zostaje przekierowane na powierzchnię komórki. Jest to proces dwuetapowy. Białka Sec budują aparat transportu zwany sekretomem, składający się z białka SecB (którego funkcją jest rozpoznanie transportowanego substratu), SecA (będącego błonową ATPazą) i co najmniej sześciu białek błony cytoplazmatycznej budujących kanał transbłonowy. Białko SecB pełni rolę białka opiekuńczego, które zapobiega degradacji i agregacji białek sekrecyjnych. Przenosi ono białka z nim związane do błony cytoplazmatycznej, gdzie łączy się z białkiem SecA, tworząc kompleks SecYEG. Dzięki temu następuje zmiana konformacji białka SecB i uwolnienie związanych z nim substratów, które następnie zostają wydzielone do peryplazmy. Sekrecja białka do CM wymaga obecności w transportowanym substracie peptydu sygnałowego. Jest nim N-końcowy fragment białka o długości 18-30 aminokwasów. W komórkach Gram-ujemnych aktywowane są trzy główne peptydy sygnałowe różniące się swoistością [19].

Szlaki nienależące do GSP (Sec-niezależne, typy I, III, IV i VI) pozwalają na bezpośredni, jednoetapowy eksport białek z cytoplazmy do środowiska zewnątrzkomórkowego [2, 54]. Aktywność tych układów jest indukowana czynnikami środowiska, np. fizycznym kontaktem mikroorganizmu z komórkami gospodarza, a ich budowa jest bardzo podobna, jednak różnią się rodzajem transportowanego substratu. Systemy sekrecji typu III transportują wyłącznie białka o strukturze monomerów, zaś typu IV monomery, jak i oligomery [19].

Systemy sekrecji typu III (T3SS) są identyfikowane u *A. salmonicida* oraz w szczepach *A. hydrophila* AH-1, AH-3 i SSU, u których również opisano systemy sekrecji typu VI (T6SS). Systemy te są często aktywowane po kontakcie z komórkami docelowymi i dostarczają toksyny bezpośrednio do komórki gospodarza. System T3SS składa się z trzech rodzajów protein: białek strukturalnych tworzących „igły infekcyjne”, za pomocą których patogeny wprowadzają do komórek gospodarza białka efektorowe, czyli toksyny oraz białek chroniących białka strukturalne i efekторы. Geny T3SS *A. salmonicida* są przenoszone zarówno na plazmidach, jak i chromosomalnie. Plazmid kodujący geny T3SS jest plazmidem dużym o wielkość do 150 kpb. Może on zostać utracony bądź przearanżowany pod wpływem czynników stresowych. Transkrypcja T3SS u *A. salmonicida* jest indukowana w warunkach ograniczających dostępność  $Ca^{2+}$  i podczas kontaktu *A. salmonicida* z gospodarzem. U *A. salmonicida* zidentyfikowano siedem białek efektorowych: AexT, AopH, Ati2, AopP, AopO, AopN i ExsE. Natomiast u *A. hydrophila* wykryto białko efektorowe AexT. Efektor AexT to bifunkcyjne białko o aktywności ADP-rybozylotransferazy i GTPazy. Ma on szkodliwy wpływ na cytoskielet komórki gospodarza, co częściowo wyjaśnia zaokrąglenie się komórek docelowych (komórek rybich) zaraz po zakażeniu *in vitro*. Drugie białko AopP należące do rodziny YopJ zakłóca szlak kinaz aktywowanych mitogenami (kinazy MAP, MAPK, mitogen-activated protein kinases) oraz czynnik transkrypcyjny NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), stymuluje sygnał, dostarczając główny sygnał proapoptotyczny. Całkowita utrata plazmidu kodującego T3SS daje pełną awirulencję [2, 54].



## 2.9. Egzotoksyny

Chorobotwórczość pałeczek *Aeromonas* związana jest także z wytwarzanymi przez nie egzotoksynami, do których należą: hemolizyny i aerolizyny, proteazy, cytotoksyny, nukleazy, acetolocholinerazy, cytotoksyczna enterotoksyna (Act), termolabilna cytotoksyczna enterotoksyna (Alt), ciepłostała cytotoksyczna enterotoksyna (Ast) i elastazy [2].

Cytotoksyczna enterotoksyna kodowana przez gen *act* produkowana jest przez *A. hydrophila* i *A. sobria*. Na podstawie klonowania i analizy sekwencji tego genu przypuszcza się, że wielkość toksyny Act to 52 kDa. Act powoduje powstawanie porów w błonach komórkowych, a w erytrocytach kanałów o średnicy 1,4-2,8 nm. Wytwarzana jest jako nieaktywna forma prekursorowa. Konwersja do aktywnej postaci następuje w momencie, gdy toksyna przechodzi przez przestrzeń periplazmatyczną poprzez usunięcie N-terminalnej sekwencji sygnałnej, o wielkości 23 aminokwasów (powstanie protoksyny), a następnie poprzez odcięcie od protoksyny C-terminalnej części przez proteazy. W ten sposób utworzona zostaje dojrzała, aktywna biologicznie toksyna [56]. Bakterie *Aeromonas* produkują dwie cytotoksyczne enterotoksyny: termolabilną cytotoksyczną enterotoksynę (Alt), bez reakcji krzyżowych z antytoksyną cholery oraz ciepłostałą cytotoksyczną enterotoksynę (Ast), która reaguje z antytoksyną cholery. Obie toksyny nie wykazują homologii do żadnych innych toksyn bakteryjnych. Alt to białko o masie 44 kDa, zbudowane z pojedynczego łańcucha polipeptydowego, zawierającego 368 aminokwasów, zaś przewidywana masa Ast wynosi 71 kDa i zawiera 636 aminokwasów [57, 58].

Aerolizyna jest najlepiej poznaną i najistotniejszą w procesie patogenezy toksyną wytwarzaną przez gatunki *Aeromonas*. Jest bardzo ważnym czynnikiem wirulencji tych bakterii. Szczepy produkujące aerolizynę wywołują u zwierząt posocnicę krwotoczną, zaś u ludzi, zwłaszcza u osób z obniżoną odpornością, choroby przewodu pokarmowego, infekcje ran, posocnicę oraz zapalenie opon mózgowych.

Aerolizyna ma wielkość 47 kDa i przypomina kształtem literę L [59]. Składa się z dużej domeny N-końcowej i trzech domen dodatkowych. Dwie pierwsze domeny biorą udział w wiązaniu się toksyny do receptorów powierzchniowych gospodarza. Domena druga i trzecia są odpowiedzialne za oligomeryzację, zaś transbłonowa domena czwarta – C-końcowa, zostaje uwolniona podczas aktywacji aerolizyny i odpowiada za tworzenie kanałów w błonie komórkowej. Aerolizyna wykazuje właściwości hemolityczne, jak i cytolityczne. Zaliczana jest do grupy hemolizyn ze względu na tworzenie agregatów oligomerów na powierzchni erytrocytów. Białko to także wiąże się do specyficznego glikoproteinowego receptora na powierzchni komórki eukariotycznej, umiejscawia się w błonie komórkowej i formuje w niej kanały o średnicy ok. 3 nm. Aerolizyna posiada również zdolność wiązania się do białek receptorowych typu GPI. Komórki cechujące się obniżoną biosyntezą tych białek mają mniejszą wrażliwość na toksyczne działanie aerolizyny [60].

Acylotransferaza glicerofosfolipid:cholesterol (GCAT) jest enzymem o masie cząsteczkowej 26 kDa, wydzielanym przez psychrofilne szczepy *A. salmonicida* [58]. Gen kodujący GCAT zawiera 1,005 pz, kodujących 335 aminokwasów (18 aminokwasów peptydu sygnałnego oraz 317 aminokwasów dla dojrzałego polipeptydu).

Może występować w formie monomeru, dimeru, zespołu polipeptydów lub jako pojedynczy polipeptyd skompleksowany z LPS [61].

Białko to jest głównym czynnikiem wirulencji *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* i odpowiada za czyraczność u łososi atlantyckich. Wykazuje wysokie podobieństwo do ludzkiego enzymu acylotransferazy lecytyna;cholesterol (LCAT) i podobnie jak on może działać jak fosfolipaza lub acylotransferaza w zależności od obecności lub braku cholesterolu. GCAT pełni funkcje hemolizyny, leukocytolizyny oraz cytotoksyny, powoduje lizę erytrocytów poprzez uszkodzenie ich błon plazmatycznych. Połączenie LPS-u z wolnym GCAT wzmacnia aktywność hemolityczną, działanie letalne oraz stabilność termiczną. Tworzy kompleksy z lipoproteinami obecnymi w surowicy łososiowatych, co może doprowadzić do zaburzenia metabolizmu lipidów lub aktywacji mediatorów zapalnych, np. kwasu arachidonowego.

*Aeromonas* wytwarzają kilka typów proteaz: ciepłolabilne proteazy serynowe, ciepłostabilne proteazy serynowe oraz wrażliwe i niewrażliwe na EDTA metalo-proteazy. Proteaza serynowa ma masę 22 kDa, kodowana jest przez gen *ser*. Wykazuje stabilność zarówno w wysokich temperaturach (10 min w 45°C), jak i niskich (nawet -4°C). Posiada właściwości cytotoksyczne oraz aktywuje aerolizynę i GCAT. Inhibitorem tego enzymu jest głównie fluorek fenylometanosulfonylu i w mniejszym stopniu jony:  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ . Produkowana przez *A. sobria* proteaza serynowa określana jest jako ASP (*A. sobria* serine proteinase). Białko to ma masę 65 kDa. Odpowiada za powstawanie obrzęku i wydzielanie się treści ropnej w miejscu zakażenia, a także obniżenie ciśnienia krwi oraz aktywuje protrombinę, czym przyczynia się do koagulacji osocza, a następnie śmierci organizmu [62]. Enzym ten posiada także aktywność fibrynogenolityczną. Zaburza proces krzepnięcia krwi, co jest ważnym czynnikiem zjadliwości w przebiegu posocznicy krwotocznej, wywołanej przez bakterie z rodzaju *Aeromonas*.

### 3. Podsumowanie

W ostatnich latach w Polsce obserwuje się gwałtowny wzrost zanieczyszczeń wód w wyniku szeroko rozumianej, często nierozważnej, działalności gospodarczej człowieka, która powoduje degradację naturalnych i sztucznych zbiorników wodnych. Czynniki stresotwórcze powodują pogarszanie kondycji ryb zasiedlających te zbiorniki co doprowadza do osłabienia ich układu odpornościowego, co z kolei wpływa na wzrost podatności ryb na infekcje wywołane obecnością patogenów. Nie tylko czynniki środowiskowe sprzyjają zapadalności na choroby, ale zakażenie jest również zależne od właściwości samych bakterii. Należą do nich czynniki wirulencji, które nabywane w toku ewolucji umożliwiają drobnoustrojom kolonizację powłok zewnętrznych, skrzel i przewodu pokarmowego, a także przetrwanie w organizmie ryby w stanie utajenia, najczęściej jako konsekwencja unikania składników układu immunologicznego gospodarza. Wszystko to pozwala bakteriom na masowe namnażanie się w tkankach i narządach wewnętrznych ryb [6].

Mówiąc o zakażeniach wywołanych przez bakterie nie sposób nie wspomnieć także o patogenności, którą można najtrafniej zdefiniować jako zdolność czynników mikrobiologicznych do wywołania chorób u konkretnego żywiciela. Jednak dokładne podanie tej definicji jest trudne, ponieważ wiąże się z drogą zakażenia, wrażliwością

żywiciela i wirulencją bakterii [37]. Wiedza na temat czynników wirulencji u *Aeromonas* jest coraz rozleglejsza. Obecnie zalicza się do nich białka błony zewnętrznej, polisacharyd kapsułarny, lipopolisacharyd,  $\alpha$ -glukan, warstwę S, fimbrie oraz egzotoksyny. Dokładne badania funkcji tych struktur mogą pomóc w zrozumieniu mechanizmów patogenezы i przyczynić się do ograniczenia chorób ryb wywołanych przez *Aeromonas* w gospodarstwach rybackich w Polsce, które są powodem dużych strat ekonomicznych.

Wyraźny wzrost zainteresowania pałeczkami *Aeromonas* obserwuje się od początku lat osiemdziesiątych XX wieku. Od tego czasu znacznie przybyło publikacji dotyczących czynności życiowych i mechanizmów patogenezы tych bakterii. Związane jest to przede wszystkim ze stwierdzeniem ich występowania w materiałach klinicznych [2].

Pomimo zwiększonego zainteresowania Gram-ujemnymi bakteriami z rodzaju *Aeromonas* ciągle poszukuje się odpowiedzi na wiele istotnych pytań dotyczących zakażeń wywołanych przez te drobnoustroje. Dlatego też konieczne są dalsze badania naukowe, które pozwolą wyjaśnić mechanizmy działania czynników zjadliwości w przebiegu chorób wywołanych przez *Aeromonas* u ryb.

## Literatura

1. Kręgiel D., Rygała A., *Bakterie Aeromonas sp. nowy wskaźnik mikrobiologiczny*, Przemysł Spożywczy, 11, 2008, 46-47.
2. Tomas J., *The Main Aeromonas Pathogenic Factors*, ISRN Microbiology, 2012, 1-22.
3. Niestępski S., Harnisz M., Korzeniewska E., Osińska A., Kacprzyk P., *Różnicowanie środowiskowych bakterii z rodzaju Aeromonas*, Prace Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu, 416, 2016, 147-156.
4. Kręgiel D., Rygała A., *Występowanie heterotrofi czynnych bakterii z rodzaju Aeromonas w wybranym systemie dystrybucji wody*, Ochrona Środowiska, 32, 2010, 47-50.
5. Piotrowska M., Popowska M., *Insight into the mobilome of Aeromonas strains*, Frontiers in Microbiology, 6, 2015, 1-16.
6. Antychowicz J., *Przyczyny pojawiania się nowych chorób ryb oraz rozprzestrzeniania się mikroorganizmów chorobotwórczych i nowych pasożytów*, Życie Weterynaryjne, 91, 2016, 19-26.
7. Janda J., Abbott S., *The genus Aeromonas: taxonomy, pathogenicity, and infection. pathogenicity, and infection. pathogenicity*, Clinical Microbiology Reviews, 23, 2010, 35-73.
8. Kozińska A., *Genotypowanie i serologiczna analiza krajowych izolatów mezofilnych Aeromonas sp. w aspekcie chorobotwórczości i rodzaju objawów chorobowych wywołanych przez nie u ryb*, Państwowy Instytut Weterynaryjny w Puławach, Puławy 2009.
9. Bergey D., Breed R., Murray E., Hitchens A., *Manual of determinative bacteriology. Fifth Edn.*, London, Bailliere, Tindall & Cox, Londyn 1939.
10. Dworaczek K., Drzewiecka D., Pękala-Safińska A., Turska-Szewczuk A., *Structural and Serological Studies of the O6-Related Antigen of Aeromonas veronii bv. sobria Strain K557 Isolated from Cyprinus carpio on a Polish Fish Farm, which Contains l-perosamine (4-amino-4,6-dideoxy-l-mannose), a Unique Sugar Characteristic for Aeromonas Serogroup O6*, Marine drugs, 17, 2019, 399.
11. Huys G., *The Family Aeromonadaceae* [w:] Rosenberg E., DeLong E., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F., *The Prokaryotes-Gammaproteobacteria*, Springer, Berlin 2014.

12. Huys G., Liu D., *Aeromonas*, [w:] Tang Y., Sussman M., Liu D., Poxton I., Schwartzman J. (red.), *Molecular Medical Microbiology*, Academic Press Inc, San Diego 2015, 2.
13. Küpfer M., Kuhnert P., Korczak B., Peduzzi R., Demarta A., *Genetic relationships of Aeromonas strains inferred from 16S rRNA, gyrB and rpoB gene sequences*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 2006, 2743-2751.
14. Merino S., Tomas J., *The Aeromonas salmonicida lipopolysaccharide core from different subspecies: the usual subsp. pectinolytica*, *Frontiers in Microbiology*, 7, 2016, 125.
15. Magnadóttir B., Bambir S., Gudmundsdóttir B., Pilstrom L., Helgason S., *Atypical Aeromonas salmonicida infection in naturally and experimentally infected cod, Gadus morhua L.*, *Journal of Fish Diseases*, 25, 2002, 583-597.
16. Antychowicz J., *Przyczyny pojawiania się nowych chorób ryb oraz rozprzestrzeniania się mikroorganizmów chorobotwórczych i nowych pasożytów*, *Życie Weterynaryjne*, 91, 2016, 19-26.
17. Liu D., *Aeromonas*, [w:] Tang Y., Sussman M., Liu D., Poxton I., Schwartzman J. (red.), *Molecular Medical Microbiology*, Academic Press Inc, San Diego 2015, 2.
18. Guz L., *Hamowanie aktywności proteazowej Aeromonas hydrophila przez śluz i surowicę karpia (Cyprinus carpio L.) Cz. 1: Wpływ sezonowości*, *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska*, 60, 2005, 95-102.
19. Baj J., Markiewicz Z., *Biologia Molekularna Bakterii*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2012.
20. Bugła-Płoskońska G., Futoma-Kołoch B., Doroszkiewicz W., *Rola białek błony zewnętrznej w oddziaływaniach bakterii Gram-ujemnych z organizmem gospodarza*, *Postępy Mikrobiologii*, 46, 2007, 139-152.
21. Witkowska D., Bartys A., Gamlan A., *Białka osłony komórkowej pałeczek jelitowych i ich udział w patogenności oraz odporności przeciwbakteryjnej*, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 63, 2009, 176-199.
22. Roberts I., *The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria*, *Annual Review of Microbiology*, 50, 1996, 285-315.
23. Kaszowska M., *Budowa chemiczna i biosynteza lipopolisacharydu – ważnego składnika osłony komórkowej bakterii Gram-ujemnych*, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 58, 2004, 333-342.
24. Raetz C., Whitfield C., *Lipopolysaccharide Endotoxins*, *Annual Review of Biochemistry*, 71, 2002, 635-700.
25. Tichaczek-Goska D., Cisowska A., *Wybrane właściwości lipopolisacharydów bakterii Gram-ujemnych zawierających mannan w łańcuchu O-swoistym*, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 16, 2007, 105-112.
26. Pietretti D., Wiegertjes G., *Ligand specificities of Toll-like receptors in fish: indications from infection studies*, *Developmental and Comparative Immunology*, 43, 2014, 205-222.
27. Antychowicz J., *Rola makrofagów i centrów melano-makrofagowych w odporności ryb*, *Życie Weterynaryjne*, 89, 2014, 28-35.
28. Alexander C., Rietschel E., *Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity*, *Journal of Endotoxin Research*, 7, 2001, 167-202.
29. Saluk-Juszczak J., Wachowicz B., *Aktywność biologiczna lipopolisacharydu bakteryjnego*, *Acta Universitatis Lodzianensis Folia Biochemica et Biophysica*, 14, 1999, 55-69.
30. Sepulcre M., Alcaraz-Perez F., Lopez-Munoz A., Roca F.J., Meseguer J., Cayuela M., Mulero V., *Evolution of lipopolysaccharide (LPS) recognition and signaling: fish TLR4 does not recognize LPS and negatively regulates NF- $\kappa$ B activation*, *Journal of Immunology*, 18, 2011, 1837-1845.

31. Wang Z., Li J., Altman E., *Structural characterization of the lipid a region of Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida lipopolysaccharide*, Carbohydrate Research, 341, 2006, 2816-2825.
32. Dworaczek K., Kurzylewska M., Karaś M., Janczarek M., Pękała-Safińska A., Turska-Szewczuk A., *A unique sugar L-perosamine (4-amino-4,6-dideoxy-L-mannose) is a compound building two O-chain polysaccharides in the lipopolysaccharide of Aeromonas hydrophila strain JCM 3968, serogroup O6*, Marine drugs, 17, 2019, 254.
33. Knirel Y., Vinogradov E., Jimenez N., Merino S., Tomas J., *Structural studies on the R-type lipopolysaccharide of Aeromonas hydrophila*, Carbohydrate Research, 339, 2004, 787-793.
34. Wang Z., Li J., Vinogradov E., Altman E., *Structural studies of the core region of Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida lipopolysaccharide*, Carbohydrate Research, 341, 2006, 109-117.
35. Turska-Szewczuk A., Lindner B., Komaniecka I., Kozinska A., Pekala A., Choma A., Holst O., *Structural and immunochemical studies of the lipopolysaccharide from the fish pathogen, Aeromonas bestiarum strain K296, serotype O18*, Marine Drugs, 11, 2013, 1235-1255.
36. Turska-Szewczuk A., Duda K., Schwudke D., Pękała A., Kozińska A., Holst O., *Structural studies of the lipopolysaccharide from the fish pathogen Aeromonas veronii strain Bs19, serotype O16*, Marine Drugs, 12, 2014, 1298-1316.
37. Wang Z., Vinogradov E., Larocque S., Harrison B., Li J., Altman E., *Structural and serological characterization of the O-chain polysaccharide of Aeromonas salmonicida strains A449, 80204 and 80204-1*, Carbohydrate Research, 340, 2005, 693-700.
38. Wang Z., Liu X., Dacanay A., Harrison B., Fast M., Colquhoun D., Lund V., Brown L., Li J., Altman E., *Carbohydrate analysis and serological classification of typical and atypical isolates of Aeromonas salmonicida: a rationale for the lipopolysaccharide-based classification of A. salmonicida*, Fish Shellfish Immunology, 23, 2007, 1095-1106.
39. Kozińska A., Pękała A., *Serotyping of Aeromonas species isolated from polish fish farms in relation to species and virulence phenotype of the bacteria*, Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 54, 2010, 315-320.
40. Turska-Szewczuk A., Kozińska A., Russa R., Holst O., *The structure of the O-specific polysaccharide from the lipopolysaccharide of Aeromonas bestiarum strain 207*, Carbohydrate Research, 345, 2010, 680-684.
41. Turska-Szewczuk A., Guz L., Lindner B., Pietras H., Russa R., Holst O., *Structural characterization of the O-specific polysaccharide from the lipopolysaccharide of the fish pathogen Aeromonas bestiarum strain P1S*, Carbohydrate Research 346, 2011, 815-821.
42. Cao H., Wang M., Wang Q., Xu T., Du Y., Li H., *Identifying genetic diversity of O antigens in Aeromonas hydrophila for molecular serotype detection*, PLoS ONE 13, 2018, e0203445. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203445>
43. Liu D., Knirel Y., Feng L., Perepelov A., Senchenkova S., *Structural diversity in Salmonella O antigens and its genetic basis*, FEMS Microbiology Reviews 38, 2014, 56-89.
44. Reeves, P., *Role of O-antigen variation in the immune response*, Trends in Microbiology, 3, 1995, 381-386.
45. Kupferschmied P., Chai T., Flury P., Blom J., Smits T., Maurhofer M., *Specific surface glycan decorations enable antimicrobialpeptide resistance in plant-beneficial pseudomonads with insect-pathogenic properties*, Environmental Microbiology, 18, 2016, 4265-4281.
46. Sukenda S., Romadhona E., Yuhana M., Pasaribu W., Hidayatullah D., *Efficacy of whole-cell and lipopolysaccharide vaccine of Aeromonas hydrophila on juvenile tilapia*

- Oreochromis niloticus* against motile aeromonad septicemia, AACL Bioflux, 11, 2018, 1456-1466.
47. Dehghani S., Akhlaghi M., Dehghani M., *Efficacy of formalin-killed, heat-killed and lipopolysaccharide vaccines against motile aeromonads infection in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*, Global Veterinaria, 9, 2012, 409-415.
  48. Guz L., *Rozprawy Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, Immunogenność szczepów z rodzaju Aeromonas. Doświadczalne szczepionki przeciwko MAI/MAS karpia*, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Lublin 2011.
  49. Noonan B., Trust T.J., *The synthesis, secretion and role in virulence of the paracrystalline surface protein layers of Aeromonas salmonicida and A. hydrophila*, FEMS Microbiology Letters, 154, 1997, 1-7.
  50. Czaczyk K., Myszka K., *Mechanizmy warunkujące oporność biofilmów bakteryjnych na czynniki antymikrobiologiczne*, Biotechnologia, 1 (76), 2007, 40-52.
  51. Kunicki-Goldfinger W., *Życie bakterii*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.
  52. Gavin R., Rabaan A., Merino S., Tomas J., Gryllos I., Shaw J., *Lateral flagella of Aeromonas species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation*, Molecular Microbiology, 43, 2002, 383-397.
  53. Mikucki J., Lisiecki P., *Siderofory – agresyny bakterii*, Postępy Mikrobiologii, 37, 1998, 73-97.
  54. Origgi F., Benedicenti O., Segner H., Sattler U., Wahli T., Frey J., *Aeromonas salmonicida type III secretion system-effectors-mediated immune suppression in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*, Fish and Shellfish Immunology, 60, 2017, 169-182.
  55. Krawicka E., Raczkowska A., Brzostek K., *Mechanizmy sekrecji bakterii gram-ujemnych – system sekrecji I i III*, Postępy Mikrobiologii, 45, 2006, 139-152.
  56. Ferguson M.R., Xu X.J., Houston C.W., Peterson J.W., Coppenhaver D.H., Popov V.L., Chopra A.K., *Hyperproduction, purification and mechanism of action of the cytotoxic enterotoxin produced by Aeromonas hydrophila*, Infection and Immunity, 65, 1997, 4299-4308.
  57. Albert M., Ansaruzzaman M., Talukder K., Chopra A., Kuhn I., Rahman M., Faruque A.S.G., Islam M.S., Sack R.B., Mollby R., *Prevalence of enterotoxin genes in Aeromonas sp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment*, Journal of Clinical Microbiology, 38, 2000, 3785-3790.
  58. Chopra A., Houston C., *Enterotoxins in Aeromonas-associated gastroenteritis*, Microbes and Infection, 1 (13), 1999, 1129-1137.
  59. Zhu D., Li A., Wang J., Li M., Cai T., *Cloning, expression and characterization of arolysin from Aeromonas hydrophila in Escherichia coli*, Indian Journal of Biochemistry and Biophysics, 44, 2007, 204-208.
  60. Geny B., Popoff M., *Bacterial protein toxins and lipids: pore formation or toxin entry into cells*, Biology of Cell, 98, 2006, 667-678.
  61. Eggset G., Bjomsdottir R., Leifson M., Amesen J., Coucheron D., Jorgensen T., *Extracellular glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase from Aeromonas salmonicida: activation by serine protease*, Journal of Fish Diseases, 17, 1994, 17-29.
  62. Nitta H., Imamura T., Wada Y., Irie A., Kobayashi H., Okamoto K., Baba H., *Production of C5a by ASP, a serine protease released from Aeromonas sobria*, The Journal of Immunology, 181, 2008, 3602-3608.

## Czynniki wirulencji bakterii z rodzaju *Aeromonas* sp. izolowanych od ryb

### Streszczenie

*Aeromonas* to Gram-ujemne, fakultatywnie beztlenowe, niewytwarzające przetrwalników, heterotroficzne pałeczki. Są głównie patogenami zwierząt zmiennocieplnych. Można podzielić je na dwie grupy: gatunki nieruchliwe i psychofilne, np. *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* i *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* oraz gatunki ruchliwe i mezofilne, do których zalicza się m.in.: *A. hydrophila*, *A. caviae* i *A. sorbia*, które są czynnikiem etiologicznym infekcji ryb w Polsce. Powszechnym miejscem bytowania *Aeromonas* jest środowisko wodne, gdzie tworzą autochtoniczną mikrobiotę. Pałeczki *Aeromonas* występują także w glebie, mięsie, warzywach, rybach, owocach morza i przetworzonej żywności. Pałeczki *Aeromonas* sp. U ryb powodują: posocznicę MAS, MAI, chorobę płetw (finrot), „red sore”, czyraka mnogiego i erythrodermatozę. Do najważniejszych czynników determinujących patogenność *Aeromonas* można zaliczyć: białka błony zewnętrznej OMPs (Outer membrane proteins), polisacharydy powierzchniowe: kapsularne polisacharydy (CPS, capsular polysaccharide), lipopolisacharyd (LPS, lipopolysaccharide),  $\alpha$ -glukan, warstwę powierzchniową S, fimbrie i inne czynniki adhezyjne, system wiążący żelazo, systemy sekrecyjne oraz egzotoksyny: hemolizyny, proteazy, cytotoksyny, nukleazy i acetylocholinoesterazy.

Słowa kluczowe: bakterie z rodzaju *Aeromonas*, czynniki wirulencji, posocznica krwotoczna MAS, MAI, białka błony zewnętrznej, polisacharyd kapsularny, lipopolisacharyd,  $\alpha$ -glukan, warstwa powierzchniowa S, fimbrie, system wiążący żelazo, hemolizyna, acetylocholinoesteraza

## Virulence factors for bacteria of the genus *Aeromonas* sp. isolated from fish

### Abstract

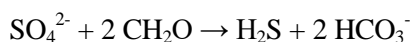
*Aeromonas* are Gram-negative, optional anaerobic, spore-free, heterotrophic chopsticks. They are mainly pathogens of poikilotherm animals. They can be divided into two groups: immobile and psychophilic species, e.g. *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* and *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*, and mobile and mesophilic species, which include among others: *A. hydrophila*, *A. caviae* and *A. sorbia*, which are etiological factors of fish infection in Poland. The common habitat of *Aeromonas* is the aquatic environment, where they form an autochthonous microbiota. *Aeromonas* is also found in soil, meat, vegetables, fish, seafood and processed food. *Aeromonas* sp. in fish cause: MAS, MAI, fin disease (finrot), red sore, multiple boil and erythrodermatosis. The most important factors determining the pathogenicity of *Aeromonas* include: Outer membrane proteins (OMPs), surface polysaccharides: capsular polysaccharides (CPS), lipopolysaccharide (LPS),  $\alpha$ -glucan, S-layer, fimbriae and other adhesion factors, iron-binding system, secretory systems and exotoxins: hemolysins, proteases, cytotoxins, nucleases and acetylcholinesterases.

Keywords: bacteria of the genus *Aeromonas*, virulence factors, MAS, MAI, outer membrane proteins, capsule polysaccharide, lipopolysaccharide,  $\alpha$  glucan, surface layer S, fimbria, iron binding system, hemolysine, acetylcholinesterase

## Udział sulfidogennych zespołów mikroorganizmów w procesie powstawania żelazowych (II) faz mineralnych

### 1. Wprowadzenie

Przez wiele lat uważano, iż za kształtowanie litosfery odpowiedzialne są jedynie czynniki abiotyczne. Obecnie w literaturze napotyka się coraz więcej doniesień świadczących o znaczącym udziale czynnika biotycznego w procesach geochemicznych, zachodzących w środowisku naturalnym. Bardzo często badania mineralogiczne i petrologiczne skał oraz tworzących je minerałów, dokumentują struktury, które powstają przy pośrednim lub bezpośrednim udziale mikroorganizmów. Ta mikrobialna aktywność przejawia się niemal we wszystkich przypowierzchniowych środowiskach geologicznych. Rola mikroorganizmów w procesach powstawania różnorodnych faz mineralnych ma wymiar wieloaspektowy, powiązany często z procesami metabolicznymi przeprowadzanymi przez różnorodne grupy organizmów. Jednym z takich procesów metabolicznych jest biologiczne utlenianie lub redukcja metali, w wyniku czego następuje tzw. biotransformacja pierwiastka i przejście od jego formy rozpuszczalnej w mniej rozpuszczalną, co jednocześnie prowadzi do zmian parametrów fizykochemicznych środowiska, m.in. pH. Zmiany wykładnika stężenia jonów wodorowych prowadzą do przesunięcia równowagi chemicznej pomiędzy formami metali występującymi w roztworze oraz do zmian powinowactwa adsorpcyjnego pierwiastka do otoczek i ścian komórkowych bakterii. W środowiskach alkalicznych powstają najczęściej słabo rozpuszczalne związki metali, podczas gdy w środowiskach o niskich wartościach pH dominują rozpuszczalne formy, w których metal występuje w postaci jonowej [1, 2]. Na szczególną uwagę zasługują bezwzględnie beztlenowe mikroorganizmy, biorące udział w biogeochemicznym obiegu siarki – mikroorganizmy redukujące siarczany (MRS). Procesy metaboliczne przeprowadzane przez tę grupę mikroorganizmów prowadzą często do powstania siarczkowych minerałów różnych metali, m.in. chalkozynu, covellinu, pirytu czy sfalerytu [3, 4]. MRS, do których zaliczamy bakterie i archeony, należące do organizmów heterotroficznych, uzyskują energię wskutek utleniania związków organicznych, które stanowią donor elektronów w procesie oddechowym. Następnie wolne elektrony przenoszone są na jony siarczanowe. Wszystkie zaliczane do tej grupy drobnoustroje wykorzystują utlenione związki siarki (siarczany, tiosiarczany itp.) jako ostateczny akceptor elektronów [5], które zostają zredukowane do siarki elementarnej lub/i jonu  $S^{2-}$ . Skrócony zapis reakcji redukcji siarczanów został przedstawiony poniżej [6]:

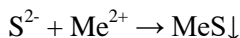


---

<sup>1</sup> a.rozek@uw.edu.pl, Instytut Geochemii, Mineralogii i Petrologii, Wydział Geologii, Uniwersytet Warszawski, www.geo.uw.edu.pl.



Końcowymi produktami oddychania siarczanowego są toksyczny siarkowodor i jon wodorowęglanowy, które zostają uwolnione do otoczenia. Obecność MRS w środowisku sprzyja kumulowaniu się jonów  $S^{2-}$ , które w obecności jonów metali, w odpowiednich warunkach, biorą udział w reakcji, której produktem jest siarczek danego metalu [7-9]:



Ponadto uważa się, że duże znaczenie w precypitacji siarczków mogą mieć również polimery zewnątrzkomórkowe (EPS) wytwarzane przez komórki tych mikroorganizmów. EPS tworzą swoistą macierz, której obecność umożliwia łączenie się komórek bakteryjnych w większe agregaty, co powoduje zwiększenie powierzchni czynnej dla gromadzenia wolnych kationów metali [4, 10].

Doniesienia literaturowe potwierdzają udział bakterii redukujących siarczany w powstawaniu siarczków, takich pierwiastków jak m.in. żelazo [11, 12], miedź [13, 14], cynk [15, 14] oraz Sb, Bi, Co, Cd, Pb, Ni [16, 17].

Dodatkowo, biorąc pod uwagę inne produkty oddychania siarczanowego można stwierdzić, że mikroorganizmy redukujące siarczany odgrywają również istotną rolę w powstawaniu minerałów węglanowych [18, 19]. W środowiskach pozbawionych tlenu, w warunkach sprzyjających redukcji siarczanów, może dojść do powstania specyficznych subs środowisk – mikronisz, a panujące tam warunki fizykochemiczne stymulują wytrącanie minerałów węglanowych na drodze biologicznej. Jeżeli w otaczającym środowisku obecne są jony wapnia w odpowiedniej ilości oraz występują optymalne czynniki fizykochemiczne, takie jak: zasadowe pH, niski potencjał redoks, odpowiednie stężenie związków organicznych, a także obecność zarodków krystalizacji, wówczas może dojść do wytrącania węglanu wapnia na drodze biologicznej [20].

Biorąc pod uwagę powyższe procesy można wnioskować, że proces dysymilacyjnej redukcji siarczanów może przyczyniać się do precypitacji siarczków różnych metali oraz powstawania biogenicznych węglanów.

## **2. Cel pracy**

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu aktywności sulfidogennych zespołów mikroorganizmów na proces powstawania żelazowych (II) faz mineralnych.

## **3. Materiały i metody**

### **3.1. Izolacja i selekcja sulfidogennych zespołów mikroorganizmów**

Mikroorganizmy izolowano z gleby zanieczyszczonej ropą naftową i metalami ciężkimi z okolicy kopalni ropy naftowej na terenie Karpat fliszowych (złóże ropy naftowej Wańkowa). Próbkę gruntu pobrano przy pomocy laski Egnera, z głębokości 40 cm, w odległości ok. 6 m od wylotu odwiertu eksploatacyjnego. Próbkę gleby pobrano w trzech powtórzeniach. Namnażanie wyizolowanych mikroorganizmów prowadzono metodą *microcosms*. Glebę (1 g – próbka zmieszana z trzech próbek indywidualnych) z badanego środowiska umieszczono w 100 ml pojemnikach i zalewano podłożem Postgate'a C [5]. Pojemniki szczelnie zamykano i inkubowano w ciemności przez 6 tygodni w temperaturze 25°C.

Beztlenowe hodowle stacjonarne prowadzono w butelkach szklanych o pojemności ok. 100 ml, szczelnie zamkniętych gumowymi korkami, przebitymi igłami z nasadzonymi na stałe strzykawkami, które służyły do wprowadzania inokulum i pobierania próbek. Stosunek inokulum do podłoża wynosił 1:10. Hodowle prowadzono na zmodyfikowanym podłożu Postgate'a C z etanolem (1,44 g/l) lub mleczanem sodu (3,82 g/l), jako jedynymi źródłami węgla. Wybór związków organicznych miał na celu określenie wpływu dodanego substratu na aktywność badanych mikroorganizmów, a w konsekwencji na rodzaj powstających w osadach pochodowlanych faz mineralnych. Do hodowli prowadzonych na danym źródle węgla dodawano  $\text{FeCl}_2$  w ilościach odpowiadających końcowemu stężeniu jonów żelaza (II): 100; 200; 400; 800  $\mu\text{g/ml}$ . Przygotowano także hodowle kontrolne bez dodatku  $\text{Fe}^{2+}$ . Każdy wariant hodowli przygotowano w trzech powtórzeniach. W sumie założono 30 hodowli, w 10 różnych wariantach. Beztlenowe hodowle stacjonarne inkubowano w temperaturze  $20^\circ\text{C}$  bez dostępu światła. pH hodowli wynosiło ok. 8,5. Podłoże mikrobiologiczne zostało przegazowane azotem.

### 3.2. Oznaczenia chemiczne w hodowlach stacjonarnych

Oznaczenia chemiczne prowadzono dla każdego z powtórzeń danego wariantu hodowli, a wyniki uśredniano. Stężenia jonów siarczanowych oznaczano metodą turbidymetryczną [20], z zastosowaniem chlorku baru jako odczynnika reakcyjnego. Oznaczenia prowadzono na spektrofotometrze Thermo (Genesis 10VIS, Thermo) przy długości fali  $\lambda = 420 \text{ nm}$ . Stopień redukcji siarczanów wyliczono wykorzystując dane z krzywej zależności pomiędzy % transmitancji a stężeniem  $\text{SO}_4^{2-}$  (mg/l).

W celu określenia aktywności metabolicznej mikroorganizmów w prowadzonych hodowlach oznaczano wskaźnik ChZT, który jest pomocny w określeniu stopnia biodegradacji związków organicznych. Oznaczenia wartości ChZT wykonano metodą dichromianową [22]. Analizę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzono za pomocą testu HSD Tukey'a.

Oznaczenia żelaza przeprowadzono metodą kolorymetryczną, stosując 1,10 fenantrolinę dla żelaza (II) i 5% roztwór wodny tiocyjanianu amonu dla żelaza (III).

W celu potwierdzenia obecności sulfidogennych zespołów mikroorganizmów w hodowlach na podłożu Postgate'a wykorzystano test Easicult S (Orion Diagnostica).

### 3.3. Analiza składu mineralnego osadów pochodowlanych

Po okresie inkubacji testowe hodowle zostały odwirowane (1700 rpm), a uzyskany osad suszono w temperaturze  $28^\circ\text{C}$ . Otrzymany materiał homogenizowano w móżdżerku agatowym. Tak przygotowane osady pochodowlane poddano analizie pod względem składu fazowego metodą proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej.

Analizę dyfraktometryczną przeprowadzono na dyfraktometrze X Pert Pro MPD w klasycznym układzie Bragg-Brentano. Wyniki zostały przeanalizowane z wykorzystaniem oprogramowania PANalytical Xpert High Score Plus.

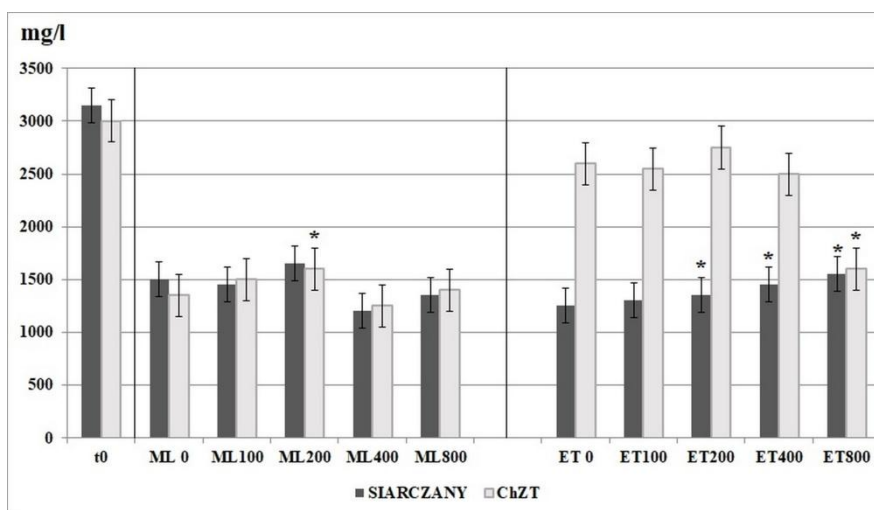
## 4. Analiza wyników

### 4.1. Izolacja i selekcja beztlenowych zespołów MRS

We wszystkich założonych hodowlach, bez względu na wariant zastosowanego źródła węgla, stwierdzono aktywność mikroorganizmów redukujących siarczany, objawiającą się wydzielaniem siarkowodoru i zaciemnieniem podłoża na skutek powstającego siarczku żelaza. Aktywność MRS potwierdził również pozytywny wynik testu Easicult S.

### 4.2. Oznaczenia chemiczne w hodowlach stacjonarnych

We wszystkich hodowlach stacjonarnych prowadzonych na zmodyfikowanym podłożu Postgate'a C stwierdzono aktywną redukcję siarczanów (wykres 1).



Wykres 1. Stopień redukcji siarczanów i ChZT w hodowlach wyselekcjonowanych sulfidogennych zespołów mikroorganizmów na zmodyfikowanym podłożu Postgate'a C z mleczanem (ML) i etanolem (ET) jako jedynymi źródłami węgla. Oznaczenia: t<sub>0</sub> – czas założenia hodowli (ChZT/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> = 0,95), 100-800 – stężenie jonów żelaza (µg/ml). Istotność statystyczną różnic między hodowlami o różnych stężeniach jonów żelaza a hodowlą kontrolną (ML 0 i ET 0) oznaczono w następujący sposób: \* p < 0,05 [Opracowanie własne]

We wszystkich hodowlach, niezależnie od wariantu źródła węgla stwierdzono aktywną redukcję siarczanów. Maksymalną redukcję siarczanów zanotowano w hodowli zawierającej 400 µg/ml jonów żelaza (II). Poziom redukcji wynosił 1950 mg/l SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, co odpowiada 62% siarczanów wprowadzonych do podłoża. We wszystkich hodowlach obserwowano biodegradację związków organicznych, której przejawem była redukcja ChZT. Wyższą redukcję ChZT odnotowano w próbkach z mleczanem sodu w porównaniu do hodowli prowadzonych na etanolu. Najwyższą redukcję ChZT – ok. 1750 mg O<sub>2</sub>/L (co odpowiada 58% redukcji ChZT) odnotowano w hodowli z dodatkiem mleczanu, gdzie redukcja siarczanów była najwyższa, tym samym była to najbardziej aktywna hodowla. Najniższą aktywność w biodegradacji związków organicznych – ok. 250 mg O<sub>2</sub>/L (co odpowiada jedynie 8% redukcji ChZT)

wykazały zespoły mikroorganizmów w hodowli na podłożu Postgate'a z etanolem jako jedynym źródłem węgla i jonami żelaza w stężeniu 200 µg/ml.

Dodatkowo we wszystkich hodowlach stacjonarnych stwierdzono znaczną redukcję stężenia jonów żelaza (II) (tabela 1). Spadek stężenia  $Fe^{2+}$  odnotowano na średnim poziomie 50%.

Tabela 1. Stopień redukcji jonów żelaza (II) w hodowlach wyselekcjonowanych sulfidogennych zespołów mikroorganizmów na zmodyfikowanym podłożu Postgate'a C z mleczanem (ML) i etanolem (ET) jako jedynymi źródłami węgla

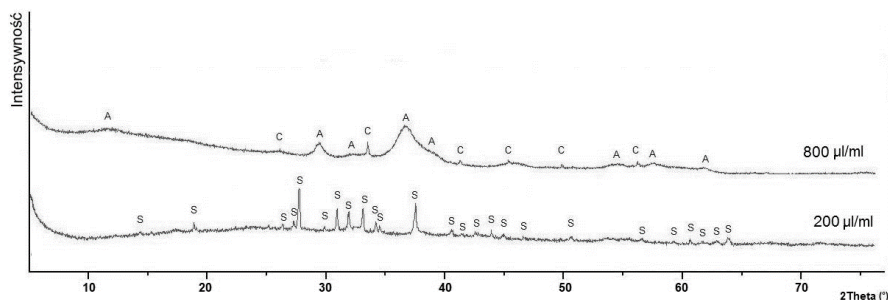
Źródło węgla	$Fe^{2+}$ [µg/ml]		Różnica stężenia Fe (II) ( $t_0-t_{28}$ )	% spadku stężenia Fe(II)
	$t_0$	$t_{28}$		
ML100	100	78	22	22
ML200	200	118	82	41
ML400	400	189	211	52
ML800	800	247	553	69
ET100	100	37	63	63
ET200	200	110	90	45
ET400	400	152	248	62
ET800	800	222	578	72

Źródło: Opracowanie własne

We wszystkich hodowlach stwierdzono spadek żelaza (II), nie stwierdzono zaś wzrostu stężenia żelaza (III). Najwyższy % spadku stężenia jonów żelaza (II) odnotowano w hodowlach, gdzie  $FeCl_2$  został dodany w najwyższych stężeniach, bez względu na wariant zastosowanego źródła węgla. Ubytek żelaza (II) może wskazywać na powstawanie, w wyniku aktywności metabolicznej MRS, trudno rozpuszczalnych faz mineralnych, takich jak np. siarczki żelaza.

### 4.3. Analiza dyfraktometryczna osadów pohodowlanych

W celu określenia składu mineralnego osadów pohodowlanych, po zakończeniu inkubacji wyizolowanych sulfidogennych zespołów mikroorganizmów, osady te poddano analizie dyfraktometrycznej. Wyniki proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej osadów pohodowlanych pochodzących z hodowli prowadzonych na zmodyfikowanym podłożu Postgate'a C z etanolem i mleczanem, jako jedynymi źródłami węgla przedstawiają wykres 2 oraz tabela 2.



Wykres 2. Przykładowe dyfraktogramy proszkowe osadów pochodzących z próbek z dodatkiem mleczanu jako źródła węgla oraz jonów Fe (II) w stężeniach 200 i 800 µg/ml. [Opracowanie własne]

Tabela 2. Skład fazowy osadów pochodzących w zależności od zastosowanego źródła węgla i stężenia jonów żelaza w podłożu

Źródło węgla	Fe <sup>2+</sup> [µg/ml]	Skład fazowy osadów pochodzących
ML 0	0	gips (CaSO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O), anhydryt (CaSO <sub>4</sub> )
ML100	100	struwit (NH <sub>4</sub> )Mg[PO <sub>4</sub> ] · 6 H <sub>2</sub> O
ML200	200	siarka elementarna S <sub>8</sub>
ML400	400	gips (CaSO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O), anhydryt (CaSO <sub>4</sub> ), kalcyt, wteryt (CaCO <sub>3</sub> )
ML800	800	anhydryt (CaSO <sub>4</sub> ), kalcyt (CaCO <sub>3</sub> )
ET 0	0	gips (CaSO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O)
ET100	100	anhydryt (CaSO <sub>4</sub> )
ET200	200	anhydryt (CaSO <sub>4</sub> ), kalcyt (CaCO <sub>3</sub> )
ET400	400	anhydryt (CaSO <sub>4</sub> ), kalcyt (CaCO <sub>3</sub> )
ET800	800	gips (CaSO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O)

Źródło: Opracowanie własne

W procesie dysymilacyjnej redukcji siarczanów MRS przeprowadzają redukcję jonów siarczanowych do jonu S<sup>2-</sup> [23]. Stąd istnieje możliwość pojawienia się w osadach pochodzących zredukowanych związków siarki, dużych ilości jonów S<sup>2-</sup>. Na skład fazowy powstających w hodowlach produktów mają także wpływ związki chemiczne wchodzące w skład wykorzystanego w badaniach podłoża mikrobiologicznego, w szczególności, takie jak fosforany (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), siarczany (MgSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>), chlorki (CaCl<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>Cl).

Wyniki proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej osadów pochodzących wskazują na obecność głównie węglanów, takich jak kalcyt czy wteryt, oraz siarczanów m.in. gipsu i anhydrytu. Dane literaturowe [18, 20, 24] wskazują, że w odpowiednich warunkach fizykochemicznych (zasadowe pH, odpowiednia temperatura i niski potencjał redoks) oraz w obecności jonów wapnia, w warunkach sprzyjających redukcji siarczanów może dojść do wytrącania węglanu wapnia na drodze biologicznej. Mechanizm tego procesu jest bezpośrednio powiązany z dysymilacyjną redukcją siarczanów przeprowadzaną przez MRS, w obecności odpowiednich donorów elektronów. Biodegradacja związków organicznych zachodząca z udziałem sulfidogennych zespołów mikroorganizmów prowadzi do uwolnienia jonu wodorowęglanowego, stanowiąc tym samym pierwszy etap procesu biologicznego wytrącania węglanu wapnia.

Interesującym wydaje się fakt, że nie odnotowano obecności siarczków (zwłaszcza siarczków żelaza) w osadach pochodowlanych, izolowanych z hodowli, w których stwierdzono wysoką aktywność sulfidogennych zespołów mikroorganizmów. Wyniki te nie muszą świadczyć o rzeczywistym braku siarczków w hodowlach prowadzonych na zmodyfikowanym podłożu Postgate'a C, lecz np. o ich amorficzności. Podobne badania dotyczące m.in. udziału bakterii redukujących siarczany w powstawaniu siarczków i węglanów żelaza przeprowadziła Wolicka [4]. Autorka zastosowała dodatek żelaza (II) w stężeniach 0,1-1,0 g/l. Wyniki proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej osadów pochodowlanych wskazały na obecność głównie siarki elementarnej oraz węglanów, takich jak kalcyt, dolomit i syderyt. Osady zawierające węglany zostały poddane badaniom składu izotopowego węgla. Uzyskane przez Autorkę wyniki potwierdziły, że analizowane fazy mineralne zawierające węgiel są pochodzenia biogenicznego (średnia wartość  $\delta^{13}\text{C}$  wyniosła  $-27\%$  VPDB). W omawianych badaniach również nie stwierdzono obecności siarczków. Zdaniem Wolickiej [4] podstawowym problemem w oznaczaniu siarczkowych faz mineralnych w osadach mógł być ich amorficzny charakter. Wytracone amorficzne związki chemiczne są niemożliwe do stwierdzenia metodą proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej. Ponadto często wytracone w postaci amorficznej związki chemiczne zostają zagregowane wraz z polimerami typu EPS powstającymi wskutek aktywności życiowej np. bakterii redukujących siarczany. Wówczas stwierdzenie obecności takich kompleksów „minerał-EPS” metodą proszkowej dyfrakcji rentgenowskiej staje się niemożliwe.

Inni Autorzy, Han i współpracownicy (2016), przebadali wpływ dodatku różnorodnych źródeł węgla na rodzaj powstających faz mineralnych w hodowlach *Desulfovibrio alaskensis* G20 – przedstawiciela bakterii redukujących siarczany. Wyniki ich badań potwierdziły obecność kalcytu w hodowlach z dodatkiem mrówczanu, fosforany Mg i kalcyt wytraściły się, gdy wodór służył jako donor elektronów a octan i rozpuszczony węgiel nieorganiczny jako źródła węgla. Badacze Ci potwierdzili także obecność siarki elementarnej w hodowlach z dodatkiem mleczanu, co jest zgodne z wynikami XRD prezentowanymi w niniejszej pracy (hodowla ML z dodatkiem 200  $\mu\text{g/ml Fe}^{2+}$ ) [25].

Istnieją również doniesienia literaturowe na temat wpływu formy żelaza, dodanego do hodowli reduktorów siarczanów, na skład mineralny osadu. Luptáková i współpracownicy (2012) zastosowali dodatek jonów Fe w formie  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , hodowle prowadzono z dodatkiem mleczanu sodu. Wyniki badań XRD wskazały na obecność głównie siarki, greigitu  $\text{Fe}_3\text{S}_4$  i makinawitu FeS we wszystkich próbkach biotycznych, niezależnie od formy dodanego żelaza, oraz paramagnetycznego wiwianitu  $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8(\text{H}_2\text{O})$  w próbach abiotycznych. Dodatkowo autorzy sugerują, że siarczki powstałe jako produkty biomineralizacji posiadają niską krystaliczność. Rozmiary krystalitów uzyskane w badanych układach mieszczą się w zakresie 2-5 nm w przypadku makinawitu oraz od 11 do 45 nm dla greigitu [26]. Zhou i współpracownicy (2014) udowodnili wpływ warunków prowadzenia hodowli (wartość wykładnika stężenia jonów wodorowych, rodzaj oraz stężenia donora elektronów oraz ilość dostępnego w układzie jonu siarczkowego) na proces krystalizacji siarczków żelaza. Warunki eksperymentalne obejmowały zakres pH od lekko kwaśnego (5,5) do zasadowego (9,5), różne stosunki ilościowe donora elektronów

jakim był mleczan do stężenia  $\text{SO}_4^{2-}$  oraz różne stosunki stężeniowe  $\text{Fe}:\text{SO}_4^{2-}$ . Wielkość krystalitów otrzymanego w osadach makinawitu była najwyższa, gdy pH początkowe hodowli oscyloowało w okolicy lekko kwaśnego (ok. 23,2 nm dla pH 6,5) w porównaniu do próbek o wyższych wartościach tego wykładnika (odpowiednio 4,4 nm dla pH = 8,6). Wyższa wartość stosunku mleczan: $\text{SO}_4^{2-}$  wpłynęła pozytywnie na rozmiar kryształów makinawitu, a w próbach gdzie iloraz ten był najwyższy odnotowano również obecność greigitu. Podobny trend wykazano dla stosunku  $\text{Fe}:\text{SO}_4^{2-}$ , im wyższa była jego wartość, tym dokumentowano większe rozmiary krystalitów [27].

Picard i współpracownicy (2018) również donoszą o kluczowej roli MRS polegającej na dostarczeniu jonu  $\text{S}^{2-}$  niezbędnego dla procesu nukleacji siarczków żelaza. Praca ta wskazuje także na niebagatelną rolę komórek bakteryjnych i wytwarzanych pozakomórkowo EPS jako zarodków krystalizacji minerałów. Autorzy zwracają także uwagę na fakt, że wielkość i morfologia biogenicznych minerałów jest inna niż tych, które krystalizowały na drodze abiotycznej. W tym przypadku wyniki analizy XRD również potwierdziły obecność makinawitu, który po kilku miesiącach przetransformował w greigit, w hodowlach *Desulfovibrio hydrothermalis* AM13 [28].

Obecność takich faz mineralnych, jak gips ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), anhydryt ( $\text{CaSO}_4$ ) czy struwit ( $(\text{NH}_4)\text{Mg}[\text{PO}_4] \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ), może być efektem składu chemicznego zastosowanego podczas namnażania zmodyfikowanego podłoża Postgate'a C.

Wyniki badań XRD wskazują, że stężenie jonów Fe (II) lub ich brak nie ma wpływu na rodzaj obecnych w osadach pochodzących faz mineralnych.

## 5. Podsumowanie

Sulfidogenne zespoły mikroorganizmów wyselekcjonowane z gleby zanieczyszczonej ropą naftową i metalami ciężkimi charakteryzowały się wysoką aktywnością metaboliczną. We wszystkich badanych hodowlach stwierdzono aktywną redukcję siarczanów (max. 62%) oraz biodegradację zastosowanych związków organicznych: mleczanu sodu (max. 58%) i etanolu na poziomie 48%.

Dodatkowo we wszystkich hodowlach stwierdzono spadek stężenia żelaza (II) na maksymalnym poziomie 72%, nie stwierdzono zaś wzrostu stężenia żelaza (III). Wynik ten może wskazywać na fakt, że jeśli doszło do utleniania żelaza (II) do (III), to było ono szybko zredukowane przez  $\text{H}_2\text{S}$  powstający w procesie dysymilacyjnej redukcji siarczanów. Jednym z innych produktów tej reakcji jest siarka elementarna, której obecność w osadach pochodzących potwierdzają wyniki badań XRD.

Aktywność MRS w badanych hodowlach przyczyniła się do powstawania, poza siarką elementarną, innych faz mineralnych jako produktów ich metabolizmu. Bardzo interesującym wynikiem jest uzyskanie w osadach pochodzących z hodowli prowadzonych na zmodyfikowanym podłożu Postgate'a C, zarówno z dodatkiem mleczanu, jak i etanolu, węglanowych faz mineralnych, takich jak kalcyt czy rzadki wateryt. Wymienione minerały mogą powstawać w wyniku reakcji biochemicznych przeprowadzanych przez drobnoustroje, w tym mikroorganizmy redukujące siarczany [29].

## Literatura

1. Wierzba S., Latała A., *Biosorption lead(II) and nikel(II) from an aqueous solution by bacterial biomass*, Polish Journal of Chemical Technology, 12(3), 2010, 72-78.
2. Wierzba S., *Heavy metals biosorption from aqueous solution by Pseudomonas sp. G1*, Proceedings of ECOpole, 4(1), 2010, 85-89.
3. Wolicka D., *Microorganisms in crude oil and formation waters*, Nafta i gaz, 66(4), 2010, 267-273.
4. Wolicka D., *Biostymulacja procesów geochemicznych w warunkach beztlenowych w środowiskach glebowych zanieczyszczonych ropą naftową*, [w:] Kozłowski A (red.), Archivum Mineralogiae Monograph No. 3, Wydawnictwa Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa 2011, 39-83.
5. Postgate J.R., *The Sulfate-Reducing Bacteria*, Cambridge University Press, Cambridge 1984.
6. Shen Y., Buick R., *The antiquity of microbial sulfate reduction*, Earth Science Reviews, 64(3), 2004, 243-272.
7. Ehrlich H.L., *Geomicrobiology*, Marcel Dekker, New York 2001, 117-148.
8. Krouse H.R., Parafiniuk J., Nowak J., Halas S., *Millimeter scale variations in the isotopic composition of vein sulphide minerals in the Kupferschiefer deposits, Lubin area, SW Poland*, Isotopes in Environmental and Health Studies, 42(4), 2007, 327-333.
9. Sawłowicz Z., *On the origin of copper mineralization in the Kupferschiefer: a sulphur isotope study*, Terra Nova, 1(4), 1989, 339-343.
10. Podobas E., Rożek A., *Effect of copper upon the actions of sulphate-reducing bacteria isolated from soil contaminated by crude oil and heavy metals*, Environmental Protection and Natural Resources, 26(4), 2015, 20-25.
11. Johnston D.T., Farquhar J., Wing B.A., Kaufman A.J., Canfield D.E., Habicht K.S., *Multiple sulphur isotope fractionations in biological systems: a case study with sulphate reducers and sulphur disproportionators*, American Journal of Science, 305, 2005, 645-660.
12. Gramp P., Bigham J.M., Jones F.S., Tuovinen O.H., *Formation of Fe-sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria*, Journal of Hazardous Materials, 175(1-3), 2010, 1062-1067.
13. Gramp J.P., Sasaki K., Bigham J.M., Karnachuk O.V., Tuovinen O.H., *Formation of covellite (CuS) under biological sulfate-reducing conditions*, Geomicrobiology Journal, 23(8), 2006, 613-619.
14. Sahinkaya E., Gungor M., Bayrakdar A., Yucesoy Z., Uyanik S., *Separate recovery of copper and zinc from acid mine drainage using biogenic sulfide*, Journal of Hazard Materials, 171(1-3), 2009, 901-906.
15. Labrenz M., Druschel G.K., Thomsen-Ebert T., Gilbert B., Welch S.A., Kemner K.M., Logan G.A., Summons R.E., De Stasio G., Bond P.L., Lai B., Kelly S.D., Banfield J.F., *Formation of sphalerite (ZnS) deposits in natural biofilms of sulfate-reducing bacteria*, Science, 290(5497), 2000, 1744-1747.
16. Miller L.P., *Stimulation of hydrogen sulfide production by sulfate-reducing bacteria*, Boyce Thompson Institute, 15, 1949, 467-474.
17. Miller L.P., *Formation of metal sulfides through the activities of sulfate reducing bacteria*, Boyce Thompson Institute, 16, 1950, 85-89.
18. Perry C.T., Taylor K.G., *Inhibition of dissolution within shallow water carbonate sediments: impacts of terrigenous sediment input on syn-depositional carbonate diagenesis*, Sedimentology, 53(3), 2006, 495-513.
19. Wolicka D., Borkowski A., Dobrzyński D., *Interactions between microorganisms, crude oil and formation waters*, Geomicrobiology Journal, 27(1), 2010, 43-42.



20. Visscher P.T., *Stromatolites*, [w:] Crumley C.R. (red.), *Encyclopedia of Tide Pools and the Rocky Shore*, The University of California Press, California 2007, 551-554.
21. Moosa S., Nemati M., Harrison S.T.L., *A kinetic study on anaerobic reduction of sulphate, Part I: Effect of sulphate concentration*, *Chemical Engineering Science*, 57(14), 2002, 2773-2780.
22. Hermanowicz W., Dożańska W., Sikorowska C., Kelus J., *Physical and chemical research of wastewater*, Warszawa 1972.
23. Chen L., Le Gall J., Xavier A.V., *Purification, characterization and properties of an NADH oxidase from Desulfovibrio vulgaris (Hildenborough) and its coupling to adenyl phosphosulfate reductase*, *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 203(2), 1994, 839-844.
24. Wolicka D., Borkowski A., *Precipitation of CaCO<sub>3</sub> under sulphate-reduction condition*, [w:] Reitner J (red.), *Advances in Stromatolite Geology, Lecture Notes in Earth Sciences*, 2011, 151-160.
25. Han X., Schultz L., Zhang W., Zhu J., Meng F., Geesey G.G. *Mineral formation during bacterial sulfate reduction in the presence of different electron donors and carbon sources*, *Chemical Geology*, 2016, 435, 49-59.
26. Luptáková A., Jenčárová J., Jandačka P., Lupták M., Matysek D., Dernerová Foitová P., *Preparation of Magnetic Iron Minerals Using Sulphate-Reducing Bacteria*, *Inżynieria Mineralna*, 2012, 13(2), 21-29.
27. Zhou C., Vannela R., Hayes K.F., Rittmann B.E. *Effect of growth conditions on microbial activity and iron sulfide production by Desulfovibrio vulgaris*, *Journal of Hazardous Materials*, 2014, 272, 28-35.
28. Picard A., Gartman A., Clarke D.R., Girguis P.R. *Sulfate-reducing bacteria influence the nucleation and growth of mackinawite and greigite*, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2018, 220, 367-384.
29. Spring S., Sorokin D.Y., Verbarq S., Rohde M., Woyke T., Kyrpidis N.C. *Sulfate-Reducing Bacteria That Produce Exopolymers Thrive in the Calcifying Zone of a Hypersaline Cyanobacterial*, *Mat. Frontiers in Microbiology*, 2019, 10, 1-19.

## **Udział sulfidogennych zespołów mikroorganizmów w procesie powstawania żelazowych (II) faz mineralnych**

### **Streszczenie**

Celem badań było określenie wpływu aktywności bakterii cyklu siarkowego na proces powstawania żelazowych faz mineralnych. Przedmiot badań stanowiły sulfidogenne zespoły mikroorganizmów wyizolowane z gleby zanieczyszczonej ropą naftową i metalami ciężkimi. Podczas selekcji mikroorganizmów z grupy bakterii redukujących siarczan (BRS) zastosowano zmodyfikowane podłoże Postgate'a C z mleczanem sodu lub etanolem, jako jedynymi źródłami węgla. Do prowadzonych hodowli dodawano FeCl<sub>2</sub> w ilościach odpowiadających końcowemu stężeniu jonów żelaza 100-800 µg/ml.

Stwierdzono aktywną redukcję jonów siarczanowych (VI) oraz biodegradację związków organicznych, wyrażającą się redukcją ChZT. Maksymalną redukcję siarczanów na poziomie 62% zanotowano w hodowli z mleczanem, jako jedynym źródłem węgla i jonami żelaza w stężeniu 400 µg/ml. Wyższą redukcję ChZT odnotowano w próbkach z mleczanem sodu w porównaniu do hodowli prowadzonych na etanolu. We wszystkich badanych hodowlach aktywność bakterii redukujących siarczan objawiała się wydzielaniem siarkowodoru i zaczernieniem podłoża. Dodatkowo stwierdzono znaczną redukcję stężenia jonów żelaza (II) przy jednoczesnym braku wzrostu stężenia jonów Fe (III). Wyniki analiz rentgenograficznych sproszkowanych osadów pochodzących wykazały obecność węglanów (głównie kalcytu) oraz siarki elementarnej. Spadek stężenia jonów Fe (II) może wskazywać, że żelazo zostało zamknięte w trudno rozpuszczalnych fazach mineralnych. Wyniki XRD nie potwierdziły obecności siarczków, które stanowiłyby potencjalny produkt reakcji dysmilycyjnej redukcji siarczanów.

Słowa kluczowe: dysmilycyjna redukcja siarczanów, biogeniczne fazy mineralne

## **The role of sulfidogenic microbial communities in the formation of iron (II) mineral phases**

### **Abstract**

The aim of the study was to determine the effect of sulphidogenic microbial activity on the formation of iron mineral phases. The subject of the study were sulfidogenic microorganisms isolated from soil contaminated with crude oil and heavy metals. During the selection of microorganisms from the group of sulphate-reducing bacteria (SRB), a modified Postgate C medium was used with sodium lactate or ethanol, as the only carbon sources.  $\text{FeCl}_2$  was added to the cultures in quantities corresponding to a final concentration of iron ions of 100-800  $\mu\text{g/ml}$ .

An active reduction of sulphate ions (VI) and biodegradation of organic compounds was found expressing the reduction of COD. The maximum reduction of sulphates at the level of 62% was noted in the culture with lactate and iron ions at a concentration of 400  $\mu\text{g/ml}$ . Higher reduction of COD was recorded in samples with sodium lactate compared to cultures carried out on ethanol. In all studied cultures, the activity of sulphate-reducing bacteria was manifested by the release of hydrogen sulphide and the blackening of the medium. In addition, a significant reduction in the concentration of iron (II) ions was found with no increase in Fe (III) ions. The results of X-ray analysis of powdered post-culture sediments showed the presence of carbonates (mainly calcite) and elemental sulphur. The drop in the concentration of Fe (II) ions may indicate that the iron has been sealed in sparingly soluble mineral phases. The XRD results did not confirm the presence of sulphides, which would be a potential product of the dissimilatory sulphate reduction reaction.

**Keywords:** dissimilatory sulphate reduction, biogenic mineral phases

# Bioprospekcja antarktycznych psychrotolerancyjnych szczepów bakterii

## 1. Wstęp

Ziemska psychrosfera zajmuje około 90% obszarów wodnych i 70% terenów lądowych, z czego prawie 20% stanowi stale zamrożona kriosfera. Jednym ze szczególnych regionów psychrosfery jest zlokalizowana na biegunie południowym Antarktyka. Obszar ten charakteryzuje się bardzo niskimi temperaturami, dochodzącymi nawet do  $-89^{\circ}\text{C}$ , silnym promieniowaniem UV, deficytem substancji odżywczych, obszarami o dużym zasoleniu, a co najważniejsze obniżoną presją antropogeniczną. Obszary Antarktyki zamieszkałe są przez odpowiednio zaadaptowane, zimnolubne organizmy, które wykształciły szereg cech adaptacyjnych umożliwiającym im przeżycie w trudnych warunkach [1]. Odpowiednie adaptacje obejmują, między innymi, modyfikacje: błon komórkowych, białek (w tym enzymów), czy wytwarzanych metabolitów [2]. Zarówno obecność mikroorganizmów przystosowanych do ekstremalnych warunków środowiska, jak i ich wysoka bioróżnorodność zwiększają szansę na odkrycie innowacyjnych rozwiązań technologicznych i produktowych. Wiele enzymów, metabolitów oraz szczepionek bakteryjnych, działających wydajnie w niskich temperaturach, stanowi istotny element bioprospekcji i niesie potencjalne korzyści środowiskowe i ekonomiczne [3].

## 2. Bioróżnorodność Antarktyki

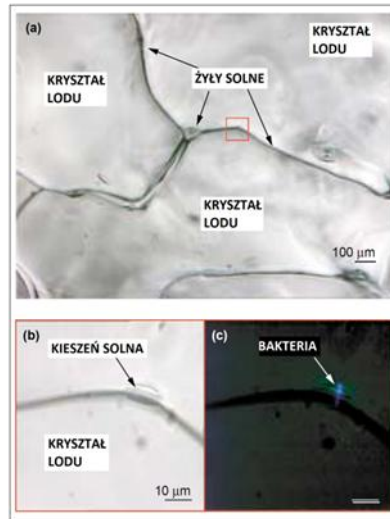
Antarktyda jest najwyższym, najzimniejszym, najbardziej wietrznym i najbardziej suchym kontynentem na Ziemi, o powierzchni wolnej od lodu nieprzekraczającej 0,3%. Obszary te stanowią przede wszystkim gleby, jeziora podlodowcowe, zbiorniki wodne ukryte wewnątrz skał, a także krioepgi, kriokonity i żyły solne (ang. *brine veins*) (rysunek 1) [4-6]. W tych wolnych od lodu przestrzeniach znajdują zimnolubne mikroorganizmy nazywane psychrotolerantami, psychrofilami lub kriofilami. Bakterie te zdolne są do wzrostu i reprodukcji w temperaturach osiągających nawet  $-17^{\circ}\text{C}$  [6]. Poza odpornością na niską temperaturę, organizmy te przystosowane są najczęściej dodatkowo do niskiej wilgotności środowiska, stresu osmotycznego, częstych cykli zamarzania – rozmarzania, deficytu organicznych i nieorganicznych składników odżywczych oraz silnego promieniowania słonecznego [5].

Wytworzone w lodzie struktury tworzą z czasem specyficzne mikro-środowiska życia, dzięki czemu obszary wiecznej zmarzliny charakteryzują się stosunkowo dużą bioróżnorodnością. Przykładem takich struktur są krioepgi, które dzięki zawartym w nich dużym stężeniom soli obniżają punkt zamarzania wody i tym samym umożliwiają życie mikroorganizmom. Ponadto, komórki bakteryjne zasiedlają często górną warstwę wiecznej zmarzliny (ang. *permafrost table*), która stanowi granicę między warstwą

---

<sup>1</sup> mstyczynski@biol.uw.edu.pl, Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, <http://ddg.biol.uw.edu.pl/>.

czynną (obszarem okresowo odmarzającym), a właściwą wieczną zmarzliną. Przenikająca, roztopiona woda przenika z warstwy aktywnej do wiecznej zmarzliny, dostarczając przy okazji m.in. substancje odżywcze. Innym przykładem są obecne w wiecznej zmarzlinie kliny lodowe, dzięki którym możliwa jest migracja bakterii z warstwy aktywnej do żył solnych (rysunek 1) obecnych w niższych warstwach lodu. Istotnym źródłem bioróżnorodności antarktycznej są również struktury nazywane kriokonitami. Powstają one wtedy, kiedy cząsteczka zdolna do akumulacji energii słonecznej znajdzie się na powierzchni lodu i prowadzi do roztopienia obszaru w jej otoczeniu. Warto podkreślić, że kriokonity są istotnym dla bakterii środowiskiem życia, zawierającym często wodę wraz z substancjami uwolnionymi z lodu i cząstek stałych [4].



Rysunek 1. Bakterie wizualizowane mikroskopowo metodą DAPI w żyłach solnych  
a) kryształy lodu i żyły wypełnione solanką; b) kryształ lodu i kieszeń solna w żyłce solnej;  
c) mikroorganizmy w kieszeni solnej wizualizowana metodą DAPI [7, 8]

Istotnym zagadnieniem jest również obecność i wymiana substancji odżywczych we wspomnianych mikro-środowiskach życia. Przestrzenie te zawierają wysokie stężenia soli, a także niewielkie ilości egzopolimerów i cząstek stałych, których przepływ i stały dostęp możliwy jest dzięki obecnym tam gradientom stężeń i temperatur. Dzięki niewielkiej, ale możliwej wymianie gazów oraz cząstek stałych w tych przestrzeniach mogą występować zarówno bakterie tlenowe, jak i beztlenowe [9].

### 3. Bioprospekcja

Terminem bioprospekcji określa się poszukiwanie nowych lub lepszych bioproduktów oraz procesów technologicznych mających swoje źródło w biologii (rysunek 2). Kluczowym elementem badań związanych z bioprospekcją jest znalezienie miejsca o specyficznej bioróżnorodności. Organizmy izolowane z takich obszarów są potencjalnym źródłem nowych bioproduktów i innowacji technologicznych [10]. Proces bioprospekcji podzielić można na kilka podstawowych etapów. Pierwszym z nich jest znalezienie źródła interesujących mikroorganizmów, następnie ich izolacja, optyma-

lizacja warunków fizyko-chemicznych hodowli oraz ich opisanie. Następnym krokiem jest analiza bakterii i produkowanych przez nie bioproduktów. Ostatnim etapem udanej bioprospekcji jest wykorzystanie bakterii i ich bioproduktów w różnych dziedzinach przemysłu, rolnictwa, czy w medycynie [11]. Obecnie bioprospekcja bakterii zimnolubnych związana jest z poszukiwaniem nowych, aktywnych w niskich temperaturach enzymów i ich zastosowaniu w szerokim zakresie procesów biotechnologicznych, a także jako odczynników laboratoryjnych w biologii molekularnej i badaniach medycznych. Ponadto wysoce pożądane są nowe, aktywne biologicznie metabolity jako potencjalne biosurfaktanty, antybiotyki, leki przeciwnowotworowe, a także suplementy diety i dodatki do żywności. Jak wspomniano wyżej, poza produktami wytwarzanymi przez bakterie, bioprospekcja obejmuje również same organizmy oraz ich zastosowanie w biotechnologii. Organizmy te mają ogromny potencjał w biotechnologii środowiskowej, w tym między innymi w procesach bioremediacji skażonych terenów [12].



Rysunek 2. Schemat standardowego procesu bioprospekcji (opracowanie własne)

## 4. Wybrane bioprodukty

### 4.1. Enzymy

Enzymy, które odpowiadają za katalizę większości reakcji biochemicznych w zimnolubnych bakteriach, musiały ulec licznym adaptacjom do optymalnego funkcjonowania w niskich temperaturach. Poznanie molekularnych aspektów adaptacji enzymów do funkcjonowania w zimnych środowiskach stanowi istotny element bioprospekcji zimnolubnych szczepów bakterii. Warto podkreślić, że psychrofilne enzymy posiadają cechy przydatne i pożądane w wielu procesach biotechnologicznych. Jest to między innymi wysoka specyficzność substratowa zarówno w niskich, jak i umiarkowanych temperaturach, a także możliwość skutecznej deaktywacji danego enzymu poprzez nieznaczne, (bezpiecznie dla termolabilnych procesów biotechnologicznych lub przemysłowych) podniesienie temperatury [2].

Przykładem zastosowania enzymów wytwarzanych przez organizmy zimnolubne to między innymi wykorzystanie proteaz, lipaz, czy glikozydaz jako dodatków do

detergentów w procesach pralniczych. Pozwala to na znaczne ograniczenie zużycia energii poprzez obniżenie temperatury prania. Co istotne, niższa temperatura lepiej wpływa na trwałość tkanin i kolorów. W fabrykach przemysłu tekstylnego często pojawiającym się problemem podczas produkcji ubrań bawełnianych jest pojawianie się wielu dodatkowych, zbędnych włókienek bawełnianych, które zmniejszają gładkość i wygląd finalnego produktu. Co więcej, efekt ten pogarsza się przy kolejnych praniach. Zastosowanie celulaz w odpowiednich, niskich temperaturach, daje możliwość usunięcia włókienek z tkanin, co zwiększa trwałość i jakość produktu. Ponadto, w tym wypadku, niska stabilność psychrofilnych celulaz jest dużą zaletą, ponieważ standardowe, mezofilne celulazy nie zawsze ulegają kompletnej dezaktywacji, przez co uszkodzane jest główne włókno tkaniny. Celulazy produkowane przez organizmy zimnolubne pozwalają na zmniejszenie stężenia stosowanych enzymów oraz nie wymagają wysokich temperatur do dezaktywacji, co przekłada się na odporniejsze ubrania. Jednym z największych sektorów przemysłowych wykorzystujących enzymy bakterii zimnolubnych jest przemysł spożywczy. W przemyśle mleczarskim, zastosowanie  $\beta$ -galaktozydazy działającej w niskiej temperaturze umożliwia usunięcie laktozy bez pozbawiania mleka istotnych wartości odżywczych. Ponadto, zwracając uwagę na fakt, że około 2/3 ludności na świecie nie toleruje laktozy jest to szczególnie istotne zastosowanie enzymów [2, 3, 9]. Innym przykładem jest zastosowanie zimno-aktywnych pektynaz, które znacznie ułatwiają proces ekstrakcji soku z owoców zmniejszając ich lepkość. Ponadto pektynazy stosowane w niższych temperaturach poprawiają klarowność produktu, przy jednoczesnym zachowaniu walorów zdrowotnych owoców. Proteazy bakteryjne wykorzystywane są natomiast w przemyśle mięsnym do zmiękczenia mięsa lub „*peelingu*” skór w przemyśle garbarskim. W przemyśle piekarskim amylazy, proteazy i ksylanazy przyspieszają i poprawiają jakość fermentacji, a także działają na skrobię, gluten i hemicelulazę kompensując stosunkowo niską aktywność enzymów w mące. Zastosowanie psychrofilnych enzymów może nieść korzyści nie tylko ze względu na ich wysoką aktywność, co przekłada się na mniejsze ilości stosowanych enzymów, ale także z powodu ich łatwej, termicznej deaktywacji. Jak wspomniano wyżej, na przykładzie celulaz w przemyśle tekstylnym, szybsza inaktywacja zmniejsza ryzyko zbyt długiej pracy enzymu. Jest to również przydatna cecha w biologii molekularnej. Warto podkreślić, że są to tylko pojedyncze przykłady zastosowań aktywnych w niskich temperaturach enzymów. Mogą być one również dobrą alternatywą dla enzymów mezofilnych w produkcji piwa, wina, sera, pasz dla zwierząt i wielu innych produktów [2, 3, 9]. Istotnym zagadnieniem jest wysoka aktywność katalityczna enzymów przy niskich zawartościach wody, co również jest cechą adaptacyjną organizmów antarktycznych. Enzymy wykazujące tego typu aktywności mogą być wykorzystywane do komercyjnej syntezy estrów, kwasów tłuszczowych, peptydów, oligosacharydów i innych substancji z substratów o niskiej rozpuszczalności w wodzie [2].

#### 4.2. Białka zapobiegające zamarzaniu

W odpowiedzi na naprzemienne zjawiska zamarzania i odmarzania wody w warunkach antarktycznych, wiele bakterii wytwarza specjalne białka wiążące lód (ang. *Ice Binding Proteins*), które charakteryzują się zdolnością do specyficznego

wiązania się z jedną lub wieloma płaszczyznami kryształów lodu. Do białek IBP należą białka zapobiegające zamarzaniu (AFP, ang. *Antifreeze Proteins*), które odpowiadają za kontrolę/zapobieganie tworzeniu kryształów lodu poprzez obniżenie punktu zamarzania bez zmiany temperatury topnienia. Różnica między temperaturą zamarzania a temperaturą topnienia określana jest jako luka termicznej histerezy i stosowana jest często jako wskaźnik aktywności AFP. Luka termicznej histerezy powstaje na skutek wiązania białek AFP z powierzchnią lodu, co prowadzi do wytworzenia mikro-wypukłej i niekorzystnej termodynamicznie powierzchni do wiązania cząsteczek wody. Białka AFP ograniczają również zjawiska rekrytalizacji kryształów lodu w błonach komórkowych, które są śmiertelne dla komórek. Mechanizm polega na bezpośrednim zablokowaniu procesu rekrytalizacji lub redukcji napięcia powierzchniowego dzięki biosurfaktantom [13].

Białka zapobiegające zamarzaniu stosowane są w przemyśle spożywczym do lepszej konserwacji żywności podczas zamrażania. Ponadto pozwalają zachować gładką konsystencję lodów i jogurtów, poprawiają jakość mrożonego chleba, czy wręcz umożliwiają zamrożenie owoców i warzyw. Białka AFP wykorzystywane są również jako środki kriochronne i kriokonserwacyjne różnych materiałów biologicznych. Co więcej, niektóre AFP zdolne są do tworzenia mikroigieł, które stosowane w kriochirurgii mogą precyzyjnie niszczyć komórki, np. nowotworowe. AFP znajdują również zastosowanie w zmniejszaniu negatywnych skutków zamarzania upraw i ryb uprawianych w akwakulturach, w ograniczaniu tworzenia hydratów gazów, czy w przemyśle naftowym. Stosowane są również jako powłoki ograniczające zamarzanie np. na samolotach, liniach energetycznych i drogach [14].

### **4.3. Nienasycone kwasy tłuszczowe**

Adaptacja błon komórkowych bakterii do niskich temperatur związana jest między innymi z modyfikacjami składu kwasów tłuszczowych zawartych w dwuwarstwie lipidowej. Jedną z głównych strategii ochrony przed zimnem jest zwiększenie zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych, które modyfikują upakowanie i zmniejszają gęstość fosfolipidów w dwuwarstwie lipidowej. Prowadzi to do obniżenia temperatury przejścia z fazy płynnej do fazy żelowej błony komórkowej, dzięki czemu zachowuje ona swoją funkcjonalność nawet w bardzo niskich temperaturach [14].

Ważną grupą nienasyconych kwasów tłuszczowych stanowią długo-łańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe (LC-PUFA, ang. *Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids*). Wykazano, że niektóre bakterie zimnolubne, szczególnie w niskich temperaturach, zdolne są do wytwarzania LC-PUFA, które zawierają ponad dwadzieścia cząsteczek węgla i co najmniej 4 wiązania podwójne. Są to na przykład: kwas arachidonowy (ARA, 20:4 *n*-6), kwas eikozapentaenowy (EPA, 20:5 *n*-3), czy kwas dokozaheksanowy (DHA, 22:6 *n*-3) [13]. LC-PUFA pełnią przede wszystkim funkcje przeciwutleniaczy i ochronne błony komórkowej. Ponadto tworzą silnie wiązania hydrofobowe w dwuwarstwie lipidowej, ograniczając wnikanie reaktywnych form tlenu do komórki. Długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe nie są prawdopodobnie bezpośrednią odpowiedzią komórki na drastyczne obniżenie temperatury, a raczej na pośrednio wynikający z ostrego klimatu stres oksydacyjny [13, 14].

LC-PUFA posiadają duże wartości odżywcze i farmaceutyczne. Są składnikami neuronów, trombocytów, neutrofilów, monocytów, a także występują w wysokich stężeniach w mózgu i siatkówce oka. Co ważne, są one również prekursorami cząsteczek biorących udział w sygnalizacji eikozanoidowej oraz neuroprzekazników endokannabinoidowych. Ponadto regulują pracę układu sercowo-naczyniowego i odpornościowego, a także sprzyjają prawidłowej pracy mózgu i centralnego układu nerwowego. LC-PUFA, takie jak wspomniane wyżej DHA i ARA, zalecane są jako suplementy diety dla prawidłowego rozwoju niemowląt. Warto podkreślić, że głównym źródłem LC-PUFA są oleje rybne, ale problemy związane ze smakiem, alergią, a także wpływem na globalne zasoby ryb zmuszają do poszukiwań alternatywnych źródeł [14].

#### 4.4. Zewnątrzkomórkowe substancje polimerowe

Zewnątrzkomórkowe substancje polimerowe (EPS, ang. *Extracellular Polymeric Substances*) są to wielofunkcyjne kompleksy złożone z biopolimerów o dużej masie cząsteczkowej. Tworzą bardzo zróżnicowane struktury złożone głównie z węglowodanów (homo- lub heteropolisacharydów), a także z białek, kwasów nukleinowych, lipidów, związków aromatycznych, czy substancji humusowych. EPS produkowane zewnątrzkomórkowo pełnią funkcję macierzy zewnątrzkomórkowej w biofilmach bakteryjnych. Mają również ogromny wpływ na właściwości fizyko-chemiczne i biologiczne środowiska życia bakterii. Ponadto biorą udział w przyłączaniu mikroorganizmów do podłoża, wychwytywaniu składników odżywczych ze środowiska, a także w ochronie przed stresem osmotycznym i oksydacyjnym. Ważną funkcją EPS wytwarzanych przez bakterie zimmolubne jest ochrona przed zamarzaniem. Co istotne, bakterie przystosowane do zimna wytwarzają często większe ilości EPS wraz ze spadkiem temperatury. Uważa się, że uwodniona macierz EPS chroni bakterie przed niskimi temperaturami, poprzez wytworzenie powłoki przeciw-dyfuzyjnej wokół komórek, co również stanowi fizyczną barierę przed powstawaniem lodu. Zmniejszenie dyfuzji rozpuszczonych w EPS cząsteczek ogranicza stres osmotyczny i skutki zamarzania. Co więcej, żelowa struktura EPS i częsta obecność białek zapobiegających zamarzaniu (AFP) dodatkowo ograniczają możliwość powstania kryształów lodu. EPS są biodegradowalne, nietoksyczne, a także są potencjalnym źródłem biopolimerów. Macierz zewnątrzkomórkowa produkowana przez bakterie zimmolubne znalazła zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym i kosmetycznym. W biotechnologii środowiskowej EPS stosowany jest jako źródło biosurfaktantów wiążących metale ciężkie i substancje organiczne. Ponadto EPS wykazują duży potencjał jako bioemulsyfikatory, czy nawet środki bioadhezyjne. W przemyśle spożywczym EPS stosowane są jako środki zagęszczające i emulgatory nadające żywności lepszą teksturę i stabilność. Wykazano również, że EPS mogą być wykorzystywane w medycynie jako immunomodulujące antykoagulanty, substancje przeciwzapalne i przeciwtleniające. Mogą być również wykorzystane w inżynierii tkankowej [14, 15].



#### **4.5. Polihydroksyalkaniany**

Polihydroksyalkaniany (PHA) produkowane są przez bakterie w celu magazynowania zapasowych źródeł węgla, azotu i energii. Ułatwiają one przeżycie komórkom w trudnych, antarktycznych warunkach środowiska, gdzie deficyt substancji odżywczych i stres oksydacyjny są powszechnie spotykane. Ważną zaletą PHA jest to, że powstają z odnawialnych surowców naturalnych, takich jak np.: węglowodany, lipidy, alkohole, metan i dwutlenek węgla. Ponadto wykazują cechy znanych termoplastów i elastomerów, będąc przy tym w pełni biodegradowalnymi i bezpiecznymi dla środowiska polimerami [16, 17]. Częsteczką PHA składa się z powtarzających się kolejno jednostek (monomerów) kwasów  $\beta$ -hydroksyalkanowych połączonych wiązaniem estrowym między grupą karboksylową jednego monomeru i grupą hydroksylową kolejnego monomeru. W zależności od długości łańcucha węglowego monomeru, polihydroksyalkaniany produkowane przez bakterie dzielone są na dwie grupy. Pierwsza grupa zawiera PHA krótko-łańcuchowe, posiadające od 3 do 5 cząsteczek węgla w monomerze. Najlepiej zbadanym przykładem jest polihydroksymaślan (4 cząsteczki węgla). Drugą grupą są średniej długości polimery, zawierające od 6 do 16 cząsteczek węgla w strukturze monomeru [17]. PHA znalazły zastosowanie w wielu dziedzinach medycznych, np. w inżynierii tkankowej, jako bioimplanty, czy szwy. Ponadto wykorzystywane są w różnych syntezach chemicznych, jako biopaliwo lub biomateriały do opakowań. Co więcej, stwierdzono ich potencjał w rolnictwie jako środki promujące wzrost roślin [14].

#### **4.6. Biosurfaktanty**

Jednym z mechanizmów pozwalającym przetrwać mikroorganizmom ekstremalne warunki środowiska są wysoce wyspecjalizowane błony komórkowe, których biosurfaktanty są często integralną częścią i uczestniczą w ochronie przed niską temperaturą, wysokim zasoleniem oraz stresem osmotycznym [18]. Biosurfaktanty są to amfipatyczne substancje, które zmniejszają napięcie powierzchniowe i międzyfazowe cieczy. Charakterystyczna dla biosurfaktantów budowa, oparta na hydrofilowych i hydrofobowych biegunach cząsteczek, pozwala na oddziaływania ciecz-olej i rozpuszczenie cząsteczek zarówno w rozpuszczalnikach organicznych (niepolarnych), jak i wodnych (polarnych). Biosurfaktanty, jako cząsteczki pochodzenia biologicznego, mają wiele zalet w porównaniu z syntetycznymi substancjami powierzchniowo czynnymi. Biologiczne surfaktanty są biodegradowalne, posiadają wyższy indeks emulsyfikacji (zdolność do pienienia) oraz mają niższą toksyczność. Ponadto mają większą tolerancję na zmiany fizyko-chemiczne, takie jak pH, temperatura, czy zasolenie. Są również bardziej selektywne dla metali i związków organicznych, co czyni je metabolitami pożądanymi w procesach bioremediacyjnych. Co istotne, biosurfaktanty syntetyzować można z surowców odnawialnych [19].

#### **4.7. Barwniki karotenoidowe**

Mikroorganizmy zasiedlające Antarktykę rozwinęły odpowiednie mechanizmy, by przetrwać ekspozycję na silne promieniowanie słoneczne. Stres komórkowy związany z promieniowaniem UV prowadzi do wytwarzania wysoce reaktywnych form tlenu – wolnych rodników, które niszczą między innymi DNA, błony komórkowe, czy białka.

W celu ochrony przed wolnymi rodnikami mikroorganizmy wykształciły wydajne systemy naprawy DNA oraz wiele prewencyjnych mechanizmów zapobiegających utlenianiu. Jedne z najbardziej powszechnych przeciwutleniaczy to syntetyzowane, również przez bakterie, barwniki karotenoidowe, które są jednocześnie jedną z najbardziej różnorodnych grup barwników naturalnych rozpowszechnionych w przyrodzie. Posiadają one w strukturze charakterystyczne wiązania izoprenoidowe, przez co wpływają na strukturę błon komórkowych i pełnią również funkcję krio-protoktantów [13, 20]. Warto podkreślić, że są one biodegradowalne i bezpieczne dla środowiska. Co więcej, jako suplementy diety dla ludzi są skutecznymi przeciwutleniaczami, pełnią funkcję pro-witaminy A, wpływają na poprawny wzrost rozwój, zdrowy wzrok i poprawnie działający układ odpornościowy. Ponadto karotenoidy stosowane są jako barwniki spożywcze, kosmetyki do pielęgnacji skóry, czy filtry przeciwsłoneczne [14]. Warto podkreślić, że pozyskanie bakterii zimmolubnych wytwarzających barwniki karotenoidowe daje szansę na znaczne ograniczenie kosztów wytwarzania tych barwników na skalę przemysłową [21].

## **5. Zastosowanie bakterii zimmolubnych w bioremediacji**

Antarktyka, mimo znikomej presji i obecności człowieka, nie jest wolna od zanieczyszczeń pochodzenia antropogenicznego. Rosnące skażenie Antarktyki stało się poważnym problemem, szczególnie po przełomowym, Międzynarodowym Roku Geofizycznym (1957-1958), po którym powstało wiele nowych stacji badawczych [22]. Obecność metali ciężkich oraz substancji ropopochodnych w obrębie placówek badawczych Antarktyki nie jest obojętna dla żyjących tam mikroorganizmów. Ze względu na duży deficyt biomasy organicznej, obecność ksenobiotyków stanowi dla bakterii potencjalne źródło energii i węgla, a co za tym idzie – wykształciły one zdolność do ich wykorzystywania [23, 24]. Bioprospekcja antarktycznych szczepów bakterii w celu znalezienia organizmów zdolnych do bioremediacji środowiska w niskiej temperaturze jest obiecującą alternatywą dla powszechnie stosowanych szczepów mezofilnych. Wykorzystanie mikroorganizmów zimmolubnych w celu ograniczenia skażenia środowiska wydaje się być optymistyczną alternatywą dla metod fizykochemicznych [2]. Często w procesach bioremediacyjnych stosuje się dwa różne podejścia: biostymulację, bazującą na dostarczaniu składników odżywczych do zanieczyszczonego środowiska i tym samym stymulowaniu aktywności metabolicznej rodzimych mikroorganizmów oraz bioaugmentację, która polega na wyhodowaniu i zaaplikowaniu egzogennych mikroorganizmów zdolnych przeprowadzać degradację zanieczyszczeń, które nie mogą być usunięte przez rdzenne populacje bakterii [25]. W regionach o klimacie umiarkowanym występują duże wahania sezonowe temperatury, które zmniejszają lub kompletnie ograniczają skuteczność organizmów mezofilnych w bioremediacji [2]. Bioaugmentacja skażonych terenów szczepami bakterii zimmolubnych jest potencjalnym rozwiązaniem problemu niskiej temperatury i okresów przemarzania gleby. Jak wspomniano wyżej, Antarktyka mimo ekstremalnego klimatu posiada stosunkowo sporą bioróżnorodność. Naukowcy izolowali z tych rejonów zarówno bakterie żyjące tlenowo i beztlenowo [26]. W bioremediacji bakterie tlenowe stosowane są często ze względu na zdolności do rozkładu pestycydów i węglowodorów alifatycznych i aromatycznych (w tym wielopierścieniowych

węglowodorów aromatycznych; WWA). Większość z tych bakterii wykorzystuje zanieczyszczenia jako jedyne źródło węgla i energii, natomiast niektóre z nich ułatwiają bioremediację poprzez mobilizację zanieczyszczeń wytwarzanymi metabolitami [27, 28]. Istotne z punktu widzenia bioremediacji są również tlenowe bakterie metanowe, u których monooksygenaza metanowa pozwala na degradację szerokiego spektrum związków, w tym chlorowcopochodnych, takich jak trichloroetylen, czy 1,2-dichloroetan. Z kolei bakterie beztlenowe wykazują duży potencjał w bioremediacji środowiska z polichlorowanych bifenyli (PCB), znajdujących się w osadach rzecznych, a także degradacji rozpuszczalników organicznych [28].

## **6. Podsumowanie**

Mikroorganizmy żyjące na Antarktyce rozwinęły szeroką gamę przystosowań do ekstremalnych warunków środowiska. Zarówno niska temperatura, jak i silne promieniowanie słoneczne oraz stres osmotyczny są istotnymi czynnikami prowadzącymi do powstania nowych adaptacji. Bioprospekcja bakterii żyjących w tak specyficznych warunkach stanowi potencjalnie ogromne źródło nowych bioproduktów i rozwiązań technologicznych. Co więcej, kolejne badania z wykorzystaniem nowoczesnych technologii pozwolą na lepsze poznanie nowych cech metabolicznych ich zastosowań. Warto podkreślić, że obecnie wiele bakterii zimnolubnych i wytwarzanych przez nie bioproduktów znalazło zastosowanie komercyjne, jednakże obfitość i różnorodność środowisk ekstremalnych jest ogromna i stanowi wciąż zachęcające pole do badań.

## **Literatura**

1. Silva T.R., Duarte A.W., Passarini M.R., Ruiz A.L.T., Franco C.H., Moraes C.B., de Melo I.S., Rodrigues R.A., Fantinatti-Garbogini F., Oliveira V.M., *Bacteria from Antarctic environments: diversity and detection of antimicrobial, antiproliferative, and antiparasitic activities*, Polar Biology, 41.7, 2018, 1505-1519.
2. Gerday C., Aittaleb M., Bentahir M., Chessa J.P., Claverie P., Collins T., D'Amico S., Dumont J., Garsoux G., Georgette D., Hoyoux A., Lonhienne T., Meuwis M.A., Feller G., *Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology*, Trends in biotechnology, 18.3, 2000, 103-107.
3. Feller G., Gerday C., *Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation*, Nature Reviews Microbiology, 1.3, 2003, 200-208.
4. Christner B.C., Kvitko B.H., Reeve J.N., *Molecular identification of bacteria and eukarya inhabiting an Antarctic cryoconite hole*, Extremophiles, 7.3, 2003, 177-183.
5. Obbels D., Verleyen E., Mano M.J., Namsaraev Z., Sweetlove M., Tytgat B., Fernandez-Carazo R., De Wever A., D'hondt S., Ertz D., Elster J., Sabbe K., Willems A., Wilmotte A., Vyverman W., *Bacterial and eukaryotic biodiversity patterns in terrestrial and aquatic habitats in the Sør Rondane Mountains, Dronning Maud Land, East Antarctica*, FEMS microbiology ecology, 92.6, 2016, fiw041s.
6. Jansson J.K., Tas N., *The microbial ecology of permafrost*, Nature Reviews Microbiology, 12.6, 2014, 414-425.
7. Deming J.W., *Psychrophiles and polar regions*, Current opinion in microbiology, 5.3, 2002, 301-309.
8. Junge K., Krembs C., Deming J., Stierle A., Eicken H., *A microscopic approach to investigate bacteria under in situ conditions in sea-ice samples*, Annals of Glaciology, 33, 2001, 304-310.

9. D'Amico S., Collins T., Marx J.C., Feller G., Gerday C., *Psychrophilic microorganisms: challenges for life*, EMBO reports, 7.4, 2006, 385-389.
10. Nichols D.S., Sanderson K., Buia A., Van De Kamp J., Holloway P., Bowman J.P., Smith M., Mancuso-Nichols C., Nichols P., McMeekin T., *Bioprospecting and biotechnology in Antarctica. The Antarctic: past, present and future*, Antarctic CRC research report, 28, 2002, 85-104.
11. Hemmings A.D., Rogan-Finnemore M., *Antarctic bioprospecting*, Gateway Antarctica, Christchurch 2005.
12. Margesin R., Feller G., *Biotechnological applications of psychrophiles*, Environmental technology, 31.8-9, 2010, 835-844.
13. Yoshida K., Hashimoto M., Hori R., Adachi T., Okuyama H., Orikasa Y., Nagamine T., Shimizu S., Ueno A., Morita N., *Bacterial Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids: Their Biosynthetic Genes, Functions, and Practical Use*, Marine drugs, 14.5, 2016, 94-117.
14. Collins T., Margesin R., *Psychrophilic lifestyles: mechanisms of adaptation and biotechnological tools*, Applied microbiology and biotechnology, 2019, 1-15.
15. Poli A., Finore I., Romano I., Gioiello A., Lama L., Nicolaus B., *Microbial Diversity in Extreme Marine Habitats and Their Biomolecules*, Microorganisms, 5.2, 2017, 25-55.
16. Koller M., *Production of polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters by extremophiles*, MOJ Polymer Science, 1.2, 2017, 1-19.
17. Goh Y.S., Tan I.K., *Polyhydroxyalkanoate production by antarctic soil bacteria isolated from Casey Station and Signy Island*, Microbiological research, 167.4, 2012, 211-219.
18. Perfumo A., Banat I.M., Marchant R., *Going Green and Cold: Biosurfactants from Low-Temperature Environments to Biotechnology Applications*, Trends in biotechnology, 36.3, 2018, 277-289.
19. Silva E., Chaprão M.J., Silva I., Brasileiro P., Almeida D., Luna J., Rufino R., Sarubbo L., *Biosurfactant Application as Alternative Collectors in Dissolved Air Flotation System*, Chemical Engineering Transactions, 64, 2018, 547-552.
20. Órdenes-Aenishanslins N., Anziani-Ostuni G., Vargas-Reyes M., Alarcón J., Tello A., Pérez-Donoso J., *Pigments from UV-resistant Antarctic bacteria as photosensitizers in dye sensitized solar cells*, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 162, 2016, 707-714.
21. Silva T.R., Tavares R.S., Canela-Garayoa R., Eras J., Rodrigues M.V., Neri-Numa I.A., Pastore G.M., Rosa L.H., Schultz J.A., Deboni H.M., *Chemical Characterization and Biotechnological Applicability of Pigments Isolated from Antarctic Bacteria*, Marine Biotechnology, 2019, 1-14.
22. Zvěřina O., Coufalík P., Barták M., Petrov M., Komárek J., *The contents and distributions of cadmium, mercury, and lead in Usnea antarctica lichens from Solorina Valley, James Ross Island (Antarctica)*, Environmental monitoring and assessment, 190.1, 2018, 13-21.
23. Ruberto L., Vazquez S.C., Mac Cormack W.P., *Effectiveness of the natural bacterial flora, biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil*, International Biodeterioration & Biodegradation, 52.2, 2003, 115-125.
24. Ruberto L.A., Vazquez S., Lobalbo A., Mac Cormack W., *Psychrotolerant hydrocarbon-degrading Rhodococcus strains isolated from polluted Antarctic soils*, Antarctic Science, 17.1, 2005, 47-56.
25. Gratia E., Weekers F., Margesin R., D'Amico S., Thonart P., Feller G., *Selection of a cold-adapted bacterium for bioremediation of wastewater at low temperatures*, Extremophiles, 13.5, 2009, 763-768.

26. Romaniuk K., Ciok A., Decewicz P., Uhrynowski W., Budzik K., Nieckarz M., Pawlowska J., Zdanowski M.K., Bartosik D., Dziewit L., *Insight into heavy metal resistome of soil psychrotolerant bacteria originating from King George Island (Antarctica)*, *Polar Biology*, 41.7, 2018, 1319-1333.
27. Cubitto M.A., Morán A.C., Commendatore M., Chiarello M.N., Baldini M.D., Siñeriz F., *Effects of Bacillus subtilis O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soils*, *Biodegradation*, 15.5, 2004, 281-287.
28. Vidali M., *Bioremediation. an overview*, *Pure and Applied Chemistry*, 73.7, 2001, 1163-1172.

## **Bioprospekcja antarktycznych psychrotolerancyjnych szczepów bakterii**

### **Streszczenie**

Antarktyka jest jednym z ekstremalnych środowisk na świecie. Występują tam temperatury osiągające  $-89^{\circ}\text{C}$ , silne promieniowanie UV, ograniczony dostęp substancji odżywczych, a także obszary o bardzo dużym zasoleniu. Mikroorganizmy występujące w tak ekstremalnych warunkach musiały wykształcić szereg cech adaptacyjnych, żeby przetrwać. W niniejszej pracy przedstawiono jak dużą bioróżnorodność kryje Antarktyka i dlaczego jest obiecującym obiektem badań. Określone zostały główne kroki udanej bioprospekcji nowych mikroorganizmów i ich bioproduktów. Ponadto przedstawiono przykłady zastosowań enzymów i metabolitów produkowanych przez bakterie zimnolubne, a także ich potencjał w biotechnologii środowiskowej.

Słowa kluczowe: Antarktyka, mikroorganizmy, bioprospekcja

## **Bioprospection of Antarctic psychrotolerant bacterial strains**

### **Streszczenie**

Antarctica is one of the most extreme environment in the world. There are temperatures reaching  $-89^{\circ}\text{C}$ , strong UV radiation, limited access to nutrients and areas with very high salinity. Microorganisms occurring in such extreme conditions had to develop a number of adaptive features to survive. This paper presents the high biodiversity in Antarctica and why it is a promising object of research. The main steps for a successful bioprospection of new microorganisms and their bioproducts have been presented. In addition, examples of the use of enzymes and metabolites produced by cold-active bacteria were described, as well as their potential in environmental biotechnology.

Keywords: Antarctica, microorganisms, bioprospection

# Ocena wpływu składowania i utylizacji odpadów mikrobiologicznych na jakość powietrza oraz zdrowie pracowników laboratorium mikrobiologicznego

## 1. Wprowadzenie

Dotychczas przeprowadzone badania nad jakością mikrobiologiczną powietrza w środowisku zawodowym oraz pozazawodowym, wskazują, iż poziomy biologicznych zanieczyszczeń powietrza mogą negatywnie wpływać na zdrowie ludzi [1-5]. Jednym z rodzajów substancji szkodliwych obecnych w powietrzu wewnętrznym, na które narażeni są ludzie, stanowią tzw. bioaerozole, a ich liczba jest ważnym wskaźnikiem zanieczyszczenia atmosfery, zarówno w przestrzeni otwartej, jak i w pomieszczeniach zamkniętych.

Termin „bioaerozol” definiujemy jako mieszaninę zarówno żywych, jak i martwych komórek mikroorganizmów (bakterii i grzybów), ich fragmentów oraz związków przez nie wytwarzanych (endotoksyn, mykotoksyn itd.). Cząstki bioaerozoli mogą być różnej wielkości. Przy czym, średnica komórek bakteryjnych wynosi od 1 do 2  $\mu\text{m}$ , z kolei średnica grzybów mikroskopijnych (w zależności od gatunku) od 2 do 8  $\mu\text{m}$  [1,6].

W normalnych warunkach środowiskowych, czyli przy niskich stężeniach mikroorganizmów, większość cząstek biologicznych nie stanowi zagrożenia zdrowotnego. Jednak część z nich może wykazywać właściwości chorobotwórcze, alergizujące lub toksyczne. Obecne w powietrzu bioaerozole mogą wywoływać szereg różnych chorób, przykładem może być zapalenie płuc, czy gruźlica wywoływane przez bakterie wnika-jące do układu oddechowego. Bakterie i grzyby mikroskopijne mogą być przyczyną astmy, kataru siennego, zapalenia oskrzeli, zapalenia zatok i spojówek. Niebezpieczne dla zdrowia są także metabolity niektórych bakterii niepatogennych. Szczególne zagrożenie w tym zakresie stanowią bakterie Gram-ujemne ze względu na endotoksynę, która jest składnikiem ich ściany komórkowej [7-9].

Szczególną grupą osób narażonych na aerozole biologiczne w środowisku pracy są pracownicy laboratoriów mikrobiologicznych. Praca mikrobiologa wymaga niezwykle dużej ostrożności, a także przestrzegania procedur badawczych oraz przepisów BHP. Bezpośrednie zagrożenie dla zdrowia pracowników laboratoriów mikrobiologicznych stanowią m.in. odpady mikrobiologiczne. Odpowiednia utylizacja, a także inaktywacja tychże odpadów ma wpływ na jakość powietrza wewnątrz laboratoriów.

W celu zminimalizowania wystąpienia ryzyka mikrobiologicznego w laboratorium konieczne jest zapewnienie bezpiecznych warunków pracy, czyli przestrzegania Zasady Dobrej Praktyki Laboratoryjnej (ang. *Good Laboratory Practice*, GLP). W roku 1984 Narodowy Instytut Zdrowia (ang. *National Institutes of Health*, NIH) i Centrum Kontroli Zakażeń (Center for Disease Control and Prevention, CDC) wydały przewodnik pod tytułem „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories”.

---

<sup>1</sup>ewa.bragoszewska@polsl.pl, Katedra Technologii i Urządzeń Zagospodarowania Odpadów, Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki, Politechnika Śląska, www.polsl.pl.

Przewodnik ten do dziś uważany jest za podstawową referencję w opracowywaniu procedur bezpieczeństwa w laboratorium mikrobiologicznym [10].

W oparciu o Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 22 kwietnia 2005 r. „w sprawie szkodliwych czynników biologicznych dla zdrowia w środowisku pracy oraz ochrony zdrowia pracowników zawodowo narażonych na te czynniki”, biologiczne czynniki szkodliwe można podzielić na 4 grupy w zależności od stopnia zagrożenia. Grupa 1: czynniki, przez które wywołanie chorób u ludzi jest mało prawdopodobne; grupa 2: czynniki, które mogą wywoływać chorobę u narażonych pracowników, ale rozprzestrzenienie ich w populacji ludzkiej jest mało prawdopodobne i istnieją skuteczne metody profilaktyki oraz terapii wobec nich; grupa 3: czynniki, które mogą wywołać poważną chorobę, rozprzestrzenianie się ich jest bardzo prawdopodobne, ale zazwyczaj istnieją w stosunku do nich skuteczne metody profilaktyki i terapii; grupa 4: czynniki, które mogą wywoływać bardzo poważną chorobę, o wysokim stopniu śmiertelności, szybko rozprzestrzeniają się i brak jest wobec nich skutecznych metod profilaktyki i terapii [11].

Popularyzacja wiedzy i podnoszenie świadomości pracowników laboratoriów mikrobiologicznych stanowi istotny problem badawczy, a prowadzenie regularnego monitoringu poziomu stężeń obecnych w powietrzu pomieszczeń laboratoryjnych jest niezwykle istotne w celu prognozowania skutków zdrowotnych.

## **2. Cel pracy**

Celem niniejszej pracy było oszacowanie stężenia oraz identyfikacja aerozolu bakteryjnego występującego w dwóch typach pomieszczeń laboratoryjnych, znajdujących się w laboratorium mikrobiologicznym na terenie województwa śląskiego. W ramach niniejszej pracy zostały porównane wyniki analizy ilościowej i jakościowej aerozolu bakteryjnego obecnego w pomieszczeniu laboratoryjnym, gdzie wykonywane są standardowe analizy mikrobiologiczne, oraz w pomieszczeniu, gdzie składowane i utylizowane są odpady mikrobiologiczne.

## **3. Metodyka badań**

Pomiary zostały przeprowadzone w okresie od 12 stycznia do 24 lutego 2019 r. w laboratorium mikrobiologicznym położonym w centrum Gliwic (50°17'37.1"N 18°40'54.9"E).

Próbki aerozolu bakteryjnego pobierane były w pomieszczeniu laboratoryjnym, gdzie wykonywane są standardowe badania mikrobiologiczne (POM 1) oraz w pomieszczeniu laboratoryjnym, gdzie składowane i utylizowane są odpady mikrobiologiczne (POM 2).

Temperatura powietrza w badanych pomieszczeniach laboratoryjnych, w okresie pomiarowym, mieściła się między 19 a 22°C (średnia temp. to 20,5°C), a na zewnątrz od 8 do 11°C (średnia 10,2°C). Pomieszczenia laboratoryjne objęte pomiarami znajdują się w budynku oddanym do użytkowania w 2014 roku. Materiałami budowlanymi są stal, beton oraz szkło. Laboratoria wyposażone są w nowe meble oraz sprzęt laboratoryjny, na podłogach położone jest linoleum.

Do poboru próbek wykorzystano sześciostopniowy impaktor typu Andersena (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), który składa się z sześciu nakła-

danych na siebie segmentów/stopni (ze średnicami odcięcia: 7,0; 4,7; 3,3; 2,1; 1,1; 0,65  $\mu\text{m}$ ). Na każdym poziomie impaktora umieszczano szalki Petriego wypełnione odpowiednim podłożem hodowlanym. Podłożem odpowiednim dla wzrostu bakterii był agar odżywczy TSA (Trypticasein Soy, LAB-AGAR™), do którego dodawano cykloheksymid (Cycloheximide Actidion 95%, ACROS Organics, New Jersey, USA) hamujący wzrost grzybów mikroskopijnych.

Natężenie przepływu impaktora ustalone zostało zgodnie z zaleceniami na wartość 28,3  $\text{dm}^3/\text{min}$  i było sprawdzane każdorazowo przed przystąpieniem do poboru próbek przy użyciu kalibrowanego rotametu. Przed rozpoczęciem każdego poboru oraz pomiędzy kolejnymi próbkowaniami, wewnątrz urządzenia było każdorazowo przemywane preparatem dezynfekcyjnym Velox AF (MediSept, Polska).

Pobór za pomocą impaktora Andersena trwał 10 minut. Jest to optymalny czas poboru, gdyż po dłuższym okresie następuje utwardzanie powierzchni agaru na skutek wysychania jego powierzchni, a to z kolei powoduje zaniżenie wyznaczonego stężenia aerozolu bakteryjnego [12].

Po pobraniu próbek szalki Petriego umieszczano w cieplarni laboratoryjnej (w temperaturze  $36\pm 1^\circ\text{C}$ , przez 48 h). Po wyznaczonym czasie inkubacji zliczano wyrosłe kolonie i wyznaczono stężenie. Jako wyróżnik stężenia bioaerozolu przyjęto ilość wyrosłych kolonii na podłożach stałych, odniesioną do jednostki objętości powietrza,  $\text{jtk}/\text{m}^3$  (jednostki tworzące kolonie w  $1\text{m}^3$  powietrza, ang.  $\text{CFU}/\text{m}^3$ ).

W kolejnym etapie badań przeprowadzono wstępną identyfikację wyizolowanych szczepów bakterii w oparciu o analizę morfologiczną: makroskopową kolonii wyrosłych na podłożu agarowym oraz mikroskopową komórek barwionych metodą Grama z wykorzystaniem mikroskopu Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Następnie badane szczepy bakterii różnicowano na podstawie ich własności metabolicznych, przy pomocy testów biochemicznych API. Posługiwano się także komputerowym systemem analizy APIweb, który umożliwił szybką interpretację testów API (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francja)

## 4. Wyniki badań

### 4.1. Analiza ilościowa

Uzyskane stężenia bakterii w badanym laboratorium mikrobiologicznym zestawiono w tabeli nr 1. W pomieszczeniu laboratoryjnym, gdzie wykonywane są standardowe analizy mikrobiologiczne (POM 1), stężenie bakterii było na poziomie 680  $\text{jtk}/\text{m}^3$ , natomiast w pomieszczeniu, w którym składuje się odpady mikrobiologiczne (POM 2), stężenie bakterii było prawie dwukrotnie wyższe i wynosiło 1105  $\text{jtk}/\text{m}^3$ . Udział frakcji respirabilnej (cząstki biologiczne cząstek o średnicy  $< 4,7 \mu\text{m}$ ) aerozolu bakteryjnego w POM 1 stanowił około 30%, natomiast w POM 2, udział frakcji respirabilnej stanowił ponad 45% całkowitego stężenia aerozolu bakteryjnego.



Tabela 1. Zakresy stężeń aerozolu bakteryjnego występującego w wybranych pomieszczeniach laboratorium mikrobiologicznego na terenie województwa śląskiego

Miejsce poboru próbek	Stężenie mikroorganizmów jtk/m <sup>3</sup>	
	Całkowite	Fracji respirabilnej
Pomieszczenie laboratoryjne, w którym wykonuje się standardowe badania mikrobiologiczne	680	220
Pomieszczenie laboratoryjne, w którym składowane i utylizowane są odpady mikrobiologiczne	1105	510

Źródło: Opracowanie własne

## 4.2. Analiza jakościowa

Identyfikacja bakterii wyizolowanych z powietrza pomieszczeń laboratoryjnych pozwala na dokonanie oceny potencjalnych zagrożeń zdrowotnych związanych z jego oddziaływaniem na osoby przebywające w tym środowisku. Jak wiadomo, inhalacja bioaerozoli może powodować wystąpienie szeregu niepożądanych symptomów ze strony układu oddechowego. Jest to zależne zarówno od natury, jak i rodzaju bioaerozolu, głębokości penetracji w układzie oddechowym, okoliczności, w których nastąpiła ekspozycja oraz zdolności samego organizmu do immunologicznej reakcji na dany antygen środowiskowy.

Uzyskane wyniki analizy jakościowej aerozolu bakteryjnego wyizolowanego z powietrza badanego laboratorium mikrobiologicznego zestawiono w tabeli nr 2. Zaobserwowano, że w pomieszczeniu laboratoryjnym, w którym składowane i utylizowane są odpady mikrobiologiczne charakteryzowało się większą różnorodnością wyizolowanych bakterii (10 gatunków), w porównaniu do pomieszczenia, gdzie wykonywane są standardowe praktyki laboratoryjne (7 gatunków). Uzyskane wyniki wskazują, że w badanym środowisku wewnętrznym dominowały Gram-dodatnie ziarniaki co jest zgodne z innymi badaniami [9, 13-17].

Tabela 2. Jakościowa charakterystyka aerozolu bakteryjnego występującego w wybranych pomieszczeniach laboratorium mikrobiologicznego

Zidentyfikowane rodzaje/gatunki wyizolowanych bakterii	Udział procentowy bakterii (%) w stosunku do całości flory bakteryjnej	
	POM 1	POM 2
Ziarniaki Gram-dodatnie:	49	54
Micrococcus sp.	25	21
Micrococcus lylae	n.i.	14
Kocuria rosea	12	8
Staphylococcus lentus	12	11
Palczki Gram-dodatnie tworzące endospory:	26	22
Bacillus subtilis	11	9
Bacillus cereus	15	11

Bacillus mycoides	n.i.	2
Pałeczki Gram-dodatnie niezarodnikujące:	23	19
Corynebacterium auris	23	10
Corynebacterium striatum	n.i.	9
Pałeczki Gram-ujemne:	2	5
Pseudomonas sp.	2	5

Źródło: Opracowanie własne, gdzie POM 1 – pomieszczenie laboratoryjne, w którym wykonuje się standardowe badania mikrobiologiczne; POM 2 – pomieszczenie laboratoryjne, w którym składowane i utylizowane są odpady mikrobiologiczne; n.i. nie zidentyfikowano

Mikroorganizmy wyizolowane z powietrza badanych pomieszczeń laboratoryjnych (z wyjątkiem *Pseudomonas sp.*), nie zostały wymienione w wykazie szkodliwych czynników biologicznych [11]. Zatem wyizolowane bakterie należą do grupy 1, czyli grupy mikroorganizmów stanowiących niewielkie zagrożenie dla zdrowia osób stale przebywających w tego typu pomieszczeniach. Z kolei oznaczona w badanym laboratorium bakteria należąca do grupy bakterii pałeczek Gram-ujemnych (*Pseudomonas sp.*), w wykazie szkodliwych czynników biologicznych zaklasyfikowana została do grupy 2 (czynniki, które mogą wywoływać chorobę u narażonych pracowników, ale rozprzestrzenienie ich w populacji ludzkiej jest mało prawdopodobne i istnieją w stosunku do nich skuteczne metody profilaktyki oraz terapii) [11].

## 5. Podsumowanie i wnioski

Na podstawie przeprowadzonych pomiarów stężeń bioaerozolu bakteryjnego w laboratorium mikrobiologicznym stwierdzono, że:

- W pomieszczeniu laboratoryjnym, gdzie wykonywane są standardowe analizy mikrobiologiczne (POM 1), stężenie bakterii było na poziomie 680 jtk/m<sup>3</sup>, natomiast w pomieszczeniu składującym odpady mikrobiologiczne (POM II) stężenie bakterii było prawie dwukrotnie wyższe i wynosiło 1105 jtk/m<sup>3</sup>.
- Udział frakcji respirabilnej aerozolu bakteryjnego w pomieszczeniu, gdzie wykonuje się analizy laboratoryjne stanowił około 30%, natomiast w pomieszczeniu składującym i utylizującym odpady mikrobiologiczne udział frakcji respirabilnej stanowił ponad 45% całkowitego stężenia aerozolu bakteryjnego.
- Przeprowadzona identyfikacja aerozolu bakteryjnego wykazała, że większa różnorodność gatunkowa wśród wyizolowanych bakterii występowała w pomieszczeniu laboratoryjnym składującym i utylizującym odpady mikrobiologiczne.
- Narażenie na bioaerozol występujący w badanych pomieszczeniach laboratoryjnych nie stanowi bezpośredniego zagrożenia dla zdrowia użytkowników. Jednakże długotrwała inhalacja mikroorganizmów może wywoływać negatywne skutki zdrowotne, szczególnie w grupie osób z przewlekłymi chorobami układu oddechowego.
- Sposobem poprawy jakości mikrobiologicznej powietrza w badanych pomieszczeniach laboratoryjnych jest zapewnienie odpowiedniej wentylacji, intensywne wietrzenie pomieszczeń, a także przestrzeganie procedur badawczych oraz przepisów BHP przez personel laboratoryjny.

## Podziękowania

Praca została wykonana w ramach pracy statutowej finansowanej przez Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki Politechniki Śląskiej w Gliwicach.

## Literatura

1. Brągoszewska E., Mainka A., Pastuszka J., Lizończyk K., Desta Y., *Assessment of Bacterial Aerosol in a Preschool, Primary School and High School in Poland*, Atmosphere, 9, 2018, s. 1-15.
2. Górny R.L., Dutkiewicz J., *Bacterial and Fungal Aerosols in Indoor Environment in Central and Eastern European Countries*, Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 9, 2002, s. 17-23.
3. Mainka A., Zajusz-Zubek E., Kozielska B., Brągoszewska E., *Investigation of air pollutants in rural nursery school – a case study*, [w:] E3S Web of Conferences, 28, 2018, s. 1-8.
4. Godwin C., Batterman S., *Indoor air quality in Michigan schools*, Indoor Air, 17, 2007, s. 109-121.
5. Nasir Z.A., Colbeck I., *Assessment of bacterial and fungal aerosol in different residential settings*, Water, Air, & Soil Pollution, 211, 2010, s. 367-377.
6. Gołofit-Szymczak M., Ławniczek-Walczuk A., Górny R., *Ilościowa i jakościowa kontrola szkodliwych czynników biologicznych w środowisku pracy*, Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy, 2013, s. 5-17.
7. Brągoszewska E., Mainka A., Pastuszka J.S., *Bacterial and Fungal Aerosols in Rural Nursery Schools in Southern Poland*, Atmosphere (Basel), 7, 2016, s.1-16.
8. Aydogdu H., Asan A., Tatman Otkun M., *Indoor and outdoor airborne bacteria in child day-care centers in Edirne City (Turkey), seasonal distribution and influence of meteorological factors*, Environmental Monitoring and Assessment, 164, 2010, s. 53-66.
9. Pastuszka J., *Narażenie na aerozole ziarniste, włókniste i biologiczne (bakterie i grzyby mikroskopijne) populacji generalnej Górnośląskiego Okręgu Przemysłowego*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2001.
10. Szczypa K., *Ryzyko zakażeń zawodowych w laboratorium mikrobiologicznym*, Laboratorium – przegląd ogólnopolski, 5-6, 2013, s. 18-23.
11. Dz.U. nr 81 poz. 716 Rozporządzenie Ministra Zdrowia w sprawie szkodliwych czynników biologicznych, Warszawa 2005
12. Nevalainen A., Willeke K., Liebhaber F., Pastuszka J.S., Burge H., Henningson E., *Bioaerosol sampling*, [w:] Willeke K., Baron P. (red.), Aerosol Measurement: Principles, Techniques and Applications, New York 1993, s. 471-492.
13. Kim K.Y., Kim C.N., *Airborne microbiological characteristics in public buildings of Korea*, Building and Environment, 42, 2007, s. 2188-2196.
14. Strykowska-Sekulska M., Piotraszewska-Pajak A., Szyszka A., Nowicki M., Filipiak M., *Microbiological quality of indoor air in university rooms*, Polish Journal of Environmental Studies, 16, 2007, s. 623-632
15. Mentese S., Rad A.Y., Arisoy M., Gullu G., *Seasonal and Spatial Variations of Bioaerosols in Indoor Urban Environments, Ankara, Turkey*, Indoor and Built Environment, 21, 2012, s. 97-810.
16. Dumala S., Dudzińska M., *Microbiological Indoor Air Quality in Polish Schools*, Annual Set The Environment Protection, 15, 2013, s. 231-244.
17. Brągoszewska E., Mainka A., Pastuszka J.S., *Bacterial aerosols in an urban nursery school in Gliwice, Poland: a case study*, Aerobiologia, 32, 2016, s. 469-480.

## **Ocena wpływu składowania i utylizacji odpadów mikrobiologicznych na jakość powietrza oraz zdrowie pracowników laboratorium mikrobiologicznego**

### **Streszczenie**

Osoby zatrudnione w laboratoriach mikrobiologicznych stanowią grupę pracowników, która w sposób szczególny narażona jest na działanie szerokiego spektrum szkodliwych czynników biologicznych. Praca mikrobiologa wymaga niezwykle dużej ostrożności, a także przestrzegania procedur badawczych oraz przepisów BHP. Bezpośrednie zagrożenie dla zdrowia pracowników laboratoriów mikrobiologicznych stanowią m.in. odpady mikrobiologiczne. Odpowiednia utylizacja, a także inaktywacja tychże odpadów ma wpływ na jakość powietrza wewnątrz laboratoriów. Stąd też niezwykle istotne jest prowadzenie monitoringu jakości mikrobiologicznej powietrza w pomieszczeniach laboratoryjnych. W niniejszej pracy przedstawiono wyniki pomiarów stężeń zanieczyszczeń mikrobiologicznych powietrza w laboratorium składującym i utylizującym odpady mikrobiologiczne, znajdującym się na terenie województwa śląskiego. Próbkę bioaerozoli pobierano przy użyciu 6-stopniowego impaktora Andersena, ze średnicami odcięcia 7.0, 4.7, 3.3, 2.1, 1.1 i 0.65  $\mu\text{m}$  (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Wykazano, iż narażenie na czynniki biologiczne nie stwarza bezpośredniego zagrożenia dla zdrowia pracowników badanego laboratorium, jednak długotrwała inhalacja aerozoli biologicznych w tym pomieszczeniu może spowodować niekorzystne skutki zdrowotne, zwłaszcza u osób wrażliwych na tego typu zanieczyszczenia powietrza. W celu zapewnienia należytej jakości powietrza w analizowanym laboratorium niezbędna jest jego odpowiednia wentylacja oraz intensywne wietrzenie pomieszczenia.

Słowa kluczowe: bioaerozol, aerozol bakteryjny, odpady mikrobiologiczne, jakość powietrza wewnętrznego

## **Assessment of the impact of storage and disposal of microbiological waste on air quality and health of the microbiological laboratory staff**

### **Abstract**

Persons employed in microbiological laboratories constitute a group of employees who are particularly exposed to the wide spectrum of harmful biological agents. The work of a microbiologist requires extreme caution, as well as compliance with research procedures and health and safety regulations. The direct threat to the health of employees of microbiological laboratories are, among others, microbiological waste. Proper disposal as well as inactivation of these wastes has an impact on the quality of air inside laboratories. Therefore, it is extremely important to monitor the microbiological quality of air in laboratory rooms. This paper presents the results of measurements of concentrations of microbiological air pollutants in a laboratory storing and utilizing microbiological waste, located in the Silesia Voivodship. Bioaerosol samples were collected using a 6-stage Andersen impactor, with cut-off diameters of 7.0, 4.7, 3.3, 2.1, 1.1 and 0.65  $\mu\text{m}$  (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). It has been shown that exposure to biological agents does not pose a direct threat to the health of workers in the laboratory under test, however, long-term inhalation of biological aerosols in this room may cause adverse health effects, especially in people sensitive to this type of air pollution. In order to ensure proper air quality in the analyzed laboratory, it is necessary to have adequate ventilation and intensive ventilation of the room.

Keywords: bioaerosol, bacterial aerosol, microbiological waste, indoor air quality (IAQ)

## Indeks Autorów

Brągoszewska E.....	190	Małek A. ....	105
Ciak B. ....	17	Mołoń M.....	17, 31
Cieśla J. ....	89	Palusińska-Szysz M.....	105
Czyżewska U. ....	39	Prusek A. ....	63
Dreksler J. ....	89	Pudełko J.....	63
Dworaczek K.....	147	Rożek A. ....	168
Fordon M. ....	7	Siemieniuk M. ....	39
Gola J. ....	63	Stefaniak M. ....	89
Grabowska E.....	39	Stępień K. ....	17, 31
Janczarek M. ....	74	Styczyński M.....	179
Janikowska G.....	63	Tabernacka A.....	129, 137
Józefczak A.....	105	Turska-Szewczuk A. ....	147
Kowalczyk B. ....	105	Tylicki A.....	39
Koziół M. ....	74	Walczak N.....	147
Krawczyk B. ....	7	Wanarska E.....	53
Kurzylewska M. ....	147	Wojdyła D. ....	17, 31
Lipa P. ....	74	Zambrzycka A. ....	39
Łomża P. ....	129, 137	Żylińska-Urban J. ....	89