

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Postępy Mikrobiologii

Advancements of Microbiology

Kwartalnik

Tom 58

Zeszyt 4•2019

PAŹDZIERNIK – GRUDZIEŃ

CODEN:

PMKMAV 58 (4)

2019

Index Copernicus ICV = 101,48 (2017)

Impact Factor ISI = 0,298 (2018)

Punktacja MNiSW = 20,00 (2019)

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

RADA REDAKCYJNA

JACEK BARDOWSKI (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN), DARIUSZ BARTOSIK (Uniwersytet Warszawski),
JACEK BIELECKI (Uniwersytet Warszawski), RYSZARD CHRÓST (Uniwersytet Warszawski),
JERZY DŁUGOŃSKI (Uniwersytet Łódzki), NADZIEJA DRELA (Uniwersytet Warszawski),
EUGENIA GOSPODAREK-KOMKOWSKA (Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu),
JERZY HREBENDA (Uniwersytet Warszawski), WALERIA HRYNIEWICZ (Narodowy Instytut Leków),
MAREK JAKÓBISIAK (Warszawski Uniwersytet Medyczny), JACEK MIĘDZOBRODZKI (Uniwersytet Jagielloński),
ANDRZEJ PIEKAROWICZ (Uniwersytet Warszawski), ANTONI RÓŻAŁSKI (Uniwersytet Łódzki),
ALEKSANDRA SKŁODOWSKA (Uniwersytet Warszawski), RADOŚLAW STACHOWIAK (Uniwersytet Warszawski),
BOGUSŁAW SZEWCZYK (Uniwersytet Gdański), ELŻBIETA TRAFNY (Wojskowa Akademia Techniczna),
STANISŁAWA TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA (Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego),
GRZEGORZ WĘGRZYN (Uniwersytet Gdański), PIOTR ZIELENKIEWICZ (Uniwersytet Warszawski)

REDAKCJA

JACEK BIELECKI (Redaktor Naczelny)
Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa;
tel. 22 5541304; e-mail: jbielecki@biol.uw.edu.pl

RADOŚLAW STACHOWIAK (Zastępca)
Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa;
tel. 22 5541312; e-mail: radeks@biol.uw.edu.pl

AGNIESZKA SOBOLEWSKA-RUTA (Sekretarz)
Instytut Biotechnologii i Antybiotyków, ul. Starościńska 5, 02-516 Warszawa
tel. 22 3786229, e-mail: post.mikrobiol@biol.uw.edu.pl

MARTA THOMSEN (korekta tekstów angielskich)

ADRES REDAKCJI

Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel.: 22 3786229, 22 5541312
e-mail: post.mikrobiol@biol.uw.edu.pl

REDAKTORZY

MONIKA ADAMCZYK-POPLAWSKA (Uniwersytet Warszawski)
ALEKSANDER DEPTUŁA (Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu),
HENRYK KRUKOWSKI (Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie), BOŻENA NEJMAN-FALEŃCZYK (Uniwersytet Gdański)
RENATA MATLAKOWSKA (Uniwersytet Warszawski), ADRIANNA RACZKOWSKA (Uniwersytet Warszawski)
AGATA GORYLUK-SALMONOWICZ (Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie)
AGNIESZKA KWIATEK (Uniwersytet Warszawski), AGNIESZKA SZCZEPANKOWSKA (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN)
BOHDAN STAROŚCIAK (Warszawski Uniwersytet Medyczny), PIOTR ZALESKI (Instytut Biotechnologii i Antybiotyków)

PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

Redaktor odpowiedzialny: STEFANIA GIEDRYS-KALEMBA (Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie)

Adres Redaktora działu Publikacje Metodyczne i Standardy
ul. Malinowa 11, 72-003 Wołczkowo
tel. 605031324; fax 91 3113186; e-mail: kalemba@mp.pl

STALI RECENZENCI:

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

ISBN 978 - 83 - 923731 - 3 - 1

Informacja o zdjęciu na okładce:

Komórki *Neisseria gonorrhoeae*, mutant szczepu FA1090.

Preparatyka: dr Agnieszka Kwiatek, Zakład Wirusologii, Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet Warszawski.

Zdjęcie: dr Paweł Bącal, Pracownia Inżynierii Nano-hybrydowych Biosystemów Regulacji, Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. M. Nałęcza Polskiej Akademii Nauk.

Obraz SEM uzyskano przy użyciu aparatury zakupionej w ramach projektu CePT POIG.02.02.00-14-024/08-00.

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

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

Podziękowania

Redakcja *Postępów Mikrobiologii* składa serdeczne podziękowania dla Recenzentów spoza Rady Redakcyjnej, którzy przyczynili się do utrzymania i polepszania standardów naszego czasopisma.

Poniżej przedstawiamy listę recenzentów prac w 2019 roku:

Dr hab. Tamara Aleksandrak-Piekarczyk
Dr hab. Daria Augustyniak
Dr Jadwiga Baj
Dr hab. inż. Maria Balcerek, prof. ITFiM
Prof. dr hab. inż. Wiesława Barabasz
Dr Małgorzata Biegańska
Prof. dr hab. Marian Biniek
Prof. dr hab. inż. Elżbieta Daczkowska-Kozon
Dr hab. Łukasz Drewniak, prof. ucz.
Dr hab. Bożena Dworecka-Kaszak
Dr hab. Tomasz Dzieciatkowski
Prof. dr hab. Jan Fiedurek
Dr hab. inż. Karol Fijałkowski
Dr hab. Magdalena Florek, prof. UEP
Prof. dr hab. Mariusz Gagoś
Dr hab. Anna Goc, prof. UMK
Dr hab. inż. Ewa Górską, prof. SGGW
Prof. dr hab. Anna Goździcka-Józefiak
Dr hab. n. med. Adam Junka
Prof. dr hab. Ewa Karwowska
Dr hab. Monika Kordowska-Wiater
Dr hab. inż. Alina Kunicka-Styczyńska, prof. ITFiM
Dr hab. n. o zdr. Cecylia Łukaszuk
Prof. dr hab. Wanda Małek
Dr hab. Aneta Nowakiewicz
Dr hab. Egbert Piasecki
Dr hab. n. med. Aldona Pietrzak
Prof. dr hab. inż. Elżbieta Płaskowska
Dr hab. n. med. Edyta Podsiadły
dr hab. Katarzyna Potrykus, prof. UG
Lek. Leszek Rudzki
Prof. dr hab. Danuta Sosnowska
Prof. dr hab. Zdzisław Targoński
Dr hab. Beata Tokarz-Deptuła
Dr hab. Agnieszka Tokarzewska, prof. UŁ
Prof. dr hab. Stefan Tyski
Mgr Paweł Urbanowicz
Dr hab. Maciej Walczak
Dr hab. Dariusz Wasyl, prof. nadz.
Prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn
Dr n. med. Iwona Wojciechowska-Koszko
Dr hab. Agnieszka Wolna-Maruwka
Dr Tomasz Wołkowicz
Dr hab. Wiktoria Wróblewska, prof. SGH
Dr Patrycja Zalas-Wiecek
Dr Magdalena Zalewska
Dr n. med. Dorota Żabicka



**Ministry of Science
and Higher Education**

Republic of Poland

Zakup numerów DOI dla publikowanych artykułów
oraz profesjonalne tłumaczenie artykułów z języka polskiego na angielski

– zadania finansowane w ramach umowy 659/P-DUN/2018
ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego
przeznaczonych na działalność upowszechniającą naukę.

Wersja elektroniczna wydrukowanych w bieżącym zeszycie artykułów
jest dostępna w archiwum internetowym czasopisma pod adresem:
https://www.exeley.com/journal/advancements_of_microbiology

AVOIDANCE OF MECHANISMS OF INNATE IMMUNE RESPONSE BY *NEISSERIA GONORRHOEAE*

Jagoda Płaczekiewicz*

Department of Virology, Institute of Microbiology, Faculty of Biology, University of Warsaw

Submitted in July, accepted in October 2019

Abstract: *Neisseria gonorrhoeae* (gonococcus) is a Gram-negative bacteria and an etiological agent of the sexually transmitted disease – gonorrhoea. *N. gonorrhoeae* possesses many mechanism to evade the innate immune response of the human host. Most are related to serum resistance and avoidance of complement killing. However the clinical symptoms of gonorrhoea are correlated with a significant presence of neutrophils, whose response is also insufficient and modulated by gonococci.

1. Introduction. 2. Adherence ability. 3. Serum resistance and complement system. 4. Neutrophils. 4.1. Phagocytosis. 4.1.1. Oxygen-dependent intracellular killing. 4.1.2. Oxygen-independent intracellular killing. 4.2. Neutrophil extracellular traps. 4.3. Degranulation. 4.4. Apoptosis. 5. Summary

UNIKANIE MECHANIZMÓW WRODZONEJ ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ PRZEZ *NEISSERIA GONORRHOEAE*

Streszczenie: *Neisseria gonorrhoeae* (gonokok) to Gram-ujemna dwójka będąca czynnikiem etiologicznym choroby przenoszonej drogą płciową – rzeżączki. *N. gonorrhoeae* posiada liczne mechanizmy umożliwiające jej unikanie wrodzonej odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Większość z nich związana jest ze zdolnością gonokoków do manipulowania układem dopełniacza gospodarza oraz odpornością tej bakterii na surowicę. Jednakże symptomy infekcji *N. gonorrhoeae* wynikają między innymi z obecności licznych neutrofilów, których aktywność jest modulowana przez gonokoki.

1. Wprowadzenie. 2. Zdolność adherencji. 3. Surowica i układ dopełniacza. 4. Neutrofile. 4.1. Fagocytoza. 4.1.1. Wewnątrzkomórkowe zabijanie zależne od tlenu. 4.1.2. Wewnątrzkomórkowe zabijanie niezależne od tlenu. 4.2. Neutrofilowe sieci zewnątrzkomórkowe. 4.3. Degranulacja. 4.4. Apoptoza. 5. Podsumowanie

Key words: bacterial pathogenesis, inflammation, innate immune response

Słowa kluczowe: bakteryjna patogenez, stan zapalny, wrodzona odpowiedź immunologiczna

1. Introduction

Nowadays, sexually transmitted infections (STIs) still remain a major global health problem with about 1 million of new cases of chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis or syphilis daily [55]. However, in 2017 the World Health Organization qualified *Neisseria gonorrhoeae*, as the only etiological agent of STIs, among the “priority pathogens” that pose the greatest threat to human health because of antibiotic resistance [54]. In 2012, an estimated 78 million new cases of gonorrhoea caused by an obligatory human pathogen *N. gonorrhoeae* (gonococcus), occurred among 15–45 year-old patients worldwide [16, 55]. Gonococci infect a diverse array of human mucosal surfaces, although the most common place of infection is the genitourinary tract [17]. Infection with *N. gonorrhoeae* leads to acute urethritis in men and cervicitis in women, which in 50–80% cases is asymptomatic [10]. Untreated gonorrhoea may result in serious complications in women such as pelvic inflammatory disease (PID), ectopic pregnancy and infertility [16].

The crucial challenge related to gonorrhoea treatment is increased multi-drug resistance of *N. gonorrhoeae* [54]. What is more, there are problems with constructing an effective vaccine due to the highly antigenically variable surface of these bacteria and lack of appropriate animal model of this disease, with the exception of chimpanzees [20, 26]. Additionally, infection with *N. gonorrhoeae* does not induce protective immunity [12]. Hence it is crucial to understand the mechanisms underlying the ability of gonococci to avoid the first line defence in the human host, which is the innate immune response [26].

2. Adherence ability

One of the main function of the surface structures of gonococci – Opacity-associated proteins (Opa), as virulence factors, is their involvement in attachment to human cells during mucosa infection which facilitates affective colonization. Different Opa proteins can interact with different hosts receptors, for example, human

* Corresponding author: Jagoda Płaczekiewicz, Department of Virology, Institute of Microbiology, Faculty of Biology, University of Warsaw, 1 Miecznikowa Street, 02-096 Warsaw, Poland; e-mail: j.placzekiewicz@biol.uw.edu.pl

carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs): CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5 and CEACAM6 as well as heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) or integrins [36]. CEACAM1 and CEACAM6 have several functions, for example, in cell adhesion and angiogenesis, and are expressed in different cell types. CEACAM3, on the contrary, is expressed in neutrophils only and functions primarily as a receptor for Gram-negative, human-restricted pathogens like *N. gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. Variations in the binding properties of Opa proteins are caused by differences in the sequence of their extracellular loops [2]. Interaction of *N. gonorrhoeae* with CEACAMs proteins expressed on the surface of epithelial cells facilitates bacterial adhesion to host cells and can trigger engulfment and transcytosis through epithelial cells which can lead to further dissemination of the infection [37, 43]. It is commonly known that intracellular bacteria can alter the host's immune response [49]. It has been demonstrated that *N. gonorrhoeae* induces tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor (EGFR), what is an essential step *prior* to invasion and is able to escape autophagy-mediated killing in human epithelial cells by activating the autophagy repressor mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) [27, 48]. Interestingly, a lack of Opa proteins increases transmigration across epithelial cells [45].

3. Serum resistance and complement system

The bactericidal function of human serum depends mostly on the interaction of IgM antibodies with pathogenic bacteria and the further complement-mediated killing of sensitive strains [7]. However, complement activation may occur by 3 different pathways: i) classical, due to the presence of an antigen-antibody complex; ii) alternative, related to interaction with the surface of the pathogen; iii) lectin, based on interactions between soluble pattern recognition molecules (Mannose-binding lectin (MBL), collectin-10, collectin-11 and ficolins) and microbial surface [32, 13]. Activation of these pathways leads to C3-convertase activation, which performs an essential effector function in the whole complement cascade and results in, for example, C3b deposition on the bacterial surface, which enables phagocytic cells to internalize the pathogen, inflammation to progress due to C3a and C5a activity and a Membrane Attack Complex (MAC) to form that eradicates the bacteria directly [19, 32]. However, efficient complement deposition on most pathogenic bacteria requires the initiation of complement activation via the classical pathway [4].

It is generally considered that the complement system plays a crucial role in an innate immune response against *N. gonorrhoeae*: patients with a deficiency of

complement components are more susceptible to disseminated gonococcal infections (DGI) [30]. *N. gonorrhoeae* mainly activates the classical complement pathway and gonococci isolated from the female genitourinary tract are coated with complement components [18, 29]. However, gonococci possess an arsenal of mechanisms that enable this pathogenic bacteria to evade complement-mediated killing.

The most common location of gonococcal infection is the mucosa of the female and male genitourinary tract [17]. It has been demonstrated that *N. gonorrhoeae* freshly isolated from the place of infection is mostly characterized by resistance to the normal human serum (NHS), and that this resistance is lost during the cultivation period [53]. On the basis of gonococcal resistance to NHS, *N. gonorrhoeae* in a population are divided into serum-sensitive and serum-resistance bacteria [34]. Serum-sensitive gonococci mainly cause local infections with symptoms of inflammation while the presence of serum-resistance bacteria is related to the disseminated gonococcal infection [31]. The serum-resistance phenotype is maintained by sialylation of lacto-*N*-neotetraose (LNT) of gonococcal lipooligosaccharide (LOS) by 5-cytidinemonomophospho-*N*-acetylneuraminic acid (CMP-NANA) acquired by *N. gonorrhoeae* from its human host [28]. This modification decreases antibody binding and prevents complement-dependent killing of the bacteria by human sera. This phenomenon is called "unstable" serum-resistance, because the loss of LOS sialylation leads to a serum-sensitive phenotype [9]. It has been demonstrated that the resistance to NHS featured by gonococci with sialylated LOS is related to the ability of this bacteria to bind to factor H (fH) (Figure 1) [41]. Factor H is a complement regulatory protein, which inhibits the complement alternative pathway by, for example, being a cofactor for the cleavage of C3b to hemolytically inactive iC3b and acceleration of C3-convertase decay [52]. However, the bactericidal potential of some domains of this protein has also been demonstrated *in vitro* [40]. Another analysis revealed that interaction of sialylated LOS with fH is influenced by porin (Por) proteins of *N. gonorrhoeae* [28]. Por1A and Por1B proteins represent up to 60% of all surface proteins of *N. gonorrhoeae* and they function as selective anion channels. These two major allelic isoforms of gonococcal porin proteins undergo an equable antigenic variation [31]. Por1A strains are more likely to cause DGI, without symptoms of local inflammation and those gonococci expressing Por1B protein are more related to local genital tract infection and PID [1]. The reason of such a variation of symptoms between these two isoforms is the difference in the ability of Por1A and Por1B expressing gonococci to bind fH: most Por1A proteins can bind to fH and Por1B proteins bind to fH weakly, unless gonococcal LOS is sialylated [41].

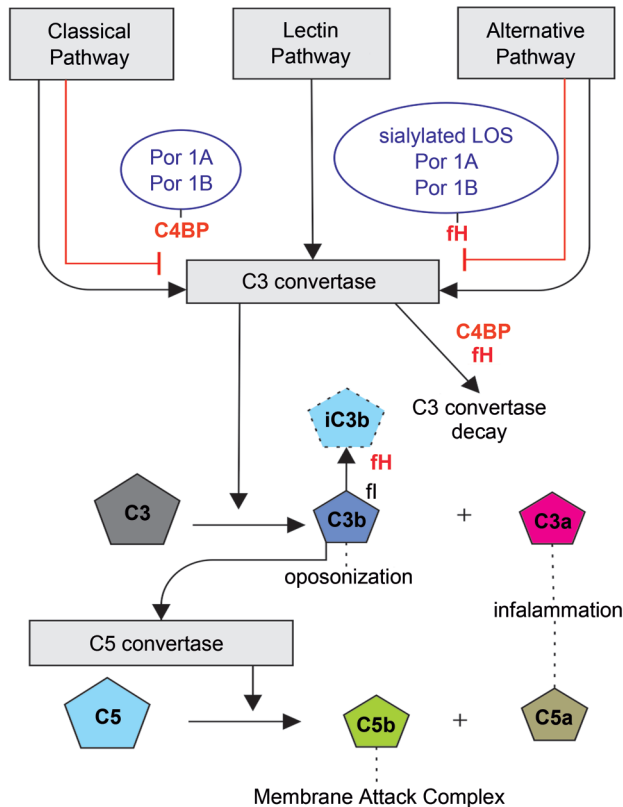


Fig. 1. Diagram of the complement system inhibition by *N. gonorrhoeae* [according to 13, 19, 32, 41, 52]. Por1A – porin 1A; Por1B – porin 1B; fH – factor H; fi – factor I, C4BP – C4b-binding protein; LOS – lipooligosaccharide.

Additionally, despite its function as an alternative pathway inhibitor, fH also enhances the adhesion and invasion of *N. gonorrhoeae* to cervical cells through Complement Receptor 3 (CR3). It has been demonstrated that Por1A-expressing gonococci invade CR3-expressing cells with greater efficiency than Por1B strains and this may be the reason why Por1A strains mostly cause disseminated disease with no signs of inflammation [1].

Another complement regulatory protein that is used by gonococci to evade complement mediated killing is C4b-binding protein (C4BP). This big serum protein can alter all three complement pathways thus inhibiting opsonization and killing by phagocytic cells, and Por1A and certain Por1B strains are able to interact with this protein. Interaction between Por proteins and C4BP protein is strongly correlated with serum resistance phenotype, as it is demonstrated for fH protein [19].

4. Neutrophils

N. gonorrhoeae, during colonization of the urogenital tract mucosa, release pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), that activate, for example, toll-like receptor 2 (TLR2), toll-like receptor 4 (TLR4) and nucleotide-binding oligomerization domain 1 (NOD1)

[8, 33]. As a consequence, the nuclear factor kappa-lightchain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) is activated in epithelial cells and immune cells residing in infected tissue, which results in up-expression and further secretion of many proinflammatory cytokines and chemokines including interleukin 8 (IL-8) [33, 46]. This chemokine acts as a chemoattractant to polymorphonuclear leukocytes (PMNs, neutrophils) circulating in the bloodstream and guides them to the place of infection [46]. In infected tissue, the effective response of PMNs toward pathogenic bacteria depends on: phagocytosis, production of neutrophil extracellular traps (NETs) and degranulation of neutrophils, with the involvement of oxygen-dependent and oxygen-independent mechanisms [3].

Clinical symptoms of gonococcal infection are mainly caused by infiltration of these immune cells. However, it has been demonstrated that *N. gonorrhoeae* is able to survive within PMNs isolated from the site of infection and has evolved many mechanisms to evade neutrophil mediated killing [38] (Figure 2).

4.1. Phagocytosis

Interaction of particular Opa proteins with PMNs CEACAMs (CEACAM1, CEACAM3 and CEACAM6) leads to more efficient phagocytosis of this bacteria by neutrophils in comparison to Opaless gonococci, even without opsonization by complement or antibodies [2]. Furthermore, engulfment of *N. gonorrhoeae* via CEACAM1 and CEACAM6 results in weak activation of PMNs in comparison to CEACAM3-related internalization, which also activates proinflammatory response in these cells. As previously mentioned, gonococci have a major advantage when interacting with CEACAMs on epithelial cells, but Opa expressing *N. gonorrhoeae* are threatened by CEACAM3-expressing neutrophil killing [37]. PMNs activation results in degranulation and oxidative burst, ending in tissue damage, which can help *N. gonorrhoeae* to colonize the deeper layer of epithelia [22, 38]. The same effect is observed during the infiltration of new PMNs that are attracted from the bloodstream by neutrophils that has already internalized *N. gonorrhoeae* and activated their proinflammatory response [43]. Therefore, it is postulated that a balance between Opaless and Opa-positive gonococci is a strategy that enable these bacteria to sequentially and effectively undergo different stages of infection [22].

4.1.1. Oxygen-dependent intracellular killing

During phagocytosis, PMNs are able to eradicate bacteria by oxygen-dependent and oxygen-independent mechanisms. During the process called oxidative burst, activation of nicotinamide adenine dinucleotide

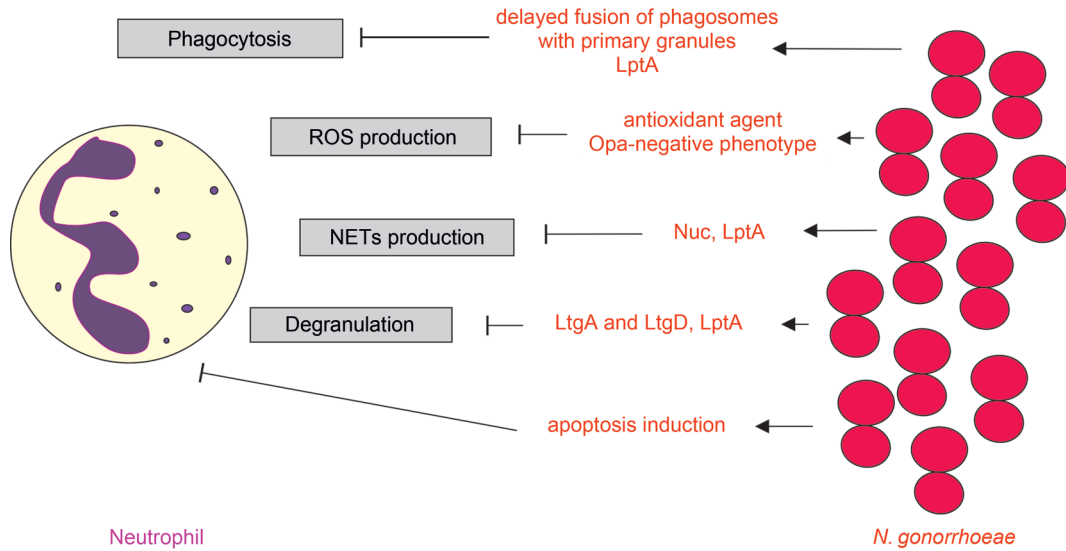


Fig. 2. Evading of neutrophil-mediated killing by *N. gonorrhoeae* [according to 3, 6, 15, 25, 33, 44]. LptA – LOS phosphoethanolamine transferase A; Nuc – thermonuclease homolog; LtgA – lytic transglycosylase A; LtgD – lytic transglycosylase D.

phosphate (NADPH) oxidase in neutrophils sequentially leads to the generation of numerous reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide or hydrochloric acid [38]. *N. gonorrhoeae* features multiple mechanisms that protect this bacterium from oxidative stress. It has been demonstrated that incubation of *N. gonorrhoeae* with sub-lethal concentrations of hydrogen peroxide results in changes of expression of more than 150 genes, including those encoding superoxide dismutase and cytochrome c peroxidase, known antioxidant agents [47]. However, it has also been demonstrated that strains deficient in oxidative stress defence molecules are sensitive to killing by PMNs at the same level as wild type strains [38]. Furthermore, neutrophils from patients with chronic granulomatous disease (CGD), who are deficient in NADPH oxidase, still possess the ability to kill *N. gonorrhoeae* [42].

It is worth mentioning that the other aspect of ROS production is related to *N. gonorrhoeae* phenotype. One of the surface structures of gonococci that modulates the interaction with human cells are Opa [37]. *N. gonorrhoeae* possesses at least 12 *opa* loci and encoding 11 Opa proteins [36]. Expression of Opa undergoes frequent phase variation, also during experimental male infection, so the gonococci in a population differ in Opa protein phenotype. Opa-negative (Opaless) gonococci are unable to induce ROS production in PMNs due to the ability to limit assembly of NADPH oxidase in the neutrophil membrane, in contrast to Opa-positive strains that stimulate the formation of this enzyme [44]. Furthermore, they also suppress oxidative burst caused by other stimuli such as serum-opsonized *Staphylococcus aureus* [2]. Suppression of oxidative burst may be a huge survival advantage for this bacterium and may also be connected to differences in the course of infec-

tion between men and women. Opaless phenotype is more predominant in women and can contribute to asymptomatic infection [44]. Thus, the Opa phenotype strictly facilitates the evasion of oxygen-dependent mechanisms by *N. gonorrhoeae*, although this protein also contributes to the protection to oxygen-independent mechanisms.

4.1.2. Oxygen-independent intracellular killing

It is therefore postulated that the oxygen-independent mechanisms are more significantly related to destroying the subset of *N. gonorrhoeae* that are sensitive to PMNs killing and that the survival advantage of some of gonococci results from an ability to evade these mechanisms [38]. While evading non-oxidative mechanisms, gonococci are able to delay the fusion of phagosomes with primary granules within PMNs, while maintaining fusion with tertiary and secondary granules [23]. The delayed fusion between phagosome and primary granules results in the delayed contact of gonococci with the antimicrobial content of these granules (BPI) [5, 39]. However, it has been demonstrated that the *N. gonorrhoeae* LptA mutant is more susceptible to killing by non-oxidative components of primary granules including cathepsin G than the wild-type strain, so LptA contributes to the protection of gonococci against this protein. Interestingly, *N. gonorrhoeae* that expresses LptA also decreases the maturation of phagosomes, while LptA deficient gonococci are more frequently found in primary granule-positive phagolysosomes [15]. Thus it is postulated that LptA is an important virulence factor that contributes to the adaptation to mechanisms of the host immune response and ensures the survival advantage of *N. gonorrhoeae* [15, 23].

4.2. Neutrophil extracellular traps

One of the mechanisms that is utilized by neutrophils to destroy pathogenic bacteria is the formation of NETs, which are mesh-like structures composed of chromatin and antimicrobial granule components of PMNs, and can be produced by dying neutrophils, during the cell death process called NETosis, or by live cells [50, 25]. The extrusion of NETs to an extracellular matrix, in order to trap microbes, prevents pathogen dissemination as well as being able to activate other immune cells [3]. NETs production by neutrophils is thought to depend on oxidative burst and require myeloperoxidase (MPO) [14]. However, it has been demonstrated that *N. gonorrhoeae* has the ability to stimulate PMNs to produce NETs through oxygen-independent mechanisms too. Interestingly, common surface antigens of gonococci – OpaD protein and pili – reinforce the stimulation of NETs production in neutrophils but are not required for this process. Nevertheless, NETs produced by neutrophils are unable to kill *N. gonorrhoeae in vitro*, unless the gonococci have a OpaD-positive and nonpiliated phenotype and are internalized by PMNs. The authors suggest that the elimination of this bacteria is related to oxidative burst, as the presence of an inhibitor of the NADPH oxidase in PMNs with internalized OpaD-positive and nonpiliated *N. gonorrhoeae* prevent the killing of this bacteria. As NETs are capable of killing *Lactobacillus crispatus*, which is one of the most predominant commensal bacteria of the women's genitourinary tract, it is possible that reduced competition facilitates the colonization of infected niche by *N. gonorrhoeae* [14, 51].

A thermonuclease homolog (Nuc) encoded by *N. gonorrhoeae* is a protein involved in biofilm reorganization by the degradation of DNA. Furthermore, it also enhances the survival of gonococci in the presence of NETs. It has been demonstrated that recombinant Nuc is able to degrade DNA present in NETs, therefore facilitating the weakening of these structures' integrity. Thus, this protein is considering as a virulence factor of gonococci that can defend these bacteria against extracellular killing by neutrophils [25].

Another gonococcal protein that facilitates bacterial survival in the presence of NETs is LOS phosphoethanolamine transferase A (LptA), which is a phase-variable enzyme that catalyzes the addition of phosphoethanolamine (PEA) to 4' phosphate on lipid A. This enzymatic modification of the LOS component by LptA results in less killing of *N. gonorrhoeae* by NETs produced by PMNs, in comparison to gonococci without this modification. This process may occur due to the fact that *N. gonorrhoeae* mutant in the gene encoding LptA protein is more sensitive to the serine protease cathepsin G, which is also a compo-

nent of NETs, compared to the wild-type strain [15, 11]. Interestingly, it has also been demonstrated that a lack of 4' PEA modification in lipid A in most commensal *Neisseria* species decreases inflammatory response towards these bacteria in human monocytes, thus contributing to the immune privilege of these strains [21]. Surprisingly, it is postulated that the activation of the proinflammatory response by gonococci may be favourable to them, because *N. gonorrhoeae* is able to avoid most of the mechanisms of the innate immune response and may use damaged tissue as a source of nutrients and a way to colonize deeper layers of the epithelia [15].

4.3. Degranulation

Production of NETs is not the only mechanism by which neutrophils combat *N. gonorrhoeae* extracellularly. During the process called degranulation, neutrophil's granules fuse with the cytoplasmic membrane and release antimicrobial molecules including, for example, cathepsin G [3, 11]. Despite the protective role of LptA against extracellular killing by neutrophils, gonococci also possess other enzymes that are involved in the protection against antimicrobial proteins released by neutrophils [15, 33]. Double mutant in genes encoding two lytic transglycosylases (LTs): LtgA and LtgD, which are involved in peptidoglycan release, is more sensitive to lysozyme and neutrophil elastase than double complement *N. gonorrhoeae*. The reason is decreased envelope integrity in the analysed mutant. Additionally, infection of the human primary neutrophils with *N. gonorrhoeae* expressing LtgA and LtgD results in decreased release of the neutrophil's antimicrobial molecules compared to the mutant in genes encoding these two proteins [33]. In conclusion, *N. gonorrhoeae*, as a highly adapted human pathogen, has many factors that contributes to its response against the extracellular antimicrobial mechanism of neutrophils.

4.4. Apoptosis

Another mechanism that *N. gonorrhoeae* uses to its own advantage is the election of an anti-apoptotic effect in neutrophils. This process occurs through inhibition of caspase-3 and suppression of effect of proapoptotic agents like staurosporine by *N. gonorrhoeae*. Due to the fact that infection with gonococci results in NF- κ B activation and further neutrophil migration toward the site of infection, it is postulated that the inhibition of apoptosis in these cells provides a notable niche for the replication of gonococci in these normally short-lived cells [6].

5. Summary

Innate immune response is a first line of defence against pathogenic bacteria including *N. gonorrhoeae* [26]. However asymptomatic infections in women, a lack of protective immunity observed in many patients and long-term complications like disseminated gonococcal infections indicate that this pathogen possesses an arsenal of mechanisms to avoid this response [1, 10, 12].

As demonstrated, *N. gonorrhoeae* has many virulence factors that undergo phase and antigenic-variation and play a crucial role in adapting to the hostile environment of infected human tissues, which includes elements of the host's innate immune response [31, 44, 51]. The ability of gonococci to evade complement-mediated killing through, for example, C4BP protein is considered to be the reason why this bacteria can only establish infection in humans and experimental infection in chimpanzees, which indicates that *N. gonorrhoeae* is a highly adapted human pathogen majorly through the ability to avoid the human innate immune response [31].

Furthermore, *N. gonorrhoeae*, in contrast with many pathogenic microorganisms, possesses mechanisms (like the modification of lipid A) that boost the detection of this bacteria by the human host, thus enhancing inflammation [15]. However, due to the ability to evade both oxygen-dependent and oxygen-independent antibacterial activities of PMNs, gonococci take advantage of the tissue degradation caused by inflammation [15]. Consequently, persistent gonococcal infection in the presence of neutrophils leads to an effective colonization of infected tissues and further dissemination of bacteria [23]. Thus, phase and antigenic-variation of many virulence factors that are used by gonococci to evade complement and neutrophil-mediated killing is involved in the overall modulation of the innate immune response in order to take advantage of subsequently induced stages of this response by *N. gonorrhoeae* [15, 23].

As *N. gonorrhoeae* is a strictly human pathogen and many virulence factors of this bacteria undergo phase and antigenic-variation, there has still been limited progress in making a gonorrhoea vaccine [35]. Taking into account the increasing antibiotic resistance of *N. gonorrhoeae* and the absence of an effective vaccine, a full understanding of the mechanism underlying the modulation of the host's immune response by this pathogen seems to be imperative [17].

References

1. Agarwal S., Ram S., Ngampasutadol J., Gulati S., Zipfel P.F., Rice P.A.: Factor H facilitates adherence of *Neisseria gonorrhoeae* to complement receptor 3 on eukaryotic cells. *J. Immunol.* **185**, 4344–4353 (2010)
2. Ball L.M., Criss A.K.: Constitutively Opa-expressing and Opa-deficient *Neisseria gonorrhoeae* strains differentially stimulate and survive exposure to human neutrophils. *J. Bacteriol.* **195**, 2982–2990 (2013)
3. Bardeol B.W., Kenny E.F., Sollberger G., Zychlinsky A.: The balancing act of neutrophils. *Cell. Host. Microbe*, **15**, 526–536 (2014)
4. Blom A.M., Hallström T., Riesbeck K.: Complement evasion strategies of pathogens-Acquisition of inhibitors and beyond. *Mol. Immunol.* **46**, 2808–2817 (2009)
5. Casey S.G., Shafer W.M., Spitznagel J.K.: Anaerobiosis increases resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to O2-independent antimicrobial proteins from human polymorphonuclear granulocytes. *Infect. Immun.* **47**, 401–407 (1985)
6. Chen A., Seifert H.S.: *Neisseria gonorrhoeae*-mediated inhibition of apoptotic signalling in polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* **79**, 4447–4458 (2011)
7. Chen T., Swanson J., Wilson J., Belland R.J.: Heparin protects Opa1 *Neisseria gonorrhoeae* from the bactericidal action of normal human serum. *Infect. Immun.* **63**, 1790–1795 (1995)
8. Cooper M.D., Roberts M.H., Barauskas O.L., Jarvis G.A.: Secretory leukocyte protease inhibitor binds to *Neisseria gonorrhoeae* outer membrane Opacity protein and is bactericidal. *Am. J. Reprod. Immunol.* **68**, 116–127 (2013)
9. de la Paz H., Cooket S.J., Hekels J.E.: Effect of sialylation of lipopolysaccharide of *Neisseria gonorrhoeae* on recognition and complement-mediated killing by monoclonal antibodies directed against different outer membrane antigens. *Microbiology*, **141**, 913–920 (1995)
10. Edwards J.L., Apicella M.A.: The molecular mechanisms used by *Neisseria gonorrhoeae* to initiate infection differ between men and women. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 965–981 (2004)
11. Folco E.J., Mawson T.L., Vromman A., Bernardes-Souza B., Franck G., Persson O., Nakamura M., Newton G., Luscin-skas F.W., Libby P.: Neutrophil extracellular traps induce endothelial cell activation and tissue factor production through interleukin-1 α and cathepsin G. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **38**, 1901–1912 (2018)
12. Fox K.K., Thomas J.C., Weiner D.H., Davis R.H., Sparling P.F., Cohen M.S.: Longitudinal evaluation of serovar-specific immunity to *Neisseria gonorrhoeae*. *Am. J. Epidemiol.* **149**, 353–358 (1999)
13. Garred P., Genster N., Pilely K., Bayarri-Olmos R., Rosbjerg A., Ma Y.J., Skjoedt M.O.: A journey through the lectin pathway of complement-MBL and beyond. *Immunol. Rev.* **274**, 74–97 (2016)
14. Gunderson C.W., Seifert H.S., Juneau R.A., Stevens J.S., Apicella M.A., Criss A.K.: *Neisseria gonorrhoeae* elicits extracellular traps in primary neutrophil culture while suppressing the oxidative burst. *mBio*, **6**, e02452–14 (2015)
15. Handing J.W., Criss A.K.: The lipooligosaccharide modifying enzyme LptA enhances gonococcal defense against human neutrophils. *Cell. Microbiol.* **17**, 910–921 (2015)
16. Hill S.A., Masters T.L., Wachter J.: Gonorrhoea – an evolving disease of the new millennium. *Microb. Cell*, **3**, 371–389 (2016)
17. Hung M.C., Christodoulides M.: The biology of *Neisseria* adhesins. *Biology (Basel)*, **2**, 1054–1109 (2013)
18. Ingwer I., Petersen B.H., Brooks G.: Serum bactericidal action and activation of the classic and alternate complement pathways by *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Lab. Clin. Med.* **92**, 211–220 (1978)
19. Jarva H., Ngampasutadol J., Ram S., Rice P.A., Villoutreix B.O., Blom A.M.: Molecular characterization of the interaction between porins of *Neisseria gonorrhoeae* and C4b-binding protein. *J. Immunol.* **179**, 540–547 (2007)
20. Jerse A.E.: Experimental gonococcal genital tract infection and opacity protein expression in estradiol-treated mice. *Infect. Immun.* **67**, 5699–5708 (1999)

21. John C.M., Liu M., Phillips N.J., Yang Z., Funk C.R., Zimmerman L.I., Griffiss J.M., Stein D.C., Jarvis G.A.: Lack of lipid A pyrophosphorylation and functional LptA reduces inflammation by *Neisseria* commensals. *Infect. Immun.* **80**, 4014–4026 (2012)
22. Johnson M.B., Ball L.M., Daily K.P., Martin J.N., Columbus L., Criss A.K.: Opa⁺ *Neisseria gonorrhoeae* exhibits reduced survival in human neutrophils via Src family kinase-mediated bacterial trafficking into mature phagolysosomes. *Cell. Microbiol.* **17**, 648–665 (2015)
23. Johnson M.B., Criss A.K.: Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to neutrophils. *Front. Microbiol.* **2**, 77 (2011)
24. Johnson M.B., Criss A.K.: *Neisseria gonorrhoeae* phagosomes delay fusion with primary granules to enhance bacterial survival inside human neutrophils. *Cell. Microbiol.* **15**, 1323–1340 (2013)
25. Juneau R.A., Stevens J.S., Apicella M.A., Criss A.K.: 1A thermolysin of *Neisseria gonorrhoeae* enhances bacterial escape from killing by neutrophil extracellular traps. *J. Infect. Dis.* **212**, 316–324 (2015)
26. Liu Y., Hammer L.A., Liu W., Hobbs M.M., Zielke R.A., Sikora A.E., Jerse A.E., Egilmez N.K., Russell M.W.: Experimental vaccine induces Th1-driven immune responses and resistance to *Neisseria gonorrhoeae* infection in a murine model. *Mucosal Immunol.* **10**, 1594–1608 (2017)
27. Lu P., Wang S., Lu Y., Neculai D., Sun Q., van der Veen S.: A Subpopulation of intracellular *Neisseria gonorrhoeae* escapes autophagy-mediated killing inside epithelial cells. *J. Infect. Dis.* **219**, 133–144 (2019)
28. Madico G., Ngampasutadol J., Gulati S., Vogel U., Rice P.A.: Factor H binding and function in sialylated pathogenic *Neisseriae* is influenced by gonococcal, but not meningococcal, porin. *J. Immunol.* **178**, 4489–4497 (2007)
29. McQuillen D.P., Gulati S., Ram S., Turner A.K., Jani D.B., Heeren T.C., Rice P.A.: Complement processing and immunoglobulin binding to *Neisseria gonorrhoeae* determined *in vitro* simulates *in vivo* effects. *J. Infect. Dis.* **179**, 124–135 (1999)
30. Morgan B. P. Walport M.J.: Complement deficiency and disease. *Immunol. Today*, **12**, 301–306 (1991)
31. Ngampasutadol J., Tran C., Gulati S., Blom A.M., Jerse A.E., Ram S., Rice P.A.: Species-specificity of *Neisseria gonorrhoeae* infection: do human complement regulators contribute? *Vaccine*, **26**, 62–66 (2008)
32. Noris M., Remuzzi G.: Overview of complement activation and regulation. *Semin. Nephrol.* **33**, 479–492 (2013)
33. Ragland S.A., Schaub R.E., Hackett K.T., Dillard J.P., Criss A.K.: Two lytic transglycosylases in *Neisseria gonorrhoeae* impart resistance to killing by lysozyme and human neutrophils. *Cell. Microbiol.* **19** (2017)
34. Rice P.A.: Molecular basis for serum resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Clin. Microbiol. Rev.* **2S**, 112–117 (1989)
35. Rice P.A., Shafer W.M., Ram S., Jerse A.E.: *Neisseria gonorrhoeae*: drug resistance, mouse models, and vaccine development. *Annu. Rev. Microbiol.* **71**, 665–686 (2017)
36. Roth A., Mattheis C., Muenzner P., Unemo M., Hauck C.R.: Innate recognition by neutrophil granulocytes differs between *Neisseria gonorrhoeae* strains causing local or disseminating infections. *Infect. Immun.* **81**, 2358–2370 (2013)
37. Sarantis H., Gray-Owen S.D.: Defining the roles of human carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecules during neutrophil responses to *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.* **80**, 345–358 (2012)
38. Seib K.L., Simons M.P., Wu H.J., McEwan A.G., Nauseef W.M., Apicella M.A., Jennings M.P.: Investigation of oxidative stress defenses of *Neisseria gonorrhoeae* by using a human polymorphonuclear leukocyte survival assay. *Infect. Immun.* **73**, 5269–5272 (2005)
39. Shafer W.M., Morse S.A.: Cleavage of the protein III and major iron-regulated protein of *Neisseria gonorrhoeae* by lysosomal cathepsin G. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 152–162 (1987)
40. Shaughnessy J., Ram S. et al.: Human Factor H domains 6 and 7 fused to IgG1 Fc are immunotherapeutic against *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Immunol.* **201**, 2700–2709 (2018)
41. Shaughnessy J., Ram S., Bhattacharjee A., Pedrosa J., Tran C., Horvath G., Monks B., Visintin A., Jokiranta T.S., Rice P.A.: Molecular characterization of the interaction between sialylated *Neisseria gonorrhoeae* and factor H. *J. Biol. Chem.* **286**, 22235–22242 (2011)
42. Simons M.P., William M.N., Apicella M.A.: Interactions of *Neisseria gonorrhoeae* with adherent polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immunol.* **73**, 1971–1977 (2005)
43. Sintsova A., Sarantis H., Eshita A.I., Sun C.X., Amin M., Chan C.H.F., Stanners C.P., Glogauer M., Gray-Owen S.D.: Global analysis of neutrophil responses to *Neisseria gonorrhoeae* reveals a self-propagating inflammatory program. *PLoS Pathog.* **10** (2009)
44. Smirnov A., Daily K.P., Criss A.K.: Assembly of NADPH oxidase in human neutrophils is modulated by the opacity-associated protein expression state of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.* **82**, 1036–1044 (2014)
45. Stein D.C., LeVan, A., Hardy B., Wang L., Zimmerman L., Song W.: Expression of opacity proteins interferes with the transmigration of *Neisseria gonorrhoeae* across polarized epithelial cells. *PLoS One*, **10**, e0134342 (2015)
46. Stevens J. S., Gray M.C., Morisseau C., Criss A.K.: Endocervical and neutrophil lipoxygenases coordinate neutrophil trans-epithelial migration to *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Infect. Dis.* **218**, 1663–1674 (2018)
47. Stohl E.A., Criss A.K., Seifert H.S.: The transcriptome response of *Neisseria gonorrhoeae* to hydrogen peroxide reveals genes with previously uncharacterized roles in oxidative damage protection. *Mol. Microbiol.* **58**, 520–532 (2005)
48. Swanson K.V., Griffiss J.M., Stein D.C., Song W.: *Neisseria gonorrhoeae*-induced transactivation of EGFR enhances gonococcal invasion. *Cell. Microbiol.* **13**, 1078–1090 (2011)
49. Tam J.C., Jacques D.A.: Intracellular immunity: finding the enemy within – how cells recognize and respond to intracellular pathogen. *J. Leukoc. Biol.* **96**, 233–244 (2014)
50. Teng T.S., Ji A.L., Ji X.Y., Li Y.Z.: Neutrophils and immunity: from bactericidal action to being conquered. *J. Immunol. Res.* **3**, 1–14 (2017)
51. Vielfort K., Sjölander H., Roos S., Jonsson H., Aroa H.: Adherence of clinically isolated lactobacilli to human cervical cells in competition with *Neisseria gonorrhoeae*. *Microbes Infect.* **10**, 1325–1334 (2008)
52. Welsch J.A., Ram S.: Factor H and Neisserial pathogenesis. *Vaccine*, **26**, I40–I45 (2008)
53. Wetzler L.M., Barry K., Blake M.S., Gotschlich E.C.: Gonococcal lipooligosaccharide sialylation prevents complement-dependent killing by immune sera. *Infect. Immun.* **60**, 39–43 (1992)
54. World Health Organization: Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics, 27.02.2017, <https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/> (08.07.2019)
55. World Health Organization: WHO guidelines for the treatment of *Neisseria gonorrhoeae*. 2016, <https://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/gonorrhoea-treatment-guidelines/en/> (08.07.2019)

EDAPHIC FACTORS AND THEIR INFLUENCE ON THE MICROBIOLOGICAL BIODIVERSITY OF THE SOIL ENVIRONMENT

Karolina Furtak*, Anna Gałązka

Department of Agricultural Microbiology Institute of Soil Science and Plant Cultivation – State Research Institute

Received in September, accepted in October 2019

Abstract: The edaphic factors are the soil properties that affect the diversity of organisms living in the soil environment. These include soil structure, temperature, pH, and salinity. Some of them are influenced by man, but most are independent of human activity. These factors influence the species composition of soil microbial communities, but also their activity and functionality. The correlations between different abiotic factors and microbial groups described in this manuscript indicate both the complexity of the soil environment and its sensitivity to various stimuli.

1. Introduction. 2. Soil type and structure. 3. Soil pH and salinity. 4. Soil temperature. 5. Soil moisture. 6. Organic carbon and nitrogen content. 7. Heavy metals content. 8. Conclusions

CZYNNIKI EDAFICZNE I ICH WPŁYW NA BIORÓŻNORODNOŚĆ MIKROBIOLOGICZNĄ ŚRODOWISKA GLEBOWEGO

Streszczenie: Czynniki edaficzne to właściwości gleby, które wpływają na różnorodność wszystkich organizmów żyjących w środowisku glebowym. Należą do nich m.in. struktura gleby, temperatura, pH, zakwaszenie i zasolenie. Na niektóre z nich człowiek ma wpływ, ale większość z nich jest niezależna od działalności człowieka. Czynniki te, wpływają na skład gatunkowy zbiorowisk mikroorganizmów glebowych, ale także na ich aktywność oraz funkcjonalność. Opisane w niniejszym manuskrypcie korelacje pomiędzy różnymi czynnikami abiotycznymi oraz grupami drobnoustrojów wskazują zarówno na złożoność środowiska glebowego, jak i jego wrażliwość na różne bodźce.

1. Wprowadzenie. 2. Typ i struktura gleby. 3. pH i zasolenie gleby. 4. Temperatura gleby. 5. Wilgotność gleby. 6. Zawartość węgla organicznego i azotu. 7. Zawartość metali ciężkich. 8. Podsumowanie.

Key words: abiotic factors, biodiversity, edaphic factors, soil functionality, soil microorganisms

Słowa kluczowe: czynniki abiotyczne, bioróżnorodność, czynniki edaficzne, funkcjonalność gleby, mikroorganizmy glebowe

1. Introduction

Soil microbiome includes all saprophytic microorganisms, commensals and parasites that inhabit the soil. It is estimated that one gram of fresh fertile soil matter can contain up to billions of bacteria [53]. The taxonomic and functional diversity of microorganisms and their interactions affect the functioning of the whole soil ecosystem. Many species complement each other and form a system responsible for soil processes. The functional diversity of soil microbiomes is related to the proper functioning of terrestrial ecosystems. The diversity of microorganisms in the soil environment depends on the physical and chemical properties of the soil and, indirectly, on the anthropogenic factors that influence them.

Ecological (environmental) factors are divided into abiotic and biotic. This study is concerned with abiotic factors, *i.e.* inanimate elements of the environment, which affect the functioning of living organisms

directly or indirectly. They are chemical and physical parts of the environment. The whole range of soil conditions affecting the life of soil organisms is called edaphic factors. They are distinguished as a separate group of abiotic factors according to the importance of soil in terrestrial ecosystems. They are prerequisites for the existence of specific habitat conditions and, as a result of the specific composition of the community of the organisms that inhabit them [35].

Among the edaphic factors related to the soil we can distinguish (Fig. 1.):

- soil structure and type,
- soil temperature,
- soil moisture,
- soil pH and acidity,
- mineral salt content (salinity).

Shelford's universal ecological law says that the optimal development of any organism depends on the balance of a complex of environmental factors [36]. The ecological tolerance is a range of any factor (abiotic

* Corresponding author: Karolina Furtak, Department of Agricultural Microbiology, Institute of Soil Science and Plant Cultivation – State Research Institute, Czartoryskich Street 8, 24-100 Puławy; phone 81 478 69 61; e-mail: kfurtak@iung.pulawy.pl

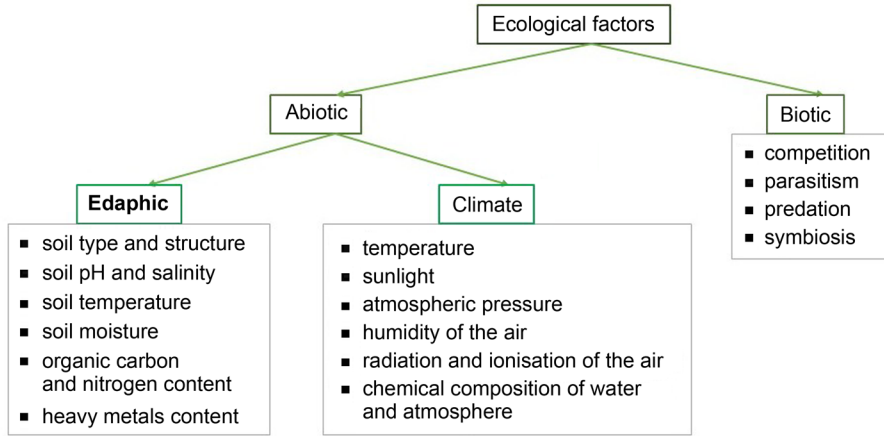


Fig. 1. Types of ecological factors.

or biotic) in which the organism can exist, *i.e.* perform physiological processes. However, the maximum growth, activity and reproduction of each organism take place within the limits of the optimum occurrence of a given environmental factor (Fig. 2). This also applies to soil microorganisms.

The availability of water, temperature and salinity vary the types of soil microorganisms and create frontiers, in which the microorganism can survive and affect competition between species. Edaphic properties are the basic ecological filter affecting the structure of soil microbiomes [9].

Many previous studies of microorganisms based on microbiological cultures on a specific medium, which eliminated a large part of microorganisms that are defined as uncultured [51]. However, it is now known that only 1% of soil microorganisms can be

isolated using traditional methods [15]. For this reason, modern techniques, including molecular biology, are increasingly present in soil microbiology research. In recent years metagenomics has developed. It is a method of genome analysis consisting of all microorganisms inhabiting the environment [76]. Modern research methods allow us to explore the influence of various environmental factors on soil microorganisms [18]. Researchers use them to analyze the impact of the environment on the diversity of soil microorganisms. Some research concerning the influence of edaphic factors on soil microbiome is presented in this review.

The aim of this review is to determine the existing knowledge on the most important abiotic factors influencing soil microorganisms and to highlight the importance of modern research methods in the identification of soil microbiological biodiversity.

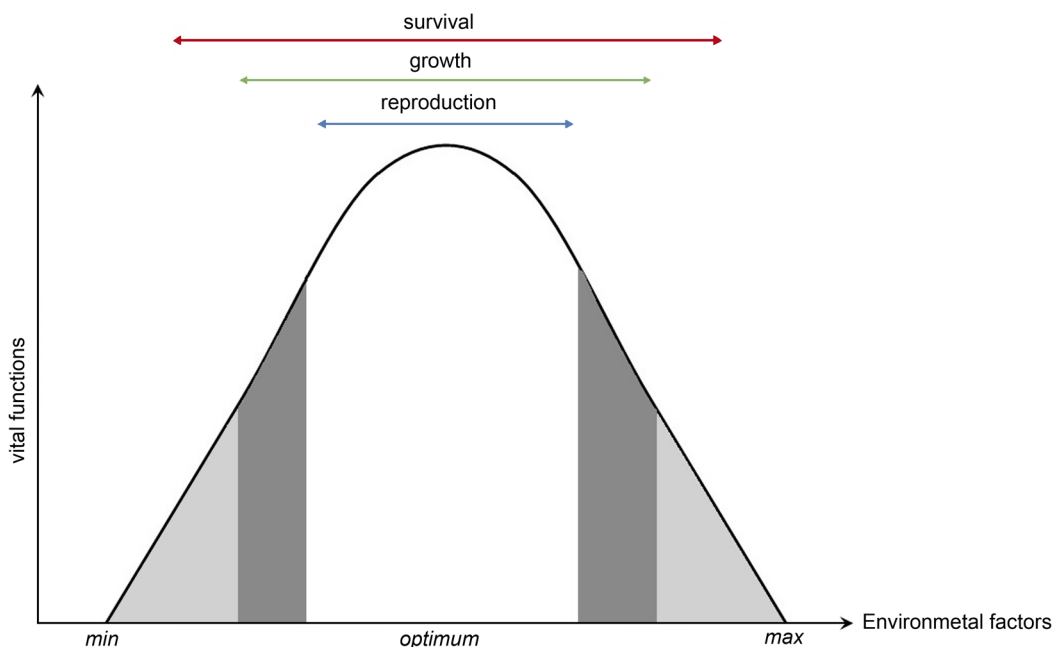


Fig. 2. General ecological tolerance curve of the species. Based on Lynch and Gabriel [45].

2. Soil type and structure

Soil structure includes the size, shape, and arrangement of particles such as sand, silt, and clay [39]. It was shown that micro-grained soils usually contain higher amounts of microbial biomass than coarse-grained soils. It was found that the lighter soil structure favoured the development of bacteria [4]. Researchers indicate that clay molecules and a higher number of micropores in fine-grained soil limit the development of mesofauna, which protects microorganisms from predation [50]. Meliani *et al.* [50] showed that bacterial abundance was correlated with soil fractions, while no correlation between fungal abundance and fractions was observed. Using Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) analysis researchers found dominant associations of *Alphaproteobacteria* to large soil particles (*i.e.* sand) and *Halophaga* and *Acidobacterium* associations with smaller soil's particles (*i.e.* clay) [66].

With the use of classical microbiological methods, *i.e.* culture on media, the research on 18 soil types in Georgia showed that soils differ in their total bacterial abundance and in the prevalence of some types of bacteria such as *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Rhodococcus* [17]. It was found that brown, chernozem and marshy soils are the richest in terms of bacterial abundance. *Bacillus* bacteria dominate in the majority of soils studied by researchers, *Pseudomonas* bacteria were the most abundant in alluvial and brown forest soils, while *Rhodococcus* sp. is common in yellow-brown and red forest soils. In the course of research conducted on eight types of Polish soils by Grządziel and Gałązka [26] using the next generation sequencing (NGS; MiSeq, Illumina), a ten types of bacteria common to all eight soils were selected: *Conexibacter*, *Bacillus*, *Saccharopolyspora*, *Rhodoplanes*, *Azospirillum*, *Paenibacillus*, *Streptomyces*, *Gemmatimonas* and *Mycobacterium*. The analysis of the microbiome of the chickpeas rhizosphere growing on different soil types in the same climate also showed that microbiomes differ from soil to soil [47]. This eubacterial community structure was examined by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), and the authors have concluded that the bacterial community structure in the rhizosphere as affected by a complex interaction between soil type and plant species. In different soil types under lettuce cultivation subjected to the same agrotechnical treatments and identical climatic conditions, bacterial differentiation depending on the soil type was found [65]. Kuramae *et al.* [38] using the PhyloChip analysis, which is the high-density DNA microarray, also indicate that some bacterial taxa are strongly correlated with the physicochemical properties of the soil.

The determination of an unequivocal influence of soil type and type on the structure of microbial com-

munities is a difficult issue because of the complexity of taking into account many variables (minerals, texture, pH, physical structure, *etc.*) when comparing different soils.

3. Soil pH and salinity

The soil pH depends on the type of rock from which the soil was formed. Acid soils are formed from igneous rocks and sands. Alkaline soils are formed from carbonate rocks (*e.g.* limestone). In addition, the pH of the soil is influenced by climate, rock weathering, organic matter and human activity [21]. The soils are strongly acidic ($\text{pH}_{\text{KCL}} < 4.5$), acidic ($\text{pH}_{\text{KCL}} 4.5 - 5.5$), slightly acidic ($\text{pH}_{\text{KCL}} 5.6 - 6.5$), neutral ($\text{pH}_{\text{KCL}} 6.6 - 7.2$) and alkaline ($\text{pH}_{\text{KCL}} > 7.2$) [23]. In Poland, the soil pH ranges from 3.0 to 8.5. The lowest pH is found in non-carbonate forest soils and the highest in carbonate soils [23].

The impact of various factors on the composition of soil microorganisms was investigated using 16S V4–5 region sequencing (HiSeq, Illumina) and it was shown that soil pH has a significant influence on the development of specific bacteria [57]. Researchers showed, that soil pH significantly correlated with such bacteria phyla as *Acidobacteria*, *Beta-Proteobacteria* and *Bacteroidetes*. In another study, using NGS, it was also shown that the pH is often identified as the main factor affecting, in particular, the bacterial communities and archaea [9]. Different groups of microorganisms have distinct limits for optimal pH, so that acidic, neutral and alkaline soils have a different microbial structure, both in terms of quantity and diversity of the population. The pH value indirectly affects the structure of microbial communities, also by influencing the availability of nutrients in the soil [57]. Most soil microorganisms prefer a pH close to neutral (6–7). However, there are also those adapted to extreme pH values, *i.e.* acidophiles and alkalophiles. Acidophilic microorganisms develop in very acidic environments at pH 3.0 or lower. These are, among others, bacteria from genera: *Acidithiobacillus*, *Thiobacillus*, *Acetobacter*, *Alicyclobacillus* and some species from the *Acidobacteria*. Archaea representatives were isolated from dry soil (Japan) with extremely low pH: *Picrophilus torridus* and *P. oshimae*, which develop at pH 0.7 [59]. Alkalophiles grow optimally at pH above 9.0, which is found in desert sodium soils (*e.g.* in the west of the United States). Among the alkalophilic microorganisms present in the soil one can distinguish the representatives of the genera *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Methanobacterium*, and *Corynebacterium*. Extreme alkalophilic actinomycete strain isolated from desert soil in Egypt consistently to the genus *Nocardopsis*, which was confirmed by 16S rDNA analysis and researchers

proposed name *N. alkaliphila*. This bacterium grows at pH between 7.0 and 12.0 [30].

Analysis of soil Phospholipid Fatty Acid (PLFA) showed that low pH can increase the total abundance of fungi in the soil fivefold, with a simultaneous decrease in the number of bacteria [62]. They are preferable to pH between 4 and 6, and some of them, such as *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Penicillium* or *Trichosporon*, are even acidophilic [34]. Grządziel and Gałązka [26] showed that the soil with the lowest pH analyzed (4.0; Brunic Arenosol I) was characterized by a different microbiome than the other seven soil types. In the Dutch soils, a strong correlation was found between the number of *Bacilli* and *Clostridium* groups with soil pH and phosphorus content [38]. The metagenomic DNAs from soil bacteria analysed by pyrosequenced revealed that in acidic soils (≤ 6.5) a higher diversity and the total number of bacteria was observed in comparison with soils with neutral pH (7.7) [6]. The T-RFLP analyses of soil samples from North and South America also showed that pH is a very important factor influencing the diversity and abundance of soil microorganisms. However, the researchers noted a lower bacterial diversity in acidic soils compared to neutral soils [14]. The effect of pH on the microbial community is already noticeable at broad levels of taxonomic resolution. Zhang *et al.* [81] using high-throughput sequencing observed that the abundance of actinobacteria, *Bacteroidetes*, *Fibrobacteres* and *Firmicutes* was higher at close to neutral pH and much lower at acidic and alkaline pH. *Acidobacteria*, *Chloroflexi* and *Planctomycetes* bacteria were abundant in acidic pH soil, then in neutral pH their number decreased and in alkaline pH slightly increased. The number of bacteria from the genera *Gemmatimonadetes*, and *Nitrospirae* [81] increased linearly with the increase in pH of the soil. One of the most pH-sensitive processes in the soil is nitrification. The conversion of ammonium ions (NH_4^+) to nitrates (NO_3^-) is dependent on the alkalophilic bacteria *Nitrobacter* and *Nitrosomonas*, which optimally increase at pH 7.6–8.8 and are very sensitive to changes in pH [34]. At the same time, the nitrification process affects the pH of the soil, as, during the uptake of NH_4^+ ions by microorganisms, the environment becomes acidified, and during the uptake of NO_3^- ions by bacteria, the soil becomes alkaline [34]. The balance between the two stages of the nitrification reaction allows a constant pH of the soil to be maintained.

In addition to the soil reaction, the salinity level is very important for soil microorganisms. The main soil-soluble salts are sodium, calcium, magnesium and potassium cations and chlorine anions. The salinity of the soil solution affects the osmotic potential and the structural stability of the soil [78]. Depending on electrical conductivity (EC), sodium adsorption ratio (SAR)

and pH, the soil is divided into three groups according to USDA (United States Department of Agriculture) classification:

- (1) saline soils – $\text{EC} > 4,0 \text{ dS m}^{-1}$, $\text{pH} < 8,5$, $\text{SAR} < 13$;
- (2) sodium soils – $\text{EC} > 4,0 \text{ dS m}^{-1}$, $\text{pH} < 8,5$, $\text{SAR} > 13$;
- (3) saline-sodium soils – $\text{EC} < 4,0 \text{ dS m}^{-1}$, $\text{pH} > 8,5$, $\text{SAR} > 13$.

The soil may be salted naturally and anthropologically. This applies to soils where the parent material is rich in soluble salts. Secondary salinity is the result of human activity. It is associated with poor irrigation and drainage of the soil, chemical contamination and incorrect fertilization [78]. High concentrations of salt ions (e.g. Na^+ , Cl^-) are harmful to plants, and salinity itself reduces the activity of microorganisms and changes their activity [2]. Osmotic stress caused by salinity causes cells to be dried out and lysed. Thus, the content of microbial biomass in the soil is also reduced [60]. Fungi are more susceptible to salt stress than bacteria, and therefore a higher bacterial-to-fungi ratio is observed in saline soils [74]. Some microorganisms have the ability to adapt or tolerate salinity in soil by synthesis and accumulation of osmolytes (e.g. proline, betaine, ectoine). Microorganisms called halophytes are particularly suited to high salt concentrations in the soil and produce enzymes resistant to salt and accumulate salt in their cells in quantities corresponding approximately to extracellular concentrations. Such microorganisms include *Halobacteriaceae* (archaea) and *Salinibacter ruber* (bacterium) [69]. Moreover, salinity was identified as the major factor of microbial community composition. Lozupone and Knight [44] research were based on an analysis of 21,752 RNA sequences isolated from 111 environmental samples from soils, sediments and water. Comparing the composition of the bacterial community in the analyzed samples, the researchers determined that salinity is the main determinant of microbiome composition and not the extremes of temperature and pH or other physical and chemical factors. Additionally, it was found that sediments are more phylogenetically differentiated than soil, which has high species-level diversity. Among the sequences obtained, many of them belonged to unnatural bacteria, and more than half of them were not related to literature reports. This indicates the importance of metagenomic studies in the context of environmental microbiology [44].

4. Soil temperature

Temperature is one of the most important edaphic factors determining the limits of microbial development because groups of microorganisms grow at the optimal temperature, and after exceeding this limit their growth is terminated [48]. Soil temperature affects

not only the activity of microorganisms but also seed sprouting, root growth and availability of nutrients. Soil temperature depends on the sunlight reaching the ground surface, water content, terrain topography, air temperature, soil properties and the vegetation [61]. Dry soils quickly warm-up, but also lose heat quickly. Moisture soils maintain their temperature longer, and heat is quickly transferred to the deeper layers. In the summer months, the deeper layers of soil are heated and cooled in the winter months. In 1961–1975, the average annual soil temperature in Poland was 8.9°C, at a depth of 5 cm and in the growing season 14.7°C [61]. As a result of the Ciaranek [7] research, it was found that in the years 2007–2009 in Krakow (Poland) the annual average soil temperature at the same depth was 11.7°C; to the depth of 20 cm it fell (to 11.1°C), and to the depth of 50 cm it again amounted to 11.7°C.

The microorganisms are divided into different groups depending on the temperature optimum: (1) psychrophiles which grow best in an environment below 10°C; (2) mesophiles which are the majority of soil bacteria and have the highest growth rate in the 20–45°C range; (3) thermophiles which grow at 50–65°C [52]. Psychrophilic soil microorganisms occur in the soils of eternal permafrost [77]. These include bacteria (e.g. *Halobacterium lacusprofundi*, *Sphingobacterium antarcticus*), fungi (e.g. *Penicillium jamesonlandense*) and archaeons (e.g. *Methanosarcina* sp.). Based on psychrotrophs, a microbiological consortium was developed: *Eupenicillium crustaceum*, *Paecilomyces* sp., *Bacillus* sp. and *B. atrophaeus* potentially used in agriculture to increase soil fertility [68]. In geothermally heated regions, e.g. volcanic soils, there are microorganisms called hyperthermophiles with an optimum growth rate of 80–113°C [31]. They belong to bacteria and archaea, the vast majority of which are archaea. Two species of *Picrophilus* bacteria have been isolated from dry, volcanic soils in Japan, which grow at 60°C while tolerating pH 0.7 [59].

Changes in soil temperature affect the diversity of the microbiome. The use of next generation sequencing (HiSeq, Illumina), has shown that an increase in soil temperature (up to 58°C) as a result of a continuous underground fire of coal mines located under the surface of the city Centralia (Pennsylvania, United States) caused a reduction in the diversity and number of microorganisms and a decrease in the number of antibiotic resistance genes in soil [11]. Researchers, also using 16S rRNA gene sequencing, found that the soils affected by the fire are highly dominated by a small number of taxonomic microbial units [40]. Temperature also influences the activity of enzymes secreted by microorganisms into the soil environment. It was shown that an increase in temperature stimulates the activity of nitrogenase, an enzyme produced by diazotrophs

bacteria that participates in the atmospheric nitrogen fixation [8]. Climate change, including an increase in temperature, also affects the structure and functioning of soil microorganisms [41]. Both, NGS (MiSeq, Illumina) and EcoPlate™ (Biolog Inc., Hayward, USA) methods were used in the research. Studies based on soil heating (mean soil temperature increase of 2.3°C) have shown that environmental warming has a significant impact on the metabolic potential of microorganisms. In heated soils, amines and carboxylic acids were rapidly decomposed [41]. In addition, it was demonstrated that soil heating has a significant effect on the soil fungal community and results in a decrease in the number of soil fungi to a greater extent than in the case of bacterial communities. Also with the use of classical analytical methods (soil respiration, soil biomass), it was shown that warming lasting longer than 3 years significantly affects the biomass of soil microorganisms [16]. Research using a combination of different research methods – both older and more recent (EcoPlate™, soil microbial biomass, PLFA) – has shown that microorganisms are able to adapt to a soil temperature increase of 1 to 2°C without disturbing the microbial structure [80].

An increase in temperature can also have the effect of dehumidifying the soil and reducing soil moisture, which is also an important edaphic factor affecting soil microorganisms.

5. Soil moisture

Soil moisture is defined as the water content of the soil. It is one of the most important physical parameters in agriculture, as it directly influences the growth of plants. A certain amount of water is stored in the soil. The water content of soil varies in time and space [78]. It depends on the soil properties, the type of vegetation, the intensity of evaporation (thus indirectly also on temperature), the amount and distribution of rainfall and irrigation in the case of arable land [54]. In Poland, precipitation is the primary source of water in soil [33].

Soil moisture affects the organisms living in the soil in many ways. Without the availability of water, microbial life is impossible. The water content of the soil affects the pH, the diffusion of solvents and gases and the availability of nutrients [75]. Water also enables the migration of microorganisms in the soil and the diffusion of compounds between the cells of organisms and the environment and is part of hydrolysis processes, and its content determines the rate of mineralization [34, 78].

Natural fluctuations in moisture associated with seasonal changes and precipitation are an important environmental factor in the metabolism of microorganisms. Recently, however, the frequency of floods and periodic flooding in Poland has been increasing and drought

Table I
Minimum value of water activity in the environment for various microorganisms

Water activity (a_w)	Microorganisms
1.00	<i>Caulobacter</i> , <i>Spirillum</i>
0.98	<i>Pseudomonas</i> , <i>Clostridium</i>
0.95	Gram-negative bacteria
0.91	<i>Bacillus</i> , <i>Lactobacillus</i>
0.88	<i>Saccharomyces</i> , <i>Candida</i>
0.85	Selected filamentous fungi (e.g. <i>Penicillium</i>)
0.80	Part of the yeast
0.75	Most of the filamentous fungi (e.g. <i>Aspergillus</i> , <i>Monascus</i>)
0.60	Halophytes (e.g. <i>Vibrio</i> , <i>Halomonas</i> , <i>Paracoccus</i>)

Based on Libudzisz *et al.* [43] and Kunicki-Goldfinger [37].

periods have been prolonged. Water stress caused by these phenomena affects soil microorganisms [79]. Some bacterial groups are very sensitive to alternating drainage and flooding conditions. These include, inter alia, autotrophic ammonia-oxidizing bacteria, which was confirmed by an analysis of 491bp segment of the *amoA* gene [19]. The researchers created the term water activity in the environment (a_w), which determines the ratio of the partial pressure of soil solution to the partial pressure of clean water and can be used to determine the water demand of microorganisms [37]. It is assumed that chemically pure water has $a_w = 1$.

Bacteria and archaea usually require more water activity to grow than fungi. Most bacteria require to grow $a_w > 0.91$, while most fungi and yeasts can grow at $a_w < 0.80$ (Tab. I).

The physical parameter – soil water potential (pF) [3] – is distinguished in the studies of the soil environment. The pF value of 0.00 corresponds to the full water capacity, which means that all soil pores are filled with water and pF = 4.2 is the point of permanent wilting of plants. In terms of soil water potential of soil microorganisms needed for development, microorganisms can be divided into three main groups:

Hygrophytes – developing at pF below 4.85 – bacteria, selected fungi;

Mesohygrophytes – developing at high pF but up to 5.48 – most fungi;

Xerophytes – capable of growth at a pF greater than 5.48 – some species from genera *Aspergillus* and *Monascus*.

The potential above which microbiological processes are no longer found is pF = 5.68 [3]. The highest values of microbiological activity in the soil are found at water potential of pF value between 2 and 4. The studies showed that the most optimal moisture content for

organotrophic bacteria is 20% of maximum water capacity (MPW), for *Azotobacter* and *Actinomyces* 40%, and for fungi 60% of MPW [5]. At 20% MPW the highest activity of enzymes such as dehydrogenases, catalase or acid and alkaline phosphatases was also observed.

Drought, *i.e.* a decrease in the water content of the soil, may result in an increase in the osmotic pressure of the soil and the formation of a hypertonic solution, which results in the drying out of microbial cells and reduces their activity and growth [56]. Lack of water also reduces the processes of carbon and nitrogen mineralization [78]. Drying the soil increases its oxygenation [34]. Some microorganisms are able to survive in such conditions in the state of anabiosis [43], *i.e.* in the state of extreme decrease in life activity. It is known that fungi are able to exist at lower a_w values than bacteria (Tab. I), for which the optimal a_w value is 0.98–0.99. The increase in bacteria was also observed at low water activity in the environment ($a_w = 0.75$), but it concerned halophilic bacteria of the genera *Halomonas*, *Paracoccus* and *Vibrio*. Halophilic microorganisms and those tolerating low water content have the same defence mechanism – they produce and accumulate osmolytes [78]. As the soil dries, access to nutrients is reduced. Restoring moisture in dry soil is linked to an increase in the number of microorganisms as a result of increased susceptibility to organic matter decomposition [75]. Moisture fluctuations occur naturally in soils in semi-dry and Mediterranean ecosystems, where the soil is often quickly wetted after long periods of drought [13]. Studies show that after 24 hours after irrigation of such dry soil, the maximum microbiological activity in the soil is observed [12]. However, with the increase in the number of drying and irrigation cycles, biomass and microbial activity in the soil decrease, nitrification is inhibited and fungal abundance is reduced, while the number of Gram-positive bacteria increases [78].

Excessive humidity caused by floods, melt or heavy rainfall also causes changes in the structure and activity of the soil microbiome. Increased humidity is associated with reduced oxygen and nitrogen diffusion in the soil [5] and the development of predators that feed on bacteria [34]. Under anaerobic conditions in the soil, the availability of micro and macro-elements is two to four times lower than in a well-oxygenated environment. In the structure of soil microbiome and its activity there are changes caused by soil flooding with water and oxygen loss [20]. Microorganisms start to use oxygen bound to *e.g.* NO_3^- and MnO_2^- , which leads to a reduction in these forms. Excessive irrigation and the associated lack of oxygen intensifies the development of anaerobic microorganisms, which in turn reduces the oxidative-reduction potential and intensifies the processes of reduction and fermentation [34]. Nitrate, manganese, sulphate and iron forms

are reduced [46]. Research using PLFAs indicate that with the loss of oxygen, the number of Gram-negative bacteria decreases and the number of Gram-positive bacteria in the soil increases [73]. Gram-negative fungi and bacteria normally occur in well-aerated soil layers. As a result of oxygen depletion, their number decreases [72, 73]. Among the anaerobic soil microorganisms are, among others, purple bacteria carrying out anaerobic photosynthesis – *Rhodospirillum* sp.; sulphate-reducing bacteria – *Desulfovibrio* sp., *Desulfotomaculum* sp.; and nitrogen-fixing bacteria – *Clostridium* sp.; as well as the representatives of archaea, who produce methane – *Methanobacterium* sp. [43]. As a result of the floods, a decrease in soil microbial biomass was observed and sulphate and nitrate-reducing bacteria were identified [72]. It was also found that the occurrence of intensive precipitation in vineyards increased the development of epiphytic microorganisms, including pathogenic fungi, e.g. *Botrytis cinerea* [63].

6. Organic carbon and nitrogen content

Soil organic matter is a basic indicator of soil quality, which determines its physicochemical properties and biological processes. High humus content in soils is, a factor stabilizing their structure, reducing susceptibility to compaction and degradation [49].

Carbon content plays an important role in the regulation of the diversity and structure of soil microbiome [82]. A research of 29 soil samples from four geographically distinct locations using a small-subunit (SSU) rRNA-based cloning approach demonstrated that carbon-poor soils had microbial composition shifts associated with soil depth [82]. It was shown, that deeper soil communities were less diverse and had strongly dominant genera, whereas surface communities had more an operational taxonomic unit (OTU). It was demonstrated, based on quantitative PCR (qPCR) of genes encoding the key enzymes of ammonia oxidation (*amoA*), nitrate reduction (*narG*) and denitrification (*nirK*, *nirS*, *nosZ*), that the forms of soil carbon (*i.e.* inorganic, organic) affects the structure of denitrification communities, but does not regulate their numbers [29]. Among the microorganisms preferring carbon-rich environments (*e.g.* rhizosphere) based on bacterial and archaeal 16S rRNA sequenced, one can distinguish *Alphaproteobacteria* [28].

Nitrogen in soil is a mobile component that undergoes a number of environmental changes: ammonification, nitrification, denitrification or sorption. Many of these processes involve bacteria, so it is understandable that the amount of nitrogen in the soil determines the number of bacterial communities in the soil [70]. The source of nitrogen in the soil is both mineral and

organic fertilization, decomposition of plant residues, as well as free nitrogen binding by symbiotic bacteria *Rhizobium* or free-living assimilators – *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Beijerinckia*, and *Clostridium*.

The type of nitrogen fertilizer used (*e.g.* urea, sewage sludge, ammonium sulphate, calcium nitrate, manure) has a significant effect on soil pH [27]. Fertilization with *e.g.* ammonium nitrate causes pH decrease in soil by as much as 1.4 and consequently affects the communities of soil bacteria, which was confirmed by pyrosequenced analysis [58]. The use of organic fertilizers increases the number of endophytic nitrifiers in soil [55].

7. Heavy metals content

Heavy metals are naturally present in each soil at a non-hazardous level. However, exceeding certain standards is very harmful. Excessive concentrations of heavy metals in the soil are due to human activity, including, but not limited to, crop errors. Among heavy metals, there are harmful elements such as cadmium, lead, mercury, nickel and arsenic, but also high concentrations of zinc and manganese [1].

Using pyrosequencing, it was shown that in Polish soils zinc decreased both bacterial diversity and species richness. In soils contaminated by zinc, lead and chromium it was possible to delineate the core microbiome, which comprised members of such taxa as *Sphingomonas*, *Candidatus Solibacter* and *Flexibacter* [22]. Using the high-throughput Illumina sequencing of 16S rRNA gene amplicons it was determined also, that bacteria have different reactions to heavy metals. The bacteria that positively correlated with Cd were, among others, *Acidobacteria* Gp and *Proteobacteria*. A negative correlation was found in *e.g.* *Longilinea*. Analysis the effects of heavy metals on a soil microbial community using DGGE showed that exposing soil to heavy metals changed the microbial community structure representing dominant but also minor populations [25]. Based on the number and type of OTU obtained, the researchers found that the soil bacteria community can adapt to long-term heavy metal contamination through the change in microbial community composition and structure, rather than the change in their species diversity and evenness [42]. The metal-resistant bacteria include the genus *Thiobacillus*, which showed a significant positive correlation with cadmium, zinc, arsenic, and lead indicating that the genus was tolerant to heavy metal [42]. The study conducted on the paddy soils along a nonferrous smelter in South Korea showed, that the phylum *Proteobacteria* was found to predominate in all samples, regardless of the heavy metal concentration. Used the 16S rRNA gene pyrosequencing authors found, that only in the case of the

phylum *Chlorobi*, a strong negative impact of the soil cadmium concentration was revealed [71]. Researchers concluded that the diversity in the bacterial community structure at the phylum level was mostly related to the general soil properties, while at the finer taxonomic levels, the concentrations of arsenic and lead were the significant factors affecting the community structure [71]. Analyses of the bacterial community response to arsenic and chromium contamination revealed by pyrosequencing researchers showed that in non-contaminated soils the dominant phylum was *Actinobacteria*, whereas in contaminated soils it was *Proteobacteria*. In addition, in contaminated soils a decrease in OTUs number of 14–38% was observed in comparison to control soils. The decrease in bacterial diversity within the contaminated soils was confirmed by species richness (Chao, ACE, Shannon) based on pyrosequencing data [67]. The qPCR and PCR-DGGE analysis on samples from agricultural soils near manufacturing district suggests that heavy metal pollution has significantly decreased abundance of bacteria and fungi and also changed their community structure [10]. Researchers analysed the contaminated landfill soils of Peninsular Malaysia showed, that *P. mendocina* has the highest resistance to metal exposure. When *B. pumilus* was absolutely resistant to the heavy metals used in the study, except nickel [32]. Examination of lead-contaminated soils by high throughput amplicon sequencing showed that *Verrucomicrobia* were less abundant at high contamination level whereas *Chlamydiae* and γ -*Proteobacteria* were more abundant [64].

Unlike bacteria, in the research provided by Li *et al.* [42] the members of the archaeal domain, *i.e.* phyla *Crenarchaeota* and *Euryarchaeota*, class *Thermoprotei* and order *Thermoplasmatales* showed an only positive correlation with Cd. The researchers stated that archaea were resistant to heavy metal contamination and can contribute to its adaptation to heavy metal. Also in other environment contaminated with heavy metals (anoxic freshwater lake sediments) was found that *Crenarchaeota* was associated with metal contamination [24].

The presented researches indicate that the heavy metal content affects the distribution of microbial population in the soil. Some types are resistant or even prefer environments with high metal content, but most data indicate a decrease in the number and variety of microorganisms, especially bacteria, in soil with increased contamination.

8. Conclusion

The most important abiotic factors influencing soil microorganisms are described in this review. Apart from the edaphic factors described above, the soil nutri-

ent content in available forms, toxic compounds, light and oxygenation can be distinguished. There are complex relationships between these factors since salinity affects the pH of the environment, temperature affects the water content of the soil, and both the presence of salt and humidity depending on the type of structure of the soil. The different taxonomic units of microorganisms are characterized by different ecological optimum. This is important from the point of view of agriculture, because human intervention in the soil environment may cause changes which will have a negative or positive impact on microorganisms. Microorganisms are known for their many adaptation mechanisms, but they still have environmental tolerance limits, beyond which they lose their viability or die. Maintaining constant conditions optimal for a given soil environment provides for the development and activity of the microbial community.

The use of new research methods in environmental microbiology allows for a more detailed examination of soil microbial contamination, but the vastness of the links between the various components of the soil environment is so great that much remains unknown.

References

1. Alloway B.: Heavy Metals in Soils. Vol. 22, Springer, Dordrecht, 2013
2. Andronov E.E., Petrova S.N., Pinaev A.G., Pershina E.V., Rakhimgaliev S.Zh., Akhmedenov K.M., Gorobets A.V., Sergaliev N.Kh.: Analysis of the structure of the microbial community in soils with different degrees of salinization using T-RFLP and real-time PCR techniques. *Euras. Soil Sci.* **45**, 147–156 (2012)
3. Bednarek R., Dziadowiec H., Pokojaska U., Prusinkiewicz Z.: *Badania ekologiczno-gleboznawcze*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2005
4. Bonneau M., Souchier B.: *Pedology: Constituents and soil properties*. Masson Publisher, Paris, 1994
5. Borowik A., Wyszowska J.: Impact of temperature on the biological properties of soil. *Int. Agrophys.* **30**, 1–8 (2016)
6. Cho S.J., Kim M.H., Lee Y.O.: Effect of pH on soil bacterial diversity. *J. Ecol. Environ.* **40**, 10 (2016)
7. Ciaranek D.: Influence of weather conditions on the variation of soil temperature in the Botanical Garden of Jagiellonian University in Kraków. *Prace Geograficzne*, **133**, 77–99 (2013)
8. Das S., Bhattacharyya P., Adhya T.K.: Impact of elevated CO₂, flooding, and temperature interaction on heterotrophic nitrogen fixation in tropical rice soils. *Biol. Fert. Soils*, **47**, 25–30 (2011)
9. de Gannes V., Eudoxie G., Bekele I., Hickey W.J.: Relations of microbiome characteristics to edaphic properties of tropical soils from Trinidad. *Front. Microbiol.* **6**, 1045 (2015)
10. Deng L., Zeng G., Fan C., Lu L., Chen X., Chen M., Wu H., He X., He Y.: Response of rhizosphere microbial community structure and diversity to heavy metal co-pollution in arable soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 8259–8269 (2015)
11. Dunivin T.K., Shade A.: Community structure explains antibiotic resistance gene dynamics over a temperature gradient in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **94**, fiy016 (2018)

12. Fierer N, Schimel J.P.: A proposed mechanism for the pulse in carbon dioxide production commonly observed following the rapid rewetting of a dry soil. *Soil Sci. Soc. Amer.* **67**, 798–805 (2003)
13. Fierer N, Schimel J.P.: Effects of drying–rewetting frequency on soil carbon and nitrogen transformations. *Soil Biol. Biochem.* **34**, 777–787 (2002)
14. Fierer N., Jackson R.B.: The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *PNAS*, **103**, 3, 626–631 (2006)
15. Frąc M., Jezierska-Tys S.: Microbial diversity of soil environment. *Post. Mikrobiol.* **20**, 47–58 (2010)
16. Fu G., Shen Z.X., Zhang X.X., Zhou Y.T.: Response of soil microbial biomass to short-term experimental warming in alpine meadow on the Tibetan Plateau. *Appl. Soil Ecol.* **61**, 158–160 (2012)
17. Gagaldze N.A., Amiranashvili L.L., Sadunishvili T.A., Kvesitadze G.I., Urushadze T.F., Kvrivishvili T.O.: Bacterial composition of different types of soils of Georgia. *Ann. Agrar. Sci.* **16**, 1, 17–27 (2018)
18. Gałązka A., Lyszczyk M., Abramczyk B., Furtak K., Grządziel J., Czaban J., Pikulicka A.: Biodiversity of soil environment – overview of parameters and methods in soil biodiversity analyses. Monografie i rozprawy naukowe IUNG-PIB, Puławy, 2016
19. Gleeson D.B., Herrmann A.M., Livesley S.J., Murphy D.V.: Influence of water potential on nitrification and structure of nitrifying bacterial communities in semiarid soils. *Appl. Soil Ecol.* **40**, 189–194 (2008)
20. Gliński J., Stepińska Z., Kasiak A.: Changes of an enzymatic activity in soils with respect to their water content and oxygen status. *Roczniki Gleboznawcze*, **34**, (1–2), 53–59 (1983)
21. Gliński J.: Odczyn gleb (in) *Gleboznawstwo*, Ed. S. Zawadzki, Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa, 1999, p. 220–227
22. Gołębiowski M., Deja-Sikora E., Cichosz M., Tretyn A., Wróbel B.: 16S rDNA Pyrosequencing analysis of bacterial community in heavy metals polluted soils. *Microb. Ecol.* **67**, 3, 635–647 (2014)
23. Gonet S., Smal H.D., Chojnicki J.: Właściwości chemiczne gleb (in) *Gleboznawstwo*, Ed. A. Mocek, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2015, p. 201–205
24. Gough H.L., Stahl D.A.: Microbial community structures in anoxic freshwater lake sediment along a metal contamination gradient. *ISME J.* **5** (3), 543–558 (2011)
25. Gremion F., Chatzinotas A., Kaufmann K., von Sigler W., Harms H.: Impacts of heavy metal contamination and phytoremediation on a microbial community during a twelve-month microcosm experiment. *FEMS Microbiol. Ecol.* **48**, 2, 273–283 (2004)
26. Grządziel J., Gałązka A.: Microplot long-term experiment reveals strong soil type influence on bacteria composition and its functional diversity. *Appl. Soil Ecol.* **124**, 117–123 (2018)
27. Hallin S., Jones C.M., Schlöter M., Philippot L.: Relationship between N-cycling communities and ecosystem functioning in a 50-year-old fertilization experiment. *ISME J.* **3**, 597–605 (2009)
28. Hansel C.M., Fendorf S., Jardine P.M., Francis C.A.: Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 1620–1633 (2008)
29. Henry S., Texier S., Hallet S., Bru D., Dambreville C., Cheneby D., Bizouard F., Germon J.C., Philippot L.: Disentangling the rhizosphere effect on nitrate reducers and denitrifiers: insight into the role of root exudates. *Environ. Microbiol.* **10**, 3082–3092 (2008)
30. Hozzein W.N., Li W.J., Ali M.I.A., Hammouda O., Mousa A.S., Xu L.H., Jiang C.L.: *Nocardiosis alkaliphila* sp. nov., a novel alkaliphilic actinomycete isolated from desert soil in Egypt. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 247–252 (2004)
31. Hus K., Bocian A.: The mechanisms of adaptation allowing bacteria to survive in high temperatures. *Kosmos*, **66**, 2, 175–184 (2017)
32. Jayanthi B., Emenike C.U., Agamuthu P., Khanom Simarani, Sharifah Mohamad, Fauziah S.H.: Selected microbial diversity of contaminated landfill soil of Peninsular Malaysia and the behavior towards heavy metal exposure, *CATENA*, **147**, 25–31 (2016)
33. Klamkowski K., Treder W., Tryngiel-Gač A., Wójcik K.: Impact of quantity and intensity of precipitation on changes in soil water content in an apple orchard. *Infrastructure and Ecology of Rural Areas*, **5**, 115–126 (2011)
34. Kołwzan B., Adamiak W., Grabas K., Pawełczyk A.: Podstawy mikrobiologii w ochronie środowiska. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2006
35. Krebs C.J.: Ecology. The experimental analysis of distribution and abundance. Benjamin Cummings, San Francisco, London, 2001
36. Krebs C.J.: The Ecological World View. University of California Press, Oakland, 2008, p. 36–38
37. Kunicki-Goldfinger W.J.H.: Życie bakterii. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2008
38. Kuramae E.E., Yergeau E., Wong L.C., Pijl A.S., van Veen J.A., Kowalchuk G.A.: Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. *FEMS Microbiol. Ecol.* **79**, 12–24 (2012)
39. Ladd J.N., Foster R.C., Nannipieri P., Oades J.: Soil structure and biological activity (in) *Soil biochemistry*, Ed. G. Stotzky, J.M. Bollag, Vol. 9, Marcel Dekker, New York, 1996, p. 23–78
40. Lee S.H., Sorensen J.W., Grady K.L., Tobin T.C., Shade A.: Divergent extremes but convergent recovery of bacterial and archaeal soil communities to an ongoing subterranean coal mine fire. *ISME J.* **11** (6), 1447–1459 (2017)
41. Li G., Kim S., Park M., Son Y.: Short-term effects of experimental warming and precipitation manipulation on soil microbial biomass C and N, community substrate utilization patterns and community composition. *Pedosphere*, **27**, 714–724 (2017)
42. Li X., Meng D., Li J., Yin H., Liu H., Liu X., Cheng C., Xiao Y., Liu Z., Yan M.: Response of soil microbial communities and microbial interactions to long-term heavy metal contamination. *Environ. Pollut.* **231**, 908–917 (2017)
43. Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z.: Mikrobiologia techniczna. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2007
44. Lozupone C.A., Knight R.: Global patterns in bacterial diversity. *PNAS*, **104**, 11436–11440 (2007)
45. Lynch M., Gabriel W.: Environmental Tolerance. *Am. Nat.* **129**, 2, 283–303 (1987)
46. Maranguit D., Guillaume T., Kuzyakov Y.: Effects of flooding on phosphorus and iron mobilization in highly weathered soils under different land-use types: Short-term effects and mechanisms. *CATENA*, **158**, 161–170 (2017)
47. Marschner P., Yang C.H., Lieberei R., Crowley D.: Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* **33**, 1437–1445 (2001)
48. Marshall P.F.: Induced plant defenses against pathogens and herbivores: biochemistry, ecology, and agriculture. APS Press, St. Paul, 1997
49. Mazur Z., Mazur T.: Organic carbon content and its fractions in soils of multi-year fertilization experiments. *Pol. J. Environ. Stud.* **24**, 4, 1697–1703 (2015)
50. Meliani A., Bensoltane A., Mederbel K.: Microbial diversity and abundance in soil: related to plant and soil type. *Am. J. Plant Nutr. Fert. Techno.* **2**, 10–18 (2012)
51. Mhuantong W., Champreda V. et al.: Survey of Microbial Diversity in Flood Areas during Thailand 2011 Flood Crisis Using

- High-Throughput Tagged Amplicon Pyrosequencing. *Plos One*, **10**, e0128043 (2015)
52. Mohammed U.A., Zigau Z.A.: Influence of soil pH and temperature on soil microflora. *Gashua J. Sci. Hum.* **2**, 39–47 (2016)
 53. Nannipieri P., Ascher J., Ceccherini M.T., Landi L., Pietramellara G., Renella G.: Microbial diversity and soil functions. *Eur. J. Soil Sci.* **54**, 655–670 (2003)
 54. Niemczyk H., Kowalska B., Majewski G.: The formation of actual soil moisture depending on the amount of precipitation and air temperature. *Przegląd Naukowy Inżynieria i Kształtowanie Środowiska*, **2** (36), 11–19 (2007)
 55. Pariona-Llanos R., Ibañez de Santi Ferrara F., Soto-Gonzales H.H., Barbosa H.R.: Influence of organic fertilization on the number of culturable diazotrophic endophytic bacteria isolated from sugarcane. *Eur. J. Soil Biol.* **46**, 387–393 (2010)
 56. Pascual I., Antolin M.C., Garcia C., Polo A., Sanchez-Diaz M.: Effect of water deficit on microbial characteristics in soil amended with sewage sludge or inorganic fertilizer under laboratory conditions. *Biores. Technol.* **98**, 29–37 (2007)
 57. Qi D., Wieneke X., Tao J., Zhou X., Desilva U.: Soil pH is the primary factor correlating with soil microbiome in karst rocky desertification regions in the Wushan County, Chongqing, China. *Front. Microbiol.* **9**, 1027 (2018)
 58. Ramirez K.S., Lauber C.L., Knight R., Bradford M.A., Fierer N.: Consistent effects of nitrogen fertilization on soil bacterial communities in contrasting systems. *Ecology*, **91**, 3463–3470 (2010)
 59. Rampelotto P.H.: Resistance of microorganisms to extreme environmental conditions and its contribution to astrobiology. *Sustainability*, **2**, 1602–1623 (2010)
 60. Rietz D.N., Haynes R.J.: Effects of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity. *Soil Biol. Biochem.* **35**, 845–854 (2003)
 61. Rojek E., Usowicz B.: Spatial variability of soil temperature in Poland. *Acta Agroph.* **25**, 289–305 (2018)
 62. Rousk J., Brookes P.C., Bååth E.: Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. *Appl. Environ. Microb.* **75**, 1589–1596 (2009)
 63. Rousseau S., Doneche B.: Effects of water activity (a_w) on the growth of some epiphytic microorganisms isolated from grape berry. *Vitis*. **40**, 75–78 (2001)
 64. Schneider A.R., Marin B. *et al.*: Response of bacterial communities to Pb smelter pollution in contrasting soils. *Sci. Total Environ.* **605–606**, 436–444 (2017)
 65. Schreiter S., Ding G.C., Heuer H., Neumann G., Sandmann M., Grosch R., Kropf S., Smalla K.: Effect of the soil type on the microbiome in the rhizosphere of field-grown lettuce. *Front. Microbiol.* **5**, 144 (2014)
 66. Sessitsch A., Weilharter A., Gerzabek M.H., Kirchmann H., Kandeler E.: Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Appl. Environ. Microb.* **67**, 4215–24 (2001)
 67. Sheik C.S., Mitchell T.W., Rizvi F.Z., Rehman Y., Faisal M., Hasnain S., McInerney M.J., Krumholz L.R.: Exposure of soil microbial communities to chromium and arsenic alters their diversity and structure. *Plos ONE*, **7**, e40059 (2012)
 68. Shukla L., Suman A., Yadav A.N., Verma P., Saxena A.K.: Symbiotic microbial system for ex-situ degradation of paddy straw at low temperature under controlled and natural environment. *J. Appl. Biol. Biotechnol.* **4** (2), 30–37 (2016)
 69. Sochocka M., Boratyński J.: Osmoregulation – an important parameter of bacterial growth. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, **65**, 714–724 (2011)
 70. Staszewski Z.: Nitrogen in soil and its impact upon environment. *Zeszyty Naukowe. Inżynieria Lądowa i Wodna w Kształtowaniu Środowiska*, **4**, 50–58 (2011)
 71. Tipayno S., Truu J., Samaddar S., Truu M., Preem J., Oopkaup K., Espenberg M., Chattarjee P., Kang Y., Kim K., Sa T.: The bacterial community structure and functional profile in the heavy metal contaminated paddy soils, surrounding a nonferrous smelter in South Korea. *Ecol. Evol.* **8**, 12, 6157–6168 (2018)
 72. Unger I.M., Kennedy A.C., Muzika R.M., 2009. Flooding effects on soil microbial communities. *Appl. Soil Ecol.* **42** (1): 1–8.
 73. Wagner D., Eisenhauer N., Cesarz S.: Plant species richness does not attenuate responses of soil microbial and nematode communities to a flood event. *Soil Biol. Biochem.* **89**, 135–149 (2015)
 74. Wichern J., Wichern F., Joergensen R.G.: Impact of salinity on soil microbial communities and the decomposition of maize in acidic soils. *Geoderma*, **137**, 100–108 (2006)
 75. Wolińska A.: Dehydrogenases activity of soil microorganisms and oxygen availability during reoxidation process of selected mineral soils from Poland. *Acta Agrophys. Rozprawy i monografie*. **180** (3), 5–87 (2010)
 76. Wolińska A.: Metagenomic achievements in microbial diversity determination in croplands: a review (in) *Microbial Diversity in Genomic Era*, Ed. S. Das, H.R. Dash, Academic Press Elsevier, The Netherlands, Amsterdam, 2019, p. 15–35
 77. Yadav A.N., Verma P., Sachan S.G., Kaushik R., Saxena A.K.: Psychrotrophic microbiomes: molecular diversity and beneficial role in plant growth promotion and soil health (in) *Microorganisms for green revolution: microbes for sustainable agro-ecosystem*, Ed. D.G. Panpatte, Y.K. Jhala, H.N. Shelat, R.V. Vyas, Vol. 2, Springer, Singapore, 2018, p. 197–240
 78. Yan N., Marschner P., Cao W., Zuo C., Qin W.: Influence of salinity and water content on soil microorganisms. *International Soil and Water Conservation Research*, **3**, 316–323 (2015)
 79. Young I.M., Ritz K.: Tillage, habitat space and function of soil microbes. *Soil Till. Res.* **53**, 201–213 (2000)
 80. Zhang W., Parker K.M., Luo Y., Wan S., Wallace L.L., Hu S.: Soil microbial responses to experimental warming and clipping in a tallgrass prairie. *Glob. Change Biol.* **11**, 266–277 (2005)
 81. Zhang Y., Shen H., He X., Thomas B.W., Lupywayi N.Z., Hao X., Thomas M.C., Shi X.: Fertilization shapes bacterial community structure by alteration of soil pH. *Front. Microbiol.* **8**, 1325 (2017)
 82. Zhou J., Xia B., Treves D.S., Wu L.Y., Marsh T.L., O'Neill R.V., Palumbo A.V., Tiedje J.M.: Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 326–334 (2002)

POSTĘPY W OPRACOWANIU SZCZEPIONKI ANTY-CAMPYLOBACTER PRZEZNACZONEJ DLA DROBIU

Agnieszka Wyszyńska*, Patrycja Kobierecka, Katarzyna Elżbieta Jagusztyn-Krynicka

Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Wpłynęło w lipcu, zaakceptowano w październiku 2019 r.

Streszczenie: Zakażenie bakteriami *Campylobacter jejuni/coli* jest wiodącą bakteryjną przyczyną biegunki u ludzi zarówno w krajach rozwijających się, jak i rozwiniętych. Badania epidemiologiczne wykazują, że większość przypadków kampylobakteriozy jest wynikiem konsumpcji zanieczyszczonego tymi pałeczkami niedogotowanego mięsa drobiowego. Śmiertelność związana z zakażeniem *Campylobacter* jest niska a większość pacjentów nie wymaga specjalnej terapii. Antybiotyki stosowane są jedynie w ciężkich, ogólnoustrojowych zakażeniach lub u pacjentów z upośledzoną odpornością. Dane epidemiologiczne odnotowują jednak coraz więcej przypadków poważnych autoimmunologicznych i neurologicznych powikłań rozwijających się w następstwie infekcji pałeczkami z rodzaju *Campylobacter*. Obecne działania krajów UE zmierzające w kierunku poprawy higieny i bezpieczeństwa biologicznego nie są wystarczające, aby kontrolować lub wyeliminować *Campylobacter* z łańcucha pokarmowego drobiu. Szacuje się, że zmniejszenie poziomu liczby *Campylobacter* w jelitach kurcząt powinno, w sposób znaczący, doprowadzić do ograniczenia częstości występowania kampylobakteriozy u ludzi. Publikacja przedstawia aktualny stan wiedzy na temat immunoprofilaktyki anty-*Campylobacter* u drobiu.

1. Kampylobakterioza – dane epidemiologiczne, objawy chorobowe. 2. Kampylobakterioza – źródło zakażenia. 3. Kampylobakterioza – profilaktyka. 4. Immunizacja kurcząt. 4.1. Bierna immunizacja. 4.2. Szczepionki całokomórkowe. 4.3. Szczepionki podjednostkowe. 5. Strategie opracowania nowoczesnych szczepionek podjednostkowych. 5.1 Poszukiwanie antygeny. 5.2. Wybór nośnika. 6. Modulacja odpowiedzi immunologicznej. 7. Droga podania antygeny. 8. Podsumowanie

ADVANCEMENTS IN DEVELOPING ANTI-CAMPYLOBACTER VACCINE FOR POULTRY

Abstract: *Campylobacter jejuni/coli* is the leading bacterial cause of diarrhoea in humans in both developing and developed countries. Epidemiological studies show that most cases of campylobacteriosis are the result of the consumption of undercooked, contaminated poultry meat. Although campylobacteriosis is largely a self-limiting disease with low mortality, a specific treatment is required for patients infected with strains resistant to clinically important antibiotics and for patients who develop neurological symptoms or bacteremia in course of infection. Despite intensive efforts to improve an on-farm biosecurity practice over the past decade, about 70% of EU broiler chicken flocks remain *Campylobacter*-positive at slaughter. Control of spreading the *Campylobacter* infection in flocks of chickens by biosecurity actions turned out rather ineffective. The most efficient strategy to decrease the number of human *Campylobacter* infections may be to implement an immunoprophylactic method, namely, the protective vaccination of chickens. The publication presents the current state of knowledge on anti-*Campylobacter* immunoprophylaxis in poultry.

1. Campylobacteriosis – epidemiological data, disease symptoms. 2. Campylobacteriosis – source of infection. 3. Campylobacteriosis – prophylaxis. 4. Immunization of chicken. 4.1. Passive immunization. 4.2. *Campylobacter* Whole-cell Vaccines. 4.3. Subunit vaccines. 5. Strategies for developing modern subunit vaccines. 5.1 Searching for antigen. 5.2. The choice of a carrier. 6. Modulation of immune response. 7. The route of antigen administration. 8. Summary

Słowa kluczowe: antygeny, *Campylobacter*, immunoprofilaktyka, szczepionki

Key words: antigens, *Campylobacter*, immunoprophylaxis, vaccine

1. Kampylobakterioza – dane epidemiologiczne, objawy chorobowe

Bakterie rodzaju *Campylobacter* spp. to Gram-ujemne, mikroaerofilne, ruchliwe, spiralnie skręcone pałeczki należące do klasy *Epsilonproteobacteria*. Rodzaj ten tworzy 39 gatunków i 16 podgatunków [56]. Od 2005 roku kampylobakterioza jest najczęściej diagnozowaną zoonozą u mieszkańców państw członkowskich Unii Europejskiej. Według danych Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA, European

Food Safety Authority) w 2017 roku potwierdzono 246 158 przypadków infekcji pałeczkami *Campylobacter*, przy wskaźniku zachorowalności 64,8 na 100 000 osób [22]. W Stanach Zjednoczonych w 2017 r. patogen ten był najczęstszą przyczyną chorób przenoszonych przez żywność [58]. W ciągu ostatnich 10 lat częstość występowania i rozpowszechnienie kampylobakteriozy wzrosły również w krajach rozwijających się. Dane z części Afryki, Azji i Bliskiego Wschodu wskazują na endemiczny charakter kampylobakteriozy na tych obszarach, szczególnie u dzieci. Wskaźnik DALY

* Autor korespondencyjny: Agnieszka Wyszyńska, Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel. 22 554-13-41; e-mail: agawysz@biol.uw.edu.pl

(disability adjusted life-years – lata życia skorygowane niesprawnościami) dla zakażeń *Campylobacter* na całym świecie wynosi 7,5 mln, i wśród czynników etiologicznych biegunek ustępuje tylko wskaźnikowi DALY oznaczonemu dla rotawirusów [64].

Ze względu na łagodny, zwykle, przebieg zakażenia szacuje się, że zgłaszany jest tylko jeden na 47 przypadków kampylobakteriozy, co oznacza, że liczba infekcji *Campylobacter* jest wielokrotnie zaniżona [32]. W Polsce przyczyną małej liczby odnotowanych przypadków jest najprawdopodobniej nieskuteczny system monitorowania zakażeń tymi pałeczkami. W 2014 roku zapadalność w Polsce wynosiła 1,69 na 100 000 osób i należała do jednej z najniższych w Europie [80]. W krajach rozwijających się, podobnie jak w Polsce, dane epidemiologiczne zakażeń pałeczkami *Campylobacter* są fragmentaryczne, co wynika z niesprawnego programu nadzorowania przypadków kampylobakteriozy, bądź z jego braku. Jednocześnie, w przeciwieństwie do krajów rozwiniętych, przebieg infekcji *Campylobacter* u dorosłych jest w większości asymptomatyczny a manifestacja objawów zakażenia obserwowana jest głównie u dzieci poniżej piątego roku życia [73]. Sugeruje to, że kontakt z tym enteropatogenem we wczesnym dzieciństwie prowadzi do rozwoju odporności ochronnej [6, 45].

Kampanylobakteriozę u ludzi wywołuje najczęściej infekcja jednym z dwóch gatunków: *C. jejuni* lub *C. coli*. W krajach rozwijających się są one przyczyną odpowiednio 89–96% i 4–11% infekcji [76]. Odnotowywane są także nieliczne przypadki zakażeń wywołane przez inne gatunki, tj. *C. lari* lub *C. fetus* [44]. Zakażenie *Campylobacter* może przebiegać bezobjawowo, zwykle jednak wiąże się z występowaniem ostrych stanów zapalnych jelit, którym towarzyszy długotrwała, śluzowata biegunka. Objawy ustępują zazwyczaj samoistnie po około 7 dniach. Niekiedy infekcje pałeczkami *Campylobacter* prowadzą do rozwoju chorób autoimmunologicznych i neurologicznych, których przykładem jest neuropatia obwodowego układu nerwowego tj. zespół Guillaina-Barré (GBS, Guillain-Barré Syndrome) [19, 29]. Ryzyko jego wystąpienia, zwykle niewielkie (trzy przypadki na 10 000 zdiagnozowanych przypadków kampanylobakteriozy), wzrasta po infekcji określonymi serotypami (m. in. HS19, HS41) [87]. U podstaw rozwoju GBS leży zjawisko mimikry molekularnej. Powstające podczas infekcji *Campylobacter* przeciwciała rozpoznające bakteryjny lipooligosacharyd (LOS) wiążą się z gangliozydami występującymi na powierzchni komórek Schwanna i neuronu (GM1 i GD1a), co aktywuje układ dopełniacza, prowadzi do powstania kompleksu atakującego błonę (MAC, Membrane Attack Complex) i w konsekwencji, do uszkodzenia komórek nerwowych. Przyłączenie się przeciwciał w okolicy węzła Ranviera jest natomiast przyczyną zablokowania

kanałów sodowych, a tym samym zaburzeń polaryzacji komórki, czego efektem jest spowolnienie przewodnictwa nerwowego. Ponadto spowodowana infekcją aktywacja limfocytów T może wywołać migrację makrofagów w kierunku zajętego nerwu, a towarzyszące jej uwolnienie mediatorów stanu zapalnego prowadzić do uszkodzenia mieliny [19]. Aktualne badania wskazują również na związek pomiędzy zakażeniem *Campylobacter* a występowaniem reaktywnego zapalenia stawów [1, 88], zespołu nadwrażliwości jelita (IBS, Irritable Bowel Syndrome) oraz nowotworów jelita grubego [44].

W przebiegu infekcji znaczenie ma zarówno patogenność zakażającego szczepu, jak i funkcjonowanie układu odpornościowego gospodarza [44]. U ludzi z niesprawnie działającym układem odpornościowym (ludzie starsi, ludzie po przebytych chorobach nowotworowych czy zainfekowani wirusem HIV) *Campylobacter* jest często przyczyną infekcji uogólnionych oraz posocznicy [44, 76].

2. Kampanylobakterioza – źródło zakażenia

Do transmisji infekcji *Campylobacter* między ludźmi dochodzi bardzo rzadko. Źródłem zakażenia może być spożycie zanieczyszczonej komórkami patogena wody, niepasteryzowanego mleka czy też mięsa wołowego. Badania epidemiologiczne wykazują jednak, że większość przypadków kampanylobakteriozy wywoływanych jest spożyciem zainfekowanego pałeczkami niedogotowanego mięsa drobiowego, co jest zgodne z obserwacją, że głównym rezerwuarem pałeczek *Campylobacter* jest drób hodowlany oraz dzikie ptactwo [19, 85]. W 2016 r., według raportu EFSA, 36,7% przebadanych tuszek brojlerów dostępnych na rynku europejskim było zanieczyszczonych *Campylobacter* w liczbie przekraczającej 4 log₁₀ jtk/g mięsa. Niska dawka infekcyjna dla ludzi sprawia, że do zakażeń na tle *Campylobacter* dochodzi łatwo i często. W ostatnich latach odsetek ten pozostaje na względnie stałym poziomie, choć w roku 2015 dla EU wynosił 47%. Występują też znaczne różnice między poszczególnymi państwami członkowskimi Unii Europejskiej, co jest m.in. wynikiem stosowania różnych strategii pobierania próbek i metod testowania [21, 23]. Na polskim rynku bakteriami rodzaju *Campylobacter* zanieczyszczonych jest ponad 50% tusz drobiowych [49].

Poziom kolonizacji jelita ptaków przez *Campylobacter* spp. osiąga nawet 10⁹ jtk/gram zawartości jelita. Większość przeprowadzonych dotychczas badań wskazuje, że wysoki poziom kolonizacji jelit kurcząt nie powoduje objawów chorobowych u ptaków, co uniemożliwia odizolowanie zainfekowanych osobników od stada [54, 93]. Hermans i wsp. sugerowali, że stan taki jest wynikiem nieskuteczności układu odpornościowego

kurcząt połączonej z mechanizmami, które przekierowują odpowiedź zwierząt na tolerowanie patogena [35]. Doniesienia z ostatnich lat opisują jednak szkodliwe skutki zdrowotne kolonizacji jelit kurcząt przez *Campylobacter* [5, 40, 99]. W 2014 r. zaobserwowano np., że uszkodzenia błony śluzowej jelit brojlerów wywołane przez szczep *C. jejuni* M1, co umożliwiło translokację bakterii, takich jak np. *E. coli*, ze światła jelita do głębiej położonych tkanek. W efekcie u ptaków wystąpił ostry stan zapalny i biegunka [4, 5, 11, 40]. Uzyskane wyniki nakazują zatem zweryfikowanie przekonania, że *Campylobacter* jest wyłącznie komensalem ptaków.

Obecność *Campylobacter* jest wykrywana w przewodzie pokarmowym ptaków hodowlanych dopiero po 2 tygodniu ich życia [17, 67]. Sugeruje to istnienie mechanizmu przeciwdziałającego kolonizacji młodych ptaków przez tego patogena. Spekulowano, że za ten stan odpowiada wysoki poziom swoistych przeciwciał matczynych [12]. Obserwacje, że kurczęta przebywające w stadach razem z dorosłymi są wolne od *Campylobacter* przez pierwsze kilka tygodni po wylęgnięciu, wydają się to potwierdzać [81]. Istnieją również doniesienia sugerujące, że główną przyczyną, zależnego od wieku, zakażenia kurcząt przez *Campylobacter* jest zmiana składu mikrobiomu ptaków [31]. Przeprowadzone przez Ijaz i wsp. kompleksowe, codzienne badania mikrobiomu kurcząt od 3 do 35 dnia życia ptaków wykazały, że *Campylobacter* pojawia się w 16 dniu życia, tuż po zaobserwowaniu najbardziej znaczących zmian w profilach metabolicznych. Nie można wykluczyć, że jest to wynik pojawienia się środowiskowych czynników stymulujących rozwój tych drobnoustrojów [41].

3. Kampylobakterioza – profilaktyka

Duża liczba przypadków kampylobakteriozy, występowanie poinfekcyjnych powikłań, głównie neurologicznych, jak również rosnąca liczba szczepów *Campylobacter* opornych na antybiotyki stosowane w terapii (makrolidy i fluorochinolony) powodują, że zakażenia tym enteropatogenem stanowią poważny problem dla służb medycznych. Mikroorganizm ten znalazł się na opublikowanej w 2017 roku, przez Światową Organizację Zdrowia (World Health Organisation), liście gatunków bakterii będących, głównie ze względu na swą antybiotykooporność, największym zagrożeniem dla zdrowia ludzkiego [101]. W związku z tym, w ostatnich latach wysiłki badaczy skupiają się na opracowaniu strategii zapobiegania infekcjom *Campylobacter*. Ponieważ do zanieczyszczenia tusz drobiowych pałeczkami *Campylobacter* dochodzi na etapie produkcji, kontrolowanie zakażeń na tym poziomie (ubój, sprzedaż detaliczna i konsumpcja) powinno zmniejszyć liczbę przypadków kampylobakteriozy u ludzi. Strategie sto-

sowane w ramach holenderskiego programu CARMA (*Campylobacter* Risk Management and Assessment) nie przyniosły jednak spodziewanych rezultatów [33]. Szacuje się, że ograniczenie poziomu kolonizacji przewodu pokarmowego kurcząt przez patogenne szczepy *Campylobacter* spp. doprowadziłoby do znacznego obniżenia poziomu zachorowań wśród ludzi, a co za tym idzie, znacznej redukcji kosztów opieki zdrowotnej. Spadek liczby komórek *Campylobacter* w jelitach kurcząt zaledwie o 2 log powinien przełożyć się na około trzydziestokrotne obniżenie częstości występowania ludzkich infekcji [79]. Z początkiem 2018 roku weszło w życie Rozporządzenie Komisji UE (nr 2017/1495) wprowadzające kryterium higieny dotyczące bakterii *Campylobacter* w tuszach brojlerów, co umożliwi kontrolę zanieczyszczenia tusz podczas procesu uboju ptaków. Ustalono, że dopuszczalna liczba jtk/gram mięsa drobiowego nie może przekraczać 1000. W związku z powyższym analizowane są metody profilaktyki anty-*Campylobacter* na etapie hodowli drobiu, takie jak: podniesienie higieny na fermach, stosowanie dodatków do pasz lub wody pitnej np. kwasów organicznych i kwasów tłuszczowych, produktów pochodzenia roślinnego, bakteriocyn, bakteriofagów [61]. Wyniki uzyskane przez różne grupy badawcze nie pozwalają na jednoznaczne wnioski. W zależności od użytej metody obserwowano zarówno zmniejszenie poziomu kolonizacji jelit drobiu, jak również brak ochrony przed zasiedleniem jelita [13, 24, 61].

Interesujące badania przeprowadzili w 2015 roku Johnson i wsp. Podczas poszukiwania inhibitorów ekspresji czynnika kolonizacji *Campylobacter* – flagelliny, zidentyfikowali związki, które silnie hamowały wzrost patogena *in vitro* [43]. Aktywność anty-*Campylobacter* w modelu kurzym wykazywała jedynie Campynek-syna A. U połowy kurcząt, które otrzymały ten związek, kolonizacja jelit ślepych przez tego patogena była poniżej poziomu wykrywalności. Jednocześnie u 4 na 9 przebadanych kurcząt w ogóle nie zaobserwowano efektu ochronnego. Rok później Kumar i wsp. [50] zidentyfikowali 12 cząsteczek o właściwościach anty-*Campylobacter* należących do jednej z pięciu klas chemicznych: aryloamin, piperazyn, pirydazynon, sulfonamidów lub piperidyn. Dziesięć z nich wykazywało aktywność wobec patogena zlokalizowanego w komórkach Caco-2. Zaletą tych cząsteczek jest niska cytotoksyczność w stosunku do komórek Caco-2 i brak aktywności hemolitycznej wobec owczych czerwonych krwinek [50].

Duże zainteresowanie zyskało także stosowanie probiotyków jako środka zapobiegania lub zmniejszenia częstości występowania infekcji *Campylobacter* u drobiu [82]. Obiecujące wyniki otrzymały zespoły Konkel i Jagusztyn-Krynockiej [47, 65]. Zaobserwowali oni, że podanie kurczętom szczepów z rodzaju *Lactobacillus*, tj. *L. crispatus*, *L. salivarius*, *L. helveticus*

i *L. gallinarum* prowadzi do obniżenia poziomu kolonizacji jelit ślepych ptaków przez *Campylobacter* [47, 65]. Pałeczki kwasu mlekowego mogą zmniejszać poziom kolonizacji patogenów poprzez stymulację odporności adaptacyjnej, konkurowanie o niszę ekologiczną, koagregację oraz wytwarzanie hamujących metabolitów, takich jak kwasy organiczne czy bakteriocyny [47, 65]. Właściwości anty-*Campylobacter* wykazuje również *Saccharomyces cerevisiae*, który po podaniu broilerom *per os*, znacząco obniżał liczbę komórek patogena w jelicie ślepym, kale i na skórze. *S. cerevisiae* promował wzrost bakterii z rodzaju *Lactobacillus* oraz rywalizował z *Campylobacter* o substancje odżywcze i receptory umożliwiające adhezję do nabłonka jelit [26]. Przyczyną tak odmiennych wyników może być użycie linii kurzych o różnej wrażliwości na *Campylobacter* i probiotyki. Nie bez znaczenia jest również to, jaki szczep *Campylobacter* i jakiej wielkości inokulum zastosowano w eksperymencie kolonizacyjnym.

4. Immunizacja kurcząt

Chów drobiu przeznaczonego na mięso trwa około 42 dni. Z tego powodu kurczęta powinny być zaszczepione krótko po wykluciu, przed ich zetknięciem się z *Campylobacter*. Szczepionka powinna wywoływać odporność krzyżową przeciw *C. jejuni* i *C. coli*, być łatwa w podaniu (*per os* lub *in ovo*), tania w produkcji oraz bezpieczna dla zwierząt i ludzi. Znacznym utrudnieniem w osiągnięciu tego celu jest fragmentaryczna wiedza o funkcjonowaniu układu odpornościowego kurcząt oraz o wpływie humoralnej odpowiedzi na skuteczność immunizacji. Wyniki, nielicznych jak dotąd, doświadczeń są kontrowersyjne.

C. jejuni to zewnątrzkomórkowy patogen, choć może przeżyć wewnątrz komórek nabłonka jelitowego, jak również w komórkach układu odpornościowego, takich jak monocyty i makrofagi [37, 98]. Umożliwia to unikanie mechanizmów obronnych układu odpornościowego. Skuteczne przetrwanie wewnątrz komórki wiąże się również z umiejętnością przewyciężenia stresów fizjologicznych, takich jak środowisko oksydacyjne generowane przez ludzkie jelito i przez nabłonek gospodarza lub komórki odpornościowe.

Ponieważ droga infekcji pałeczkami *Campylobacter*, niezależnie od gatunku gospodarza, to droga doustna, uważa się, że główną rolę w procesie ochronnym powinny odgrywać przeciwciała IgA obecne w śluzówce jelit. Ich rolę, jak również znaczenie limfocytów B, w odpowiedzi adaptacyjnej kurcząt przeciwko *Campylobacter* badali w 2017 roku Lacharme-Lora i wsp. [51]. Przeprowadzili oni bursektomię kurcząt (usunięcie torebki Fabrycjusza), w wyniku czego ptaki zostały pozbawione tej klasy limfocytów i, jak

stwierdzono, nie produkowały wydzielniczych przeciwciał sIgA. Naukowcy wykazali, że limfocyty B nie odgrywają istotnej roli w redukcji kolonizacji jelita ślepego przez *Campylobacter* do 7 tygodnia ich życia. Natomiast badanie treści jelitowej ptaków po 9 tygodniach od zakażenia wykazało, że kolonizacja jelita ślepego u ptaków posiadających torebkę Fabrycjusza była mniejsza o ponad 2 log w porównaniu do grupy kurcząt, u których przeprowadzono bursektomię [51]. Wyniki powyższych badań pokazują, że wytwarzanie przeciwciał odgrywa rolę w ograniczaniu infekcji *Campylobacter*, jednak proces ten wymaga dłuższego czasu aniżeli czas życia komercyjnego kurczęcia (7 tygodni).

Jednocześnie badania przeprowadzone przez Humphreya i wsp. [40] wykazały, że znaczący wpływ na wynik zakażenia *C. jejuni* i odpowiedź immunologiczną ma rasa kurcząt. Cztery komercyjne rasy brojlerów wykorzystane w eksperymencie różniły się czasem trwania i rozmiarem reakcji zapalnych, czego efektem była kolonizacja bądź choroba z uszkodzeniem błony śluzowej jelita [40]. Zaobserwowano również, że nie wszystkie kurczęta tej samej rasy są kolonizowane przez pałeczki eneteropatogena na zbliżonym poziomie, a oporność wydaje się być genetycznie zdeterminowana. Connel i wsp. [18] przy wykorzystaniu wysokoprzepustowego sekwencjonowania ptasiego genomu zidentyfikowali 219 genów wykazujących różny poziom ekspresji u kur opornych i u kur podatnych na kolonizację przewodu pokarmowego przez *C. jejuni*. Produkty tych genów biorą udział we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, przekazywaniu sygnałów przez cytokiny, aktywacji limfocytów B i komórek T oraz wytwarzaniu immunoglobulin [18].

Oprócz nikłej wiedzy dotyczącej funkcjonowania układu odpornościowego kurcząt przyczyną dotychczasowych niepowodzeń w opracowaniu szczepionki dla kurcząt jest również wspomniana wcześniej różnorodność genetyczna szczepów *Campylobacter*.

4.1. Bierna immunizacja

Bierna immunizacja polega na podaniu do uodparnianego organizmu surowicy odpornościowej. Hermans i wsp. [36] wykazali, że domięśniowa immunizacja sześciopodstawowych kurcząt przeciwciałami IgY otrzymanymi z żółtek jaj pochodzących od kur szczepionych lizatami *C. jejuni* prowadzi do obniżenia kolonizacji o cztery rzędy wielkości w porównaniu do grupy kontrolnej [36]. Dodatkowo zaobserwowano zmniejszoną transmisję *Campylobacter* do niezarażonych kurcząt. Natomiast w badaniach Paul i wsp. [71] immunizacja dodziobowa ptaków przeciwciałami IgY uzyskanymi z żółtek jaj kur niosek immunizowanych mieszaną 7 antygenów *Campylobacter*, tj. adhezyną Peb1A, lipoproteiną JlpA (Jejuni lipoprotein A), białkiem CadF

wiążącym fibronektynę, podjednostką flageliny FlaA, MOMP (Major Outer Membrane Protein), FlpA oraz składnikiem pompy wielolekowej CmeC nie wykazała efektu ochronnego [71]. Rozbieżne wyniki potwierdzają obserwację, że efekt ochronny zależy od wielu czynników. W przytoczonych wyżej badaniach zastosowano m.in. inny schemat immunizacji oraz model kurzy.

4.2. Szczepionki całokomórkowe

Jak dotąd próby opracowania skutecznej szczepionki powstałej w oparciu o zabite komórki patogena, tzw. CWC, nie powiodły się. Jedną z przyczyn niepowodzenia jest wysoka zmienność genetyczna *Campylobacter*. Dotyczy ona głównie genów kodujących białka biorące udział w syntezie LOS (lipooligosaccharide), CPS (capsular polysaccharide), biogenezie rzęsek czy aparatu ruchu. Występowanie licznych wariantów strukturalnych CPS oraz LOS pozwala na aktywne unikanie działania układu odpornościowego gospodarza [19, 25, 30, 100]. Sekwencjonowanie szczepów *C. jejuni* NCTC11168, 33292 and 81-176 przed i po pasażu przez przewód pokarmowy broilerów wskazuje, że środowisko to sprzyja powstawaniu zmienności genetycznej *C. jejuni*. Takiej prawidłowości nie obserwowano po pasażu przez przewód żołądkowo-jelitowy myszy [100]. Rodzaj *Campylobacter* charakteryzuje „otwarty genom”. Oznacza to, że w każdym nowo zsekwencjonowanym genomie szczepów tego rodzaju identyfikowane są unikatowe geny. Porównanie materiału genetycznego 7 szczepów *C. jejuni* i *C. coli* wykazało, że geny podstawowe, a więc występujące w genomach wszystkich przedstawicieli rodzaju, stanowią jedynie 59% [60]. Konstrukcja szczepionki CWC dla drobiu wydaje się być dużym wyzwaniem również dlatego, że kurczęta w trakcie swojego życia wielokrotnie ulegają kolonizacji przez różne szczepy *Campylobacter* spp. [86].

4.3. Szczepionki podjednostkowe

Inna strategia zakłada wykorzystanie do immunizacji specyficznych oczyszczonych antygenów (z adiuwantem lub bez) lub dostarczanie ich do organizmu immunizowanego za pomocą odpowiednich nośników np. atenuowanego szczepu *Salmonella enterica* (sv. Typhimurium lub sv. Enteritidis), *E. coli*, *Eimeria tenella* lub nanocząstek. Szczepionki podjednostkowe uważane są za najbezpieczniejsze, lecz ich immunogenność w porównaniu do szczepionek zawierających całe komórki patogena, jest dużo niższa. Kluczową rolę w skuteczności szczepionki podjednostkowej odgrywa wybór antygeny. Potencjalny antygen powinien być rozpoznawany przez układ odpornościowy immunizowanego organizmu. Cechą niezbędną jest jego produkcja *in vivo*, gdy patogen oddziałuje z komórkami

gospodarza. Poza tym antygen szczepionkowy powinien być silnie konserwowany w obrębie różnych serotypów/genotypów, co ma szczególnie duże znaczenie w sytuacji, gdy patogenny organizm cechuje wysoki poziom zmienności genetycznej.

Do tej pory do konstrukcji prototypów szczepionek anty-*Campylobacter* użyto m.in. podjednostkę flageliny FlaA (flagellin subunit protein A), główne białko błony zewnętrznej (MOMP), składnik pompy wielolekowej CmeC, lipoproteiny CjaA i CjaC, białko związane z peptydoglikanem CjaD, adhezyną PEB1, żelazowy receptor enterobakteryjny CfrA (*Campylobacter jejuni* ferric-enterobactin receptor), dysmutazę ponadtlenkową SodB (Superoxide dismutase B) oraz białko wiążące DNA Dps (DNA binding protein from starved cells). Zastosowanie niezmodyfikowanego FlaA jako antygeny nie chroniło przed zakażeniem heterologicznymi szczepami. W przypadku FlaA-LTB (heat-labile enterotoxin B subunit), rCmeC, Dps SodB oraz FlaA w fuzji translacyjnej z domeną flageliny *S. enterica* aktywującą TLR5 (Toll-like receptor 5), indukowana odpowiedź immunologiczna (specyficzne wydzielnicze przeciwciała klasy sIgA w śluzie jelitowej oraz IgG w surowicy) zapewniała jedynie ograniczoną ochronę. Natomiast wyniki uzyskane po podaniu białka CjaA były wysoce zmienne, zależne od dawki preparatu, drogi podawania oraz schematu jego aplikacji [10, 16, 53, 92, 103] (Tab. I).

5. Strategie opracowania nowoczesnych szczepionek podjednostkowych

5.1. Poszukiwanie antygeny

Tradycyjne techniki immunologii molekularnej do identyfikacji szczepionek są czasochłonne. Szeroka gama technologii (m.in. STM – Signature-tagged transposon mutagenesis, GSH – Genomic subtractive hybridization, SCOTS – Selective capture of transcribed sequences, sekwencjonowanie całego genomu, badania transkryptomyczne, proteomiczne) w połączeniu z metodami bioinformatycznymi zrewolucjonizowało proces poszukiwania atrakcyjnych kandydatów do konstrukcji szczepionek. Technika IIVIAT (*in vivo*-induced antigen technology) pozwala na przykład na identyfikację genów ulegających ekspresji *in vivo*, a więc podczas oddziaływania między gospodarzem i drobnoustrojem [77]. Kodowane przez nie białka mogą odgrywać ważną rolę w patogenezie w określonym układzie gospodarz-patogen, a ich potencjalny udział w wirulencji sprawia, że brane są również pod uwagę jako antygeny do opracowania szczepionek podjednostkowych czy jako markery diagnostyczne. Przeszukanie ekspresyjnej biblioteki genomowej (do stworzenia której

Tabela I
Prototypy szczepionek anty-*Campylobacter*

Antygen	Kurzy model badawczy	Schemat immunizacji	Adiuwant	Zakażenie <i>Campylobacter</i>	Protekcja	Źródło
Białka rekombinowane, nadproduktowane w systemie ekspresji <i>E. coli</i>						
Białko hybrydowe CadF-FlaA-FlpA	Broilery SPF	Podskórnice, 6 i 16 d.ż.	Montanid ISA 70VG	20 d.ż., <i>C. jejuni</i> F38011, 10 ⁸ jtk	27 d.ż., redukcja o 3 log10	[65]
Białko NHC	Ross308	<i>In ovo</i>	-	18 d.ż., <i>C. jejuni</i> 81-176, 10 ⁵ jtk	25 d.ż., brak protekcji	[75]
SodB	Leghorn	<i>Per os</i> , 1 i 14 d.ż.	TiterMax Gold*	28 d.ż., <i>C. jejuni</i> M1, 10 ⁷ jtk	35 d.ż., redukcja o 1 log10	
Dps	Cornish Rock	Podskórnice, 10 i 24 d.ż.	CFA	34 d.ż., <i>C. jejuni</i> NCTC11168, 10 ⁵ jtk	44 d.ż., brak protekcji	[92]
CmeC	Broilery	<i>Per os</i> , 7 i 14 d.ż.	LT-R192G	35 d.ż., <i>C. jejuni</i> NCTC11168, 10 ⁶ jtk	45 d.ż., brak protekcji	[106]
N-glikozylowana nietaktywna ToxC <i>C. diphtheria</i>	SPF Leghorn	Podskórnice, 7 i 21 d.ż.	CFA, IFA	28 d.ż., <i>C. jejuni</i> 81-176, 10 ⁶ jtk	35 d.ż., redukcja o 7 log10	[68]
CjaA	SPF Light Sussex	Podskórnice, 1 i 15 d.ż.	TiterMax*	28 d.ż., <i>C. jejuni</i> M1, 10 ⁷ jtk	49 d.ż., redukcja o 1.9 log10	[10]
Podjednostkowe szczepionki skonstruowane z wykorzystaniem wektorów						
<i>S. Enteritidis</i> Δ aroA Δ htr/epitopy CjaD	Broilery	<i>Per os</i> , 1 d.ż.	-	21 d.ż., <i>C. jejuni</i> wyizolowany od kurcząt, 10 ⁷ jtk	32 d.ż., redukcja o 5 log10	[53]
<i>S. Typhimurium</i> χ 9718/ CjaD	Broilery	<i>Per os</i> , 1 i 14 d.ż.	-	28 d.ż., <i>C. jejuni</i> , 10 ⁷ jtk	35 d.ż., brak protekcji	[57]
<i>S. Typhimurium</i> χ 9088/ Dps	Cornish Rock	<i>Per os</i> , 3, 10 i 16 d.ż.	CFA	26 d.ż., <i>C. jejuni</i> NCTC11168, 10 ⁵ jtk	36 d.ż., redukcja o 2.5 log10	[92]
<i>S. Enteritidis</i> Δ aroA Δ htr/epitopy CjaA	Broilery Cobb 500	<i>Per os</i> , 1 d.ż.	-	21 d.ż., <i>C. jejuni</i> wyizolowany od kurcząt, 10 ⁷ jtk	32 d.ż., redukcja o 2 log10	[53]
<i>S. Typhimurium</i> χ 3987/ CjaA	Broilery	<i>Per os</i> , 1 i 14 d.ż.	-	28 d.ż., <i>C. jejuni</i> 72Dz/92, 10 ⁶ jtk	37 i 40 d.ż., redukcja o 6 log10	[103]
<i>S. Typhimurium</i> χ 9718/ CjaA	Broilery Cobb 500	<i>Per os</i> , 1 i 14 d.ż.	-	28 d.ż., <i>C. jejuni</i> Wr1, 10 ⁵ jtk	35 i 42 d.ż., brak protekcji,	[52]
<i>S. Typhimurium</i> Δ aroA/ TetC-CjaA	SPF Light Sussex	<i>Per os</i> , 1 i 15 d.ż.	-	28 d.ż., <i>C. jejuni</i> M1, 10 ⁷ jtk	56 d.ż., redukcja o 1.5 log10	[10]
OMP zamknięte w nanocząstkach	Nie podana rasa kur	<i>Per os</i> ; podskórnice, 7 i 21 d.ż.	-	35 d.ż., <i>C. jejuni</i> 81-176, 10 ⁷ jtk	42 d.ż., podskórnice redukcja o 6 log10	[2]
Martwe komórki <i>E. coli</i> K12/ N-glikan <i>Campylobacter</i>	SPF Leghorn	<i>Per os</i> , 7 i 21 d.ż.	-	28 d.ż., <i>C. jejuni</i> 81-176, 10 ³ jtk	35 d.ż., redukcja o 4 log10	[68]
Żywe komórki <i>E. coli</i> K12/ N-glikan <i>Campylobacter</i>	SPF Leghorn	<i>Per os</i> , 7 i 21 d.ż.	-	28 d.ż., <i>C. jejuni</i> 81-176, 10 ³ jtk	35 d.ż., redukcja o 8 log10	[68]
OMV/ N-glikan <i>Campylobacter</i>	Leghorn	<i>Per os</i> , 7 i 21 d.ż.	-	28 d.ż., <i>C. jejuni</i> 81-176, 10 ² jtk	35 d.ż., redukcja o 4 log10	[74]

d.ż. - dzień życia; Białko NHC - białko fuzyjne zawierające flagelinę *C. jejuni* i domenę flageliny *S. Typhimurium* aktywującą TLR; SPF (Specific Pathogen Free) - wolne od specyficznego patogena; OMP (Outer Membrane Proteins) - białka błony zewnętrznej; Dps (DNA binding protein from starved cells) - białko wiążące DNA z komórek głodujących; CmeC - składnik pompy wielolekowej; ToxC - toksyna *Clostridium diphtheriae*; SodB (Superoxide dismutase B) - dysmutaza ponadtlenkowa B; TetC - toksyna tężcza; jtk - jednostka tworząca kolonię; OMV (Outer Membrane Vesicles) - pecherzyki błony zewnętrznej; Δ aroA - inaktywowany szlak syntezy aminokwasów aromatycznych; Δ htr - inaktywacja genu kodującego proteazę serynową; CFA - kompletny adiuwant Freund'a (complete Freund's adjuvant), IFA - niekompletny adiuwant Freund'a (incomplete Freund's adjuvant).

wykorzystano DNA zsekwencjonowanego szczepu *C. jejuni* NCTC11168) za pomocą ludzkiej surowicy od rekonwalescentów, wysyconej dodatkowo białkami szczepu *Campylobacter* hodowanego w warunkach laboratoryjnych, doprowadziło do zidentyfikowania 24 genów. Ich produkty pełnią różne funkcje metaboliczne (m.in. *leuC*, *ptmB*, *eno* i *fcl*), są zaangażowane w procesy biosyntezy (m.in. *tufB*) czy procesowanie informacji genetycznej. Dwa geny wykryte w tym eksperymencie (*cj1471c* oraz *cj1587c*) biorą udział w transporcie aminokwasów [39]. Podobna analiza została przeprowadzona z wykorzystaniem surowicy od kurcząt wysyconej białkami szczepu *Campylobacter* hodowanego *in vitro* [38]. Ten schemat postępowania doprowadził do identyfikacji 28 genów, z których jedynie pięć ulega ekspresji *in vivo* w obu gospodarzach, co jest prawdopodobnie wynikiem zupełnie innego przebiegu infekcji u ludzi i kurcząt. Zwraca uwagę fakt, że wśród wyróżnionej puli genów nie ma tych kodujących białka wykorzystane do konstrukcji prototypów szczepionek podjednostkowych (*cjaA*, *peb1*, *dps*). Analiza ta nie wykryła również genów takich jak *cadF*, *ciaB*, *pldA*, których unieczynnienie bezsprzecznie, jak wykazano w innych laboratoriach, obniża zdolność mikroorganizmu do kolonizacji.

Zastosowana po raz pierwszy w badaniach nad szczepionką przeciwko meningokokom grupy B „odwrotna wakcynologia” (reverse vaccinology) umożliwia identyfikację antygenów szczepionkowych *in silico*. Strategię taką zastosowali Meunier i wsp. [62]. W genomie *C. jejuni* 81176 poszukiwali genów kodujących białka zlokalizowane na powierzchni komórki o potencjalnych właściwościach adhezyjnych. Następnie analizowali antygenowość wybranych w ten sposób 22 białek i obecność epitopów w ich sekwencjach aminokwasowych (VaxiJen, BCPreds). Zwraca uwagę w tej grupie znaczący udział białek związanych z aparatem ruchu *Campylobacter* [62].

Spśród przetestowanych na brojlerach sześciu białek, cztery zmniejszyły liczbę *Campylobacter* w stolcu nawet o cztery rzędy wielkości z jednoczesnym rozwojem humoralnej odpowiedzi immunologicznej. Natomiast w drugim badaniu, pomimo zaindukowania silnej odpowiedzi immunologicznej, nie zaobserwowano protekcji u kurcząt [63].

Trzeba jednak pamiętać, że nie zawsze geny wskazwane metodami bioinformatycznymi/ mikromacierzy kodują białka istotne w indukcji ochronnej odpowiedzi immunologicznej.

Ciekawą strategią mającą na celu przewyższenie problemu wysokiej różnorodności genetycznej szczepów *Campylobacter*, a także zwiększenie efektywności immunizacji, było zastosowanie hybrydowych białek zawierających epitopy różnych antygenów. Prowadzone aktualnie porównawcze analizy genomów oraz

proteomów wielu szczepów mają na celu poszukiwanie nowych antygenów *Campylobacter* przydatnych do konstrukcji szczepionki lub białek potencjalnie z możliwością wykorzystania jako celów nowych leków. W ostatnich latach nastąpił znaczny rozwój narzędzi umożliwiających wydajną analizę *in silico*. Badania immunoinformatyczne proteomu *Campylobacter* przeprowadzone w 2017 roku doprowadziły do identyfikacji kilku epitopów, które są konserwowane, prezentowane przez cząsteczki MHC-I i potencjalnie mogą zostać wykorzystane w opracowywaniu szczepionki chroniącej przed kamylobakteriozą [42, 59]. Ich użyteczność musi zostać jednak potwierdzona eksperymentalnie.

5.2. Wybór nośnika

Na skuteczność szczepionki, oprócz wyboru antygenów, ma wpływ także wybór nośnika. W tym charakterze stosowane są m.in. atenuowane szczepy różnych mikroorganizmów patogennych, VLPs (Virus Like Particles), wirusów, bakterie komensalne z grupy LAB (Lactic Acid Bacteria) lub też liposomy. Szczepionki podjednostkowe skonstruowane w oparciu o atenuowane szczepy patogenów mają wiele zalet: (1) silnie stymulują odpowiedź humoralną i/lub komórkową nie tylko przeciwko homologicznym antygenom, ale również przenoszonym antygenom heterologicznym, (2) możliwe są różne drogi podania (droga wziewna, donosowa, doustna, dooczna, dopochwowa, doodbytnicza), (3) podane na jeden z wymienionych sposobów indukują mechanizmy odpornościowe związane z błonami śluzowymi jak i ogólnoustrojową odpowiedź immunologiczną, (4) są łatwe i tanie w produkcji, (5) istnieje możliwość ich liofilizacji i przechowywania w temperaturze pokojowej. Przede wszystkim jednak atenuowane patogeny jelitowe przeżywają w środowisku układu pokarmowego zawierającym m.in. różne proteazy, defensyny, lizozym, a zatem są zdolne do ochrony przenoszonego heterologicznego antygeny.

Jako nośnik genów *Campylobacter* wykorzystywano na przykład żywe, atenuowane szczepy *S. enterica* sv. Enteritidis lub Typhimurium [34]. W ostatnich latach opracowano szereg ciekawych rozwiązań, m.in. regulowana opóźniona atenuacja, opóźniona synteza antygeny oraz regulowana opóźniona liza, które poprzez zwiększenie zdolności do przetrwania patogena w środowisku gospodarza, umożliwiają wywołanie optymalnej odpowiedzi immunologicznej. Atenuowane szczepy *Salmonella* były badane jako nośniki antygenów *Campylobacter* w immunoprofilaktyce kurcząt przez kilka grup badawczych [10, 53, 57, 103, 104]. W kilku eksperymentach stosowano wspomniane wcześniej antygeny CjaA i CjaD. Pomimo użycia tego samego antygeny, poziomy redukcji kolonizacji w eksperymentach ochronnych prowadzonych przez różne

grupy badawcze, różniły się diametralnie (od 6 log₁₀ do braku ochrony przed zakażeniem). Trudno wskazać przyczynę tak odmiennych wyników, jako że eksperymenty różniły się m.in. schematem immunizacji, użytym do zakażenia szczepem *Campylobacter*, rasą kurcząt wykorzystanych w eksperymencie ochronnym, serowarem i rodzajem atenuacji nośnikowego szczepu *Salmonella* oraz obecnością adiuwantu. Antygen CjaA stosowano także w konstrukcji szczepionki z wykorzystaniem *E. tenella* jako nośnika. Szczepionka podana dodziobowo skutkowała nieznacznie obniżonym poziomem kolonizacji [16].

Do przenoszenia obcych antygenów w procesie immunizacji wykorzystywane są również bakterie kwasu mlekowego (LAB). Jest to sztucznie wyodrębniona grupa o olbrzymiej różnorodności genetycznej oraz filogenetycznej, której cechą charakterystyczną jest zdolność do produkcji kwasu mlekowego. Dotychczas przeprowadzone badania wskazują, że podanie takich szczepów prowadzi do indukcji odpowiedzi immunologicznej zarówno w błonach śluzowych (sIgA), jak i ogólnoustrojowej reakcji układu odpornościowego przeciwko ekspresjonowanym heterologicznym antygenom, przy jednoczesnej niskiej odpowiedzi skierowanej przeciwko antygenom szczepu nośnikowego. Jako wektory szczepionkowe posiadają także inne zalety. Umożliwiając immunizację drogą śluzówkową zapewniają większą skuteczność walki z patogenami, dla których to właśnie śluzówka stanowi wrota infekcji. O atrakcyjności bakterii kwasu mlekowego w immunoprofilaktyce lub terapii decyduje również ich oporność na działanie niskiego pH soku żołądkowego oraz zdolność adhezji do komórek nabłonka jelitowego. Kluczową kwestią jest też bezpieczeństwo tych preparatów. Bakterie te (m.in. gatunki należące do rodzajów *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*) posiadają status GRAS, a część z nich zaliczamy do probiotyków, czyli organizmów, których krótkotrwała obecność lub kolonizacja wywiera pozytywny wpływ na wiele elementów fizjologii organizmu gospodarza. Niewątpliwą zaletą są również niskie koszty produkcji tego typu szczepionek oraz możliwość liofilizacji i przechowywania preparatu w temperaturze pokojowej [102].

Jak dotąd, spośród przedstawicieli bakterii z grupy LAB, jako nośnik antygenów *Campylobacter* wykorzystano szczep *Lactococcus lactis*. Szczep *L. lactis* prezentujący na powierzchni rCjaAD wykazywał wyższy efekt ochronny niż szczep *L. lactis* wytwarzający białko zlokalizowane w cytoplazmie oraz od szczepu *L. lactis* prezentującego na powierzchni CjaA, jednak różnice te nie były istotne statystycznie; poziom kolonizacji obniżył się jedynie o 1 rząd wielkości [46].

W roli nośników antygenów *Campylobacter* testowano także cząstki GEM (Gram-positive Enhancer Matrix) uzyskane z komórek *L. salivarius*. Struktury te

zawierają wzorce molekularne związane z patogenami (PAMP, Pathogen Associated Molecular Patterns), przez co zdolne są do indukowania procesów prozapalnych, a więc mogą wzmocnić działanie immunoterapeutyczne [3, 7]. Dodatkowo nie zawierają one rekombinowanego DNA. Cecha ta bywa wyraźnie podkreślana przez przeciwników stosowania, w różnych dziedzinach życia, GMO (Genetically Modified Organism). Jednak cząstki GEM stosunkowo szybko są usuwane z organizmu gospodarza, przez co indukcja odpowiedzi immunologicznej może wymagać skomplikowanych schematów szczepień, kilkukrotnego podawania preparatu [7].

Szczepionka składająca się z cząstek GEM *L. salivarius* prezentujących na powierzchni CjaA i CjaD, podana kurczętom podskórnie lub *per os*, nie prowadziła do obniżenia kolonizacji jelit kurcząt. Natomiast cząstki GEM *L. salivarius* prezentujące rCjaAD podane *in ovo* do zarodka kury w niewielkim stopniu obniżyły poziom kolonizacji jelita ptaków przez pałeczki *Campylobacter* w porównaniu do grupy kontrolnej [46].

Annamalai i wsp. jako nośnik antygenów *Campylobacter* użyli biodegradowalnych i biokompatybilnych nanocząstek – kopolimeru laktyny z glikolidem. Zarówno białka błony zewnętrznej zamknięte w nanocząstkach jak i same białka błony zewnętrznej podane kurczętom podskórnie znacząco obniżały poziom kolonizacji jelit ślepych przez pałeczki patogena [2].

Atrakcyjnymi nośnikami antygenów szczepionkowych są liposomy. Ich przydatność do celów immunizacyjnych po raz pierwszy opisali Allison i Gregoriadis w 1974 roku [97]. Zaletą liposomów – dwuwarstwowych pęcherzyków złożonych z amfipatycznych fosfolipidów, jest wydłużenie czasu uwalniania antygeny z ich wnętrza, ochrona antygeny przed nadmierną proteolizą i ułatwienie wchłaniania przez komórki prezentujące antygen (APC, Antigen-Presenting Cells) [96, 97], co prowadzi do stymulacji odpowiedzi immunologicznej nie tylko typu humoralnego, lecz także typu komórkowego [84]. Poza tym mogą być one produkowane na dużą skalę, przechowywane przez stosunkowo długi czas i, co najważniejsze, są uznane za bezpieczne i dobrze tolerowane przez organizm [78, 97]. Jak dotąd przeprowadzone nieliczne badania wskazują, że liposomy mogą być z powodzeniem stosowane do stymulacji układu odpornościowego kurcząt [15, 55, 105].

Obiecujące wyniki otrzymano w eksperymencie protekcyjnym, w którym wykorzystano liposomy wykorzystane do przeniesienia hybrydowego białka rCjaAD [46]. U ptaków immunizowanych *in ovo* zaobserwowano obniżenie kolonizacji o dwa rzędy wielkości w stosunku do grupy kontrolnej. Zwraca jednak uwagę fakt, że w jelitach połowy kurcząt kolonizacja była na poziomie niewykrywalnym zastosowaną metodą, czyli poniżej 1000 jtk/g zawartości jelita. Wyższy poziom protekcji

warunkowany przez liposomy może sugerować lepszą ochronę antygeny przed degradacją, jak również większą wydajność pobierania przez komórki prezentujące antygen. Jednocześnie może być to pozytywny efekt wczesnej modulacji systemu immunologicznego, co ma szczególne znaczenie w przypadku brojlerów, których długość życia nie przekracza 8 tygodni

Powierzchnia komórek *Campylobacter* bogata jest w glikozylowane białka. Mikroorganizmy te przeprowadzają dwa rodzaje procesu glikozylacji: N-glikozylację i O-glikozylację [90]. Dotychczasowe szczegółowe badania szlaku N-glikozylacji białek w komórkach *C. jejuni* wskazują, że glikoproteiny są silnie immunogennym czynnikiem biorącym udział w kolonizacji jelit kurcząt oraz w procesach adhezji i inwazji do ludzkich komórek nabłonka jelit [68]. N-glikan, konstytutywnie produkowany heptasacharyd, obecny jest we wszystkich izolatach *C. jejuni* i *C. coli*. Poznanie poszczególnych etapów syntezy glikanu, jego transportu oraz przyłączania do białek, umożliwi aktualnie jego zastosowanie w procesach biotechnologicznych [90, 91, 95]. Geny *C. jejuni* warunkujące procesy N-glikozylacji (*pgl*, protein glycosylation) sklonowane zostały na plazmidzie i wprowadzone do komórek *E. coli*, co nadało im zdolność glikozylowania białek zawierających odpowiednie motywy [68, 95]. Nothaft i wsp. skonstruowali prototypy szczepionek w oparciu o glikoproteiny [68]. Zastosowali oni dwie strategie. W pierwszej z nich, użyli rekombinowanej, nieaktywnej toksyny ToxC *Clostridium diphtheriae* zawierającej dziewięć powtórzeń sekwencji aminokwasowej wiążącej glikan. Do ekspresji rekombinowanej proteiny wykorzystali szczep *E. coli* kodujący białka szlaku glikozylacji *C. jejuni*. N-glikozylowana toksyna C została podana kurczętom na drodze iniekcji. Skuteczność tego prototypu szczepionki zależna była od zastosowanego schematu immunizacji. W drugiej strategii naukowcy przyłączyli heptasacharyd do zewnętrznego rdzenia lipopolisacharydu (LPS) *E. coli* K12, szczepu niezdolnego do produkcji antygeny O. Żywe bądź inaktywowane komórki *E. coli* prezentujące na powierzchni N-glikan *C. jejuni* podawano ptakom dodziobowo. Obie szczepionki indukowały produkcję przeciwciał typu IgY rozpoznających N-glikan, a co najważniejsze u immunizowanych ptaków zaobserwowano obniżenie kolonizacji jelit przez *Campylobacter* nawet o 8 rzędów wielkości. Szczepionka bazująca na żywych komórkach *E. coli* była bardziej skuteczna a jej podanie nie wpływało na zmianę składu kurzego mikrobiomu. Podanie wraz ze szczepionką szczepu probiotycznego (*Anaerosporebacter mobilis* lub *L. reuteri*) dodatkowo zwiększało jej skuteczność [69]. Należy zaznaczyć, że w wyżej wymienionych doświadczeniach wykorzystano kurczęta SPF (Specific Pathogen Free), pozbawione przeciwciał matczyńskich anty-*Campylobacter*, dlatego też powinny one zostać powtórzone z wyko-

rzystaniem brojlerów. Jako nośnika N-glikanu użyto także pęcherzyków błony zewnętrznej (OMV, Outer Membrane Vesicles). Prototyp szczepionki składający się z tzw. geOMV (glycoengineered Outer Membrane Vesicles), produkowanych w *E. coli*, podawany *per os*, także skutkował wysokim obniżeniem poziomu kolonizacji jelit kurcząt przez *Campylobacter* sp. [74].

6. Modulacja odpowiedzi immunologicznej

Szczepionki podjednostkowe, zarówno zawierające oczyszczone białka jak i te zawierające polisacharydy otoczkowe, dla zaindukowania wysokiego poziomu odpowiedzi odpowiedniej gałęzi układu odpornościowego wymagają stosowania odpowiednich adiuwantów. Elementem szczepionki, który nie tylko dostarcza antygen w odpowiednie miejsce, ale także może wzmocnić/ukierunkować odpowiedź immunologiczną organizmu, są nośniki. W immunoprofilaktyce kurcząt najczęściej stosowanymi immunostymulatorami są sole glinu oraz emulsje olejowe. W szczepionkach anty-*Campylobacter* przeznaczonych dla drobiu jak dotąd testowano tylko kilka adiuwantów: kompletny i niekompletny adiuwant Freund, Addavax™ (skwalen), modyfikowana toksyna LT *E. coli*, Montanide ISA 70 VG (emulsja wodno-olejowa) oraz TiterMax Gold (emulsja wodno-olejowa). Pogłębiająca się wiedza dotycząca funkcjonowania układu odpornościowego, głównie aktywności receptorów TLR (Toll-like receptors) oraz mechanizmu działania cytokin, pozwoli na wprowadzenie do praktyki adiuwantów takich jak: CpG – ODN (CpG oligodeoxynucleotides), modyfikowane toksyny, cytokiny czy nanocząstki. Różne objawy infekcji *Campylobacter* u ludzi i kurcząt sugerują konieczność zastosowania innych adiuwantów w szczepionkach przeznaczonych dla tych dwóch grup docelowych.

Receptory TLR to eukariotyczne białka rozpoznające tzw. wzorce molekularne komórek bakteryjnych (MAMP, Microbe-Associated Molecular Patterns). W większości są to białka transmembranowe, choć niektóre z nich zlokalizowane są w błonach organelli wewnątrz komórek eukariotycznych. Ligandy rozpoznawane przez receptory TLR – lipopolisacharyd, flagelina, lipoproteiny, DNA czy RNA, stanowią kryterium ich podziału. Stymulacja receptora skutkuje uruchomieniem, z wykorzystaniem białek adaptorowych, szlaków przekazywania sygnałów. Skutkiem tych procesów jest indukcja ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne a co za tym idzie indukcja ekspresji wielu elementów zarówno wrodzonej jak i nabytej odpowiedzi immunologicznej, wytwarzania wielu cytokin oraz antybakteryjnych peptydów (AMP) [48]. Stymulacja aktywności receptorów TLR przez komponenty szczepionek jest ostatnio obiektem wielu badań. Analizy genomów

ludzi i kur wykazały wiele podobieństw ale i różnic dotyczących receptorów TLR. U ludzi zidentyfikowano 10 rodzajów receptorów (hTR1-hTLR10). W genomach kur osiem z nich ma swoje homologii, brak jest TLR9, TLR8 jest nieaktywny, zaś TLR2 występuje w dwu izoformach. Dodatkowymi receptorami TLR, typowymi dla ptaków, są TLR15 oraz TLR21 [8, 27]. Kurzy receptor TLR21 rozpoznający DNA jest odpowiednikiem hTLR9. Stymulacja ptasich TLR21 za pomocą CpG – ODN (CpG – oligodeoxynucleotide) stymuluje głównie typ odpowiedzi Th-1. Choć *C. jejuni* oddziałuje z kilkoma ludzkimi receptorami TLR w podobny sposób jak z kurzymi, to chromosomowy DNA *Campylobacter* stymuluje jedynie chTLR21 a nie ludzki hTLR9. Różnice w odpowiedzi ludzkich i kurzych receptorów na kontakt z *C. jejuni* mogą być jednym z czynników odpowiedzialnych za różny przebieg infekcji [9, 70]. Flagelina *Campylobacter* będąca silnie immunogenym białkiem, często badana jako składnik prototypów podjednostkowych szczepionek, nie stymuluje receptorów TLR5. W celu modulowania odpowiedzi skonstruowano fuzyjne białko, połączenie flageliny *Campylobacter* z fragmentem flageliny *Salmonella* Enteritidis odpowiedzialnym za reakcje z receptorem TLR5. Otrzymany konstrukt przebadano na modelu kurzym. Uzyskano podwyższony poziom specyficznych IgY w surowicy, ale nie IgA w błonach śluzowych [75].

Coraz częściej stosowanymi adiuwantami w prototypach szczepionek są cytokiny o różnych aktywnościach. Ich użycie nie tylko wzmacnia ale także może ukierunkować odpowiedź immunologiczną [83]. W ostatnich latach badano mechanizm działania kilku ptasich cytokin (chIL-2, chIL-6, chIL-10 czy chIL-12) oraz ich efekt adiuwantowy w odniesieniu do kilku prototypów szczepionek, głównie przeciwko chorobom wirusowym. Ze względu na stosunkowo krótki czas przetrwania cytokin w organizmie uodparnianym są one najczęściej podawane w formie DNA (gen kodujący cytokinę sklonowany na plazmidzie pod kontrolą promotora eukariotycznego [14, 20, 89]. Przypuszczalnie cytokiny, dostarczane przy użyciu różnych nośników np. atenuowanych mikroorganizmów, bakterii kwasu mlekowego – LAB, liposomów czy nanocząstek) także znajdują zastosowanie w szczepionkach anty-*Campylobacter*.

7. Droga podania antygeny

Droga podania preparatu szczepionkowego to jeden z czynników determinujących poziom odpowiedzi immunologicznej i skuteczność immunizacji. Najczęściej badanymi drogami podania szczepionki jest iniekcja oraz *per os*. Na drodze iniekcji podawane są oczyszczone, natywne lub rekombinowane białka (SodB, Dps, CmeC, CjaA). Warto wspomnieć, że apli-

kowane są one często w obecności adiuwantów, czyli substancji wzmacniających odpowiedź immunologiczną tj. Montanid ISA 70VG, TiterMax Gold czy też kompletny adiuwant Freund.

Podanie antygeny *per os* umożliwia indukcję śluzówkowego układu odpornościowego przewodu pokarmowego, czyli drogi wnikania organizmu patogennego. Dodatkowo immunizacja dodziobowa jest najkorzystniejszą ekonomicznie formą aplikacji szczepionek (podana w pożywieniu lub w wodzie do picia). Co więcej, użycie szczepów kolonizujących przewód pokarmowy ptaków jako nośników białek immunogenychnych *Campylobacter* wydłuża czas ekspozycji organizmu na antygen, co zwiększa szansę wystąpienia skutecznej odpowiedzi immunologicznej.

W badaniach Nothaft i wsp. zaobserwowali zbliżony poziom protekcji u kurcząt, które otrzymały podskórnie N-glikozylowaną nieaktywną ToxC *C. diphtheria* lub dodziobowo żywe komórki *E. coli* prezentujące na powierzchni N-glikan *Campylobacter* [68]. Wyniki badań Annamalai i wsp. wskazały natomiast na wyższą skuteczność immunizacji podskórnej w zwalczaniu infekcji jelitowej *Campylobacter*. Szczepionka powstała w oparciu o białka błony zewnętrznej aplikowana na drodze iniekcji skutkowała obniżonym poziomem kolonizacji jelit ślepych przez pałeczki patogena. Natomiast u kurcząt, które ten sam prototyp szczepionki otrzymały dodziobowo nie zaobserwowano protekcji [2].

Obiecującą drogą podania antygeny jest immunizacja *in ovo*. Opracowana w latach 90. XX wieku technologia *in ovo* polega na podaniu antygenów do płynu owodniowego lub bezpośrednio do rozwijającego się zarodka. Immunizacja kurcząt *in ovo* od dawna jest szeroko stosowana przez przemysł drobiarski w zapobieganiu chorobom wirusowym [66]. Ten sposób aplikacji wykorzystano m.in. w przypadku szczepionki przeciwko chorobie Mareka, nowotworowej chorobie ptaków wywoływanej przez wirusy z rodziny *Herpesviridae*. Okazało się, że po podaniu szczepionki *in ovo* znacznie szybciej dochodzi do wytworzenia odpowiedzi immunologicznej chroniącej ptaki przed zakażeniem [72].

Proces rearanżacji genów immunoglobulin u ptaków występuje tylko raz podczas rozwoju embrionalnego i jest znany jako somatyczna konwersja genów. U kurcząt prekursorzy limfocytów B wytwarzających przeciwciała (Prebursal Stem Cells) są syntetyzowane między 8 a 14 dniem embriogenezy, a następnie zasiedlają torebkę Fabrycjusza, gdzie są poddawane różnicowaniu i klonowaniu. Dlatego podawanie szczepionki *in ovo* w czasie, gdy następuje rozwój komórek prekursorowych limfocytów ma swoje uzasadnienie. Dodatkowe zalety tej drogi immunizacji to zmniejszenie stresu w porównaniu z tradycyjnym szczepieniem oraz możliwość automatyzacji procesu szczepienia [94]. Szczepienie

in ovo może być dodatkowo połączone z dawką przypominającą podaną dopiero po wykluciu kurcząt

W badaniach Radomska i wsp. [75] u kurcząt, którym *in ovo* podano białko NHC (białko fuzyjne zawierające flagelinę *C. jejuni* i domenę flageliny *S. Typhimurium* aktywującą TLR) nie zaobserwowano efektu ochronnego. Odmienne wyniki otrzymała grupa badawcza Jagusztyn-Krynickiej. Prototypy szczepionek powstałe w oparciu o liposomy zawierające immunogenne białko lub pęcherzyki błony zewnętrznej podane *in ovo* znacząco obniżyły poziom kolonizacji jelit ślepych przez pałeczki *Campylobacter* [28, 47].

8. Podsumowanie

Wyniki otrzymane przez wiele grup badawczych pracujących nad konstrukcją szczepionek są trudne bądź nawet niemożliwe do porównania w związku z wieloma zmiennymi tj. wybrany antygen, schemat i droga immunizacji, zastosowanie adiuwantu czy szczep *C. jejuni* oraz jego dawka użyta w eksperymencie protekcyjnym. Dodatkowo postęp w technikach sekwencjonowania kurzych genomów zwrócił uwagę na istotne różnice genetyczne ras drobiu, które mogą mieć wpływ na funkcjonowanie ich układu odpornościowego oraz mechanizmy warunkujące kolonizację przewodu pokarmowego przez pałeczki *Campylobacter*.

Również różnorodność genetyczna szczepów *Campylobacter* hamuje rozwój skutecznej szczepionki. Wymagania skutecznej immunizacji mogą spełnić jedynie schematy szczepień uwzględniające tę różnorodność i złożoność antygenową. Można to osiągnąć albo poprzez wieloantygenowy skład szczepionki, albo przez zastosowanie różnych antygenów w kolejnych immunizacjach. Jednocześnie konieczne są strategie mające na celu wzmocnienie/modulację odpowiedzi immunologicznej kurcząt.

Nie ma wątpliwości, że antygen, obecność adiuwantu jak i wybór nośnika i droga immunizacji muszą być brane pod uwagę w procesie konstruowania skutecznej szczepionki. Trudno jednak przewidzieć, która z zastosowanych strategii przyniesie najlepsze rezultaty.

Podziękowania

Artykuł został sfinansowany ze środków grantu NCN 2016/21/B/NZ6/01141 oraz NCN 2014/15/N/NZ2/00380.

Piśmiennictwo

- Ajene A.N., Fischer Walker C.L., Black R.E.: Enteric pathogens and reactive arthritis: a systematic review of *Campylobacter*, *Salmonella* and *Shigella*-associated reactive arthritis. *J. Health Popul. Nutr.* **31**, 299–307 (2013)
- Annamalai T., Pina-Mimbela R., Kumar A., Binjawadagi B., Liu Z., Renukaradhya G.J., Rajashekara G.: Evaluation of nanoparticle-encapsulated outer membrane proteins for the control of *Campylobacter jejuni* colonization in chickens. *Poult. Sci.* **92**, 2201–2211 (2013)
- Audouy S.A., van Selm S., van Roosmalen M.L., Post E., Kanninga R., Neef J., Estevao S., Nieuwenhuis E.E., Adrian P.V., Leenhouts K. i wsp.: Development of lactococcal GEM-based pneumococcal vaccines. *Vaccine*, **25**, 2497–2506 (2007)
- Awad W.A., Dublec F., Hess C., Dublec K., Khayal B., Aschenbach J.R., Hess M.: *Campylobacter jejuni* colonization promotes the translocation of *Escherichia coli* to extra-intestinal organs and disturbs the short-chain fatty acids profiles in the chicken gut. *Poult. Sci.* **95**, 2259–2265 (2016)
- Awad W.A., Molnar A., Aschenbach J.R., Ghareeb K., Khayal B., Hess C., Liebhart D., Dublec K., Hess M.: *Campylobacter* infection in chickens modulates the intestinal epithelial barrier function. *Innate Immun.* **21**, 151–160 (2015)
- Blaser M.J.: Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. *J. Infect. Dis.* **176 Suppl 2**, S103–105 (1997)
- Bosma T., Kanninga R., Neef J., Audouy S.A., van Roosmalen M.L., Steen A., Buist G., Kok J., Kuipers O.P., Robillard G. i wsp.: Novel surface display system for proteins on non-genetically modified gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 880–889 (2006)
- Brownlie R., Allan B.: Avian toll-like receptors. *Cell Tissue Res.* **343**, 121–130 (2011)
- Brownlie R., Zhu J., Allan B., Mutwiri G.K., Babiuk L.A., Potter A., Griebel P.: Chicken TLR21 acts as a functional homologue to mammalian TLR9 in the recognition of CpG oligodeoxynucleotides. *Mol. Immunol.* **46**, 3163–3170 (2009)
- Buckley A.M., Wang J., Hudson D.L., Grant A.J., Jones M.A., Maskell D.J., Stevens M.P.: Evaluation of live-attenuated *Salmonella* vaccines expressing *Campylobacter* antigens for control of *C. jejuni* in poultry. *Vaccine*, **28**, 1094–1105 (2010)
- Byrne C.M., Clyne M., Bourke B.: *Campylobacter jejuni* adhere to and invade chicken intestinal epithelial cells *in vitro*. *Microbiology*, **153**, 561–569 (2007)
- Cawthraw S.A., Newell D.G.: Investigation of the presence and protective effects of maternal antibodies against *Campylobacter jejuni* in chickens. *Avian Dis.* **54**, 86–93 (2010)
- Cean A., Stef L., Simiz E., Julean C., Dumitrescu G., Vasile A., Pet E., Drinceanu D., Corcionivoschi N.: Effect of human isolated probiotic bacteria on preventing *Campylobacter jejuni* colonization of poultry. *Foodborne Pathog. Dis.* **12**, 122–130 (2015)
- Chen H.Y., Shang Y.H., Yao H.X., Cui B.A., Zhang H.Y., Wang Z.X., Wang Y.D., Chao A.J., Duan T.Y.: Immune responses of chickens inoculated with a recombinant fowlpox vaccine coexpressing HA of H9N2 avian influenza virus and chicken IL-18. *Antiviral Res.* **91**, 50–56 (2011)
- Chiou C.J., Tseng L.P., Deng M.C., Jiang P.R., Tasi S.L., Chung T.W., Huang Y.Y., Liu D.Z.: Mucoadhesive liposomes for intranasal immunization with an avian influenza virus vaccine in chickens. *Biomaterials*, **30**, 5862–5868 (2009)
- Clark J.D., Oakes R.D., Redhead K., Crouch C.F., Francis M.J., Tomley F.M., Blake D.P.: *Eimeria* species parasites as novel vaccine delivery vectors: anti-*Campylobacter jejuni* protective immunity induced by *Eimeria tenella*-delivered CjaA. *Vaccine*, **30**, 2683–2688 (2012)
- Conlan A.J., Coward C., Grant A.J., Maskell D.J., Gog J.R.: *Campylobacter jejuni* colonization and transmission in broiler chickens: a modelling perspective. *J. R. Soc. Interface*, **4**, 819–829 (2007)
- Connell S., Meade K.G., Allan B., Lloyd A.T., Kenny E., Cormican P., Morris D.W., Bradley D.G., O'Farrelly C.: Avian resistance

- to *Campylobacter jejuni* colonization is associated with an intestinal immunogene expression signature identified by mRNA sequencing. *PLoS One*, **7**, e40409 (2012)
19. Dasti J.I., Tareen A.M., Lugert R., Zautner A.E., Gross U.: *Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 205–211 (2010)
 20. Degen W.G., van Zuilekom H.I., Scholtes N.C., van Daal N., Schijns V.E.: Potentiation of humoral immune responses to vaccine antigens by recombinant chicken IL-18 (rChIL-18). *Vaccine*, **23**, 4212–4218 (2005)
 21. EFSA: The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA J.* **14**, 4634 (2016)
 22. EFSA: The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA J.* **16**, 262 (2018)
 23. EFSA, ECDC: The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA J.* **2017**, **15**, 228 (2017)
 24. El-Shibiny A., Scott A., Timms A., Metawea Y., Connerton P., Connerton I.: Application of a group II *Campylobacter* bacteriophage to reduce strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* colonizing broiler chickens. *J. Food Prot.* **72**, 733–740 (2009)
 25. Esson D., Mather A.E., Scanlan E., Gupta S., de Vries S.P., Bailey D., Harris S.R., McKinley T.J., Meric G., Berry S.K. i wsp.: Genomic variations leading to alterations in cell morphology of *Campylobacter* spp. *Sci. Rep.* **6**, 38303 (2016)
 26. Fanelli A., Agazzi A., Alborali G.L., Pilotto A., Bontempo V., Dell'Orto V., Demey V., Caputo J.M., Savoini G.: Prevalence reduction of pathogens in poultry fed with *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology, Agronomy, Soc. Environ.* **19**, 3–10 (2015)
 27. Gillespie M., Shamovsky V., D'Eustachio P.: Human and chicken TLR pathways: manual curation and computer-based orthology analysis. *Mamm. Genome*, **22**, 130–138 (2011)
 28. Godlewska R., Kuczkowski M., Wyszynska A., Klim J., Derlatka K., Wozniak-Biel A., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Evaluation of a protective effect of *in ovo* delivered *Campylobacter jejuni* OMVs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 8855–8864 (2016)
 29. Goodfellow J.A., Willison H.J.: Guillain-Barre syndrome: a century of progress. *Nat. Rev. Neurol.* **12**, 723–731 (2016)
 30. Guerry P., Poly F., Riddle M., Maue A.C., Chen Y.H., Monteiro M.A.: *Campylobacter* polysaccharide capsules: virulence and vaccines. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2**, 7 (2012)
 31. Han Z., Pielsticker C., Gerzova L., Rychlik I., Rautenschlein S.: The influence of age on *Campylobacter jejuni* infection in chicken. *Dev. Comp. Immunol.* **62**, 58–71 (2016)
 32. Havelaar A.H., Ivarsson S., Lofdahl M., Nauta M.J.: Estimating the true incidence of campylobacteriosis and salmonellosis in the European Union, 2009. *Epidemiol. Infect.* **141**, 293–302 (2013)
 33. Havelaar A.H., Mangen M.J., de Koeijer A.A., Bogaardt M.J., Evers E.G., Jacobs-Reitsma W.F., van Pelt W., Wagenaar J.A., de Wit G.A., van der Zee H. i wsp.: Effectiveness and efficiency of controlling *Campylobacter* on broiler chicken meat. *Risk Anal.* **27**, 831–844 (2007)
 34. Hegazy W.A., Hensel M.: *Salmonella enterica* as a vaccine carrier. *Future Microbiol.* **7**, 111–127 (2012)
 35. Hermans D., Pasmans F., Heyndrickx M., Van Immerseel F., Martel A., Van Deun K., Haesebrouck F.: A tolerogenic mucosal immune response leads to persistent *Campylobacter jejuni* colonization in the chicken gut. *Crit. Rev. Microbiol.* **38**, 17–29 (2012)
 36. Hermans D., Van Steendam K., Verbrugge E., Verlinden M., Martel A., Seliwiorstow T., Heyndrickx M., Haesebrouck F., De Zutter L., Deforce D. i wsp.: Passive immunization to reduce *Campylobacter jejuni* colonization and transmission in broiler chickens. *Vet. Res.* **45**, 27 (2014)
 37. Hickey T.E., Majam G., Guerry P.: Intracellular survival of *Campylobacter jejuni* in human monocytic cells and induction of apoptotic death by cytolethal distending toxin. *Infect. Immun.* **73**, 5194–5197 (2005)
 38. Hu Y., Huang J., Jiao X.A.: Screening of genes expressed *in vivo* during interaction between chicken and *Campylobacter jejuni*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 217–224 (2014)
 39. Hu Y., Huang J., Li Q., Shang Y., Ren F., Jiao Y., Liu Z., Pan Z., Jiao X.A.: Use of *in vivo*-induced antigen technology to identify *in vivo*-expressed genes of *Campylobacter jejuni* during human infection. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 363–370 (2014)
 40. Humphrey S., Chaloner G., Kemmett K., Davidson N., Williams N., Kipar A., Humphrey T., Wigley P.: *Campylobacter jejuni* is not merely a commensal in commercial broiler chickens and affects bird welfare. *MBio.* **5**, e01364-01314 (2014)
 41. Ijaz U.Z., Sivaloganathan L., Mckenna A., Richmond A., Kelly C., Linton M., Stratakos A., Lavery U., Elmi A., Wren B. i wsp.: Comprehensive longitudinal microbiome analysis of the chicken cecum reveals a shift from competitive to environmental drivers and a window of opportunity for *Campylobacter*. *Front Microbiol.* **15**, 2452 (2018)
 42. Jain R., Singh S., Verma S.K., Jain A.: Genome-wide prediction of potential vaccine candidates for *Campylobacter jejuni* using reverse vaccinology. *Interdiscip. Sci.* **11**, 337–347 (2019)
 43. Johnson J.G., Yuhas C., McQuade T.J., Larsen M.J., DiRita V.J.: Narrow-spectrum inhibitors of *Campylobacter jejuni* flagellar expression and growth. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 3880–3886 (2015)
 44. Kaakoush N.O., Castano-Rodriguez N., Mitchell H.M., Man S.M.: Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **28**, 687–720 (2015)
 45. Kirkpatrick B.D., Tribble D.R.: Update on human *Campylobacter jejuni* infections. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **27**, 1–7 (2011)
 46. Kobierecka P.A., Olech B., Ksiazek M., Derlatka K., Adamska I., Majewski P.M., Jagusztyn-Krynicka E.K., Wyszynska A.K.: Cell Wall Anchoring of the *Campylobacter* antigens to *Lactococcus lactis*. *Front. Microbiol.* **7**, 165 (2016)
 47. Kobierecka P.A., Wyszynska A.K., Aleksandrak-Piekarczyk T., Kuczkowski M., Tuzimek A., Piotrowska W., Gorecki A., Adamska I., Wieliczko A., Bardowski J. i wsp.: *In vitro* characteristics of *Lactobacillus* spp. strains isolated from the chicken digestive tract and their role in the inhibition of *Campylobacter* colonization. *MicrobiologyOpen*, **6**, (2017)
 48. Kopp E., Medzhitov R.: Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **15**, 396–401 (2003)
 49. Korsak D., Mackiw E., Rozynek E., Zylowska M.: Prevalence of *Campylobacter* spp. in retail chicken, turkey, pork, and beef meat in Poland between 2009 and 2013. *J. Food. Prot.* **78**, 1024–1028 (2015)
 50. Kumar A., Drozd M., Pina-Mimbela R., Xu X., Helmy Y.A., Antwi J., Fuchs J.R., Nislow C., Templeton J., Blackall P.J. i wsp.: Novel anti-*Campylobacter* compounds identified using high throughput screening of a pre-selected enriched small molecules library. *Front. Microbiol.* **7**, 405 (2016)
 51. Lacharme-Lora L., Chaloner G., Gilroy R., Humphrey S., Gibbs K., Jopson S., Wright E., Reid W., Ketley J., Humphrey T. i wsp.: B lymphocytes play a limited role in clearance of *Campylobacter jejuni* from the chicken intestinal tract. *Sci. Rep.* **7**, 45090 (2017)
 52. Laniewski P., Kuczkowski M., Chrzastek K., Wozniak A., Wyszynska A., Wieliczko A., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Evaluation of the immunogenicity of *Campylobacter jejuni* CjaA

- protein delivered by *Salmonella enterica* sv. Typhimurium strain with regulated delayed attenuation in chickens. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 281–292 (2014)
53. Layton S.L., Morgan M.J., Cole K., Kwon Y.M., Donoghue D.J., Hargis B.M., Pumford N.R.: Evaluation of *Salmonella*-vectored *Campylobacter* peptide epitopes for reduction of *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. *Clin. Vaccine Immunol.* **18**, 449–454 (2011)
54. Lee M.D., Newell D.G.: *Campylobacter* in poultry: filling an ecological niche. *Avian Dis.* **50**, 1–9 (2006)
55. Li W., Watarai S., Iwasaki T., Kodama H.: Suppression of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis excretion by intraocular vaccination with fimbriae proteins incorporated in liposomes. *Dev. Comp. Immunol.* **28**, 29–38 (2004)
56. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: LPSN. <https://www.bacterio.net/campylobacter.html> (30.09.2019)
57. Łaniewski P.L., M. Wszyńska, A. Majewski, P. Godlewska, R. Jagusztyn-Krynicka, E.K.: Assessment of chicken protection against *Campylobacter jejuni* infection by immunization with avirulent *Salmonella enterica* sv. Typhimurium strain producing *Campylobacter* CjaD/Pal protein. *Vaccine: Develop. Therapy*, **2**, 43–50 (2012)
58. Marder Mph E., Griffin P., Cieslak P., Dunn J., Hurd S., Jervis R.: Preliminary incidence and trends of infections with pathogens transmitted commonly through food – Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006–2017. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **67**, 324–328 (2018)
59. Mehla K., Ramana J.: Surface proteome mining for identification of potential vaccine candidates against *Campylobacter jejuni*: an *in silico* approach. *Funct. Integr. Genomics*, **17**, 27–37 (2017)
60. Meric G., Yahara K., Mageiros L., Pascoe B., Maiden M.C., Jolley K.A., Sheppard S.K.: A reference pan-genome approach to comparative bacterial genomics: identification of novel epidemiological markers in pathogenic *Campylobacter*. *PLoS One*, **9**, e92798 (2014)
61. Meunier M., Guyard-Nicodeme M., Dory D., Chemaly M.: Control strategies against *Campylobacter* at the poultry production level: biosecurity measures, feed additives and vaccination. *J. Appl. Microbiol.* **120**, 1139–1173 (2016)
62. Meunier M., Guyard-Nicodeme M., Hirchaud E., Parra A., Chemaly M., Dory D.: Identification of novel vaccine candidates against *Campylobacter* through reverse vaccinology. *J. Immunol. Res.* **2016**, 5715790 (2016)
63. Meunier M., Guyard-Nicodeme M., Vigouroux E., Poezevara T., Beven V., Quesne S., Bigault L., Amelot M., Dory D., Chemaly M.: Promising new vaccine candidates against *Campylobacter* in broilers. *PLoS One*, **12**, e0188472 (2017)
64. Murray C.J., Vos T., Lozano R., Naghavi M., Flaxman A.D., Michaud C., Ezzati M., Shibuya K., Salomon J.A., Abdalla S. i wsp.: Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, **380**, 2197–2223 (2012)
65. Neal-McKinney J.M., Lu X., Duong T., Larson C.L., Call D.R., Shah D.H., Konkel M.E.: Production of organic acids by probiotic lactobacilli can be used to reduce pathogen load in poultry. *PLoS One*, **7**, e43928 (2012)
66. Negash T., al-Garib S.O., Gruys E.: Comparison of *in ovo* and post-hatch vaccination with particular reference to infectious bursal disease. A review. *Vet. Q.* **26**, 76–87 (2004)
67. Newell D.G., Elvers K.T., Dopfer D., Hansson I., Jones P., James S., Gittins J., Stern N.J., Davies R., Connerton I. i wsp.: Biosecurity-based interventions and strategies to reduce *Campylobacter* spp. on poultry farms. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 8605–8614 (2011)
68. Nothhaft H., Davis B., Lock Y.Y., Perez-Munoz M.E., Vinogradov E., Walter J., Coros C., Szymanski C.M.: Engineering the *Campylobacter jejuni* N-glycan to create an effective chicken vaccine. *Sci. Rep.* **6**, 26511 (2016)
69. Nothhaft H., Perez-Munoz M.E., Gouveia G.J., Duar R.M., Wanford J.J., Lango-Scholey L., Panagos C.G., Srithayakumar V., Plastow G.S., Coros C. i wsp.: Coadministration of the *Campylobacter jejuni* N-Glycan-Based vaccine with probiotics improves vaccine performance in broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**, (2017)
70. Patel B.A., Gomis S., Dar A., Willson P.J., Babiuk L.A., Potter A., Mutwiri G., Tikoo S.K.: Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs (CpG-ODN) predominantly induce Th1-type immune response in neonatal chicks. *Dev. Comp. Immunol.* **32**, 1041–1049 (2008)
71. Paul N.C., Al-Adwani S., Crespo R., Shah D.H.: Evaluation of passive immunotherapeutic efficacy of hyperimmunized egg yolk powder against intestinal colonization of *Campylobacter jejuni* in chickens. *Poult. Sci.* **93**, 2779–2787 (2014)
72. Peebles E.D.: *In ovo* applications in poultry: A review. *Poult. Sci.* **97**, 2322–2338 (2018)
73. Platts-Mills J.A., Kosek M.: Update on the burden of *Campylobacter* in developing countries. *Curr Opin. Infect. Dis.* **27**, 444–450 (2014)
74. Price N.L., Goyette-Desjardins G., Nothhaft H., Valguarnera E., Szymanski C.M., Segura M., Feldman M.F.: Glycoengineered Outer Membrane Vesicles: a novel platform for bacterial vaccines. *Sci. Rep.* **6**, 24931 (2016)
75. Radomska K.A., Vaezirad M.M., Verstappen K.M., Wosten M.M., Wagenaar J.A., van Putten J.P.: Chicken immune response after *in ovo* immunization with chimeric TLR5 activating flagellin of *Campylobacter jejuni*. *PLoS One*, **11**, e0164837 (2016)
76. Robyn J., Rasschaert G., Pasmans F., Heyndrickx M.: Thermotolerant *Campylobacter* during broiler rearing: risk factors and intervention. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **14**, 81–105 (2015)
77. Rollins S.M., Peppercorn A., Hang L., Hillman J.D., Calderwood S.B., Handfield M., Ryan E.T.: *In vivo* induced antigen technology (IVIAT). *Cell Microbiol.*, **7**, 1–9 (2005)
78. Romero E.L., Morilla M.J.: Topical and mucosal liposomes for vaccine delivery. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **3**, 356–375 (2011)
79. Rosenquist H., Nielsen N.L., Sommer H.M., Norrung B., Christensen B.B.: Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. *Int. J. Food Microbiol.* **83**, 87–103 (2003)
80. Sadkowska-Todys M., Kucharczyk B.: Campylobacteriosis in Poland in 2013 and 2014. *Przegl. Epidemiol.* **70**, 209–215 (2016)
81. Sahin O., Luo N., Huang S., Zhang Q.: Effect of *Campylobacter*-specific maternal antibodies on *Campylobacter jejuni* colonization in young chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5372–5379 (2003)
82. Saint-Cyr M.J., Guyard-Nicodeme M., Messaoudi S., Chemaly M., Cappelletti J.M., Dousset X., Haddad N.: Recent advances in screening of anti-*Campylobacter* activity in probiotics for use in poultry. *Front. Microbiol.* **7**, 553 (2016)
83. Schmidt C.S., Morrow W.J., Sheikh N.A.: Smart adjuvants. *Expert Rev Vaccines*, **6**, 391–400 (2007)
84. Schwendener R.A.: Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. *Ther. Adv. Vaccines*, **2**, 159–182 (2014)
85. Silva J., Leite D., Fernandes M., Mena C., Gibbs P.A., Teixeira P.: *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. *Front. Microbiol.* **2**, 200 (2011)
86. Skanseng B., Trosvik P., Zimonja M., Johnsen G., Bjerrum L., Pedersen K., Wallin N., Rudi K.: Co-infection dynamics of

- a major food-borne zoonotic pathogen in chicken. *PLoS Pathog.* **3**, e175 (2007)
87. Skarp C.P.A., Hanninen M.L., Rautelin H.I.K.: Campylobacteriosis: the role of poultry meat. *Clin Microbiol. Infect.* **22**, 103–109 (2016)
 88. Stavropoulos P.G., Soura E., Kanelleas A., Katsambas A., Antoniou C.: Reactive arthritis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **29**, 415–424 (2015)
 89. Su B.S., Chiu H.H., Lin C.C., Shien J.H., Yin H.S., Lee L.H.: Adjuvant activity of chicken interleukin-12 co-administered with infectious bursal disease virus recombinant VP2 antigen in chickens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **139**, 167–175 (2011)
 90. Szymanski C.M., Logan S.M., Linton D., Wren B.W.: *Campylobacter* – a tale of two protein glycosylation systems. *Trends Microbiol.* **11**, 233–238 (2003)
 91. Terra V.S., Mills D.C., Yates L.E., Abouelhadid S., Cuccui J., Wren B.W.: Recent developments in bacterial protein glycan coupling technology and glycoconjugate vaccine design. *J. Med. Microbiol.* **61**, 919–926 (2012)
 92. Theoret J.R., Cooper K.K., Zekarias B., Roland K.L., Law B.F., Curtiss R., 3rd, Joens L.A.: The *Campylobacter jejuni* Dps homologue is important for *in vitro* biofilm formation and cecal colonization of poultry and may serve as a protective antigen for vaccination. *Clin. Vaccine Immunol.* **19**, 1426–1431 (2012)
 93. Thibodeau A., Fravallo P., Yergeau E., Arsenault J., Lahaye L., Letellier A.: Chicken caecal microbiome modifications induced by *Campylobacter jejuni* colonization and by a non-antibiotic feed additive. *PLoS One*, **10**, e0131978 (2015)
 94. Toro H., Tang D.C., Suarez D.L., Sylte M.J., Pfeiffer J., Van Kampen K.R.: Protective avian influenza *in ovo* vaccination with non-replicating human adenovirus vector. *Vaccine*, **25**, 2886–2891 (2007)
 95. Wacker M., Linton D., Hitchen P.G., Nita-Lazar M., Haslam S.M., North S.J., Panico M., Morris H.R., Dell A., Wren B.W. i wsp.: N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science*, **298**, 1790–1793 (2002)
 96. Watarai S., Iwase T., Tajima T., Yuba E., Kono K.: Efficiency of pH-sensitive fusogenic polymer-modified liposomes as a vaccine carrier. *Sci. World J.* **2013**, 903234 (2013)
 97. Watson D.S., Endsley A.N., Huang L.: Design considerations for liposomal vaccines: influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens. *Vaccine*, **30**, 2256–2272 (2012)
 98. Watson R.O., Galan J.E.: *Campylobacter jejuni* survives within epithelial cells by avoiding delivery to lysosomes. *PLoS Pathog.* **4**, e14 (2008)
 99. Williams L.K., Sait L.C., Trantham E.K., Cogan T.A., Humphrey T.J.: *Campylobacter* infection has different outcomes in fast – and slow-growing broiler chickens. *Avian Dis.* **57**, 238–241 (2013)
 100. Wilson D.L., Rathinam V.A., Qi W., Wick L.M., Landgraf J., Bell J.A., Plovanich-Jones A., Parrish J., Finley R.L., Mansfield L.S. i wsp.: Genetic diversity in *Campylobacter jejuni* is associated with differential colonization of broiler chickens and C57BL/6J IL10-deficient mice. *Microbiology*, **156**, 2046–2057 (2010)
 101. World Health Organisation: Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. <https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/> (30.09.2019)
 102. Wyszynska A., Kobierecka P., Bardowski J., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Lactic acid bacteria – 20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 2967–2977 (2015)
 103. Wyszynska A., Raczko A., Lis M., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Oral immunization of chickens with avirulent *Salmonella* vaccine strain carrying *C. jejuni* 72Dz/92 *cjaA* gene elicits specific humoral immune response associated with protection against challenge with wild-type *Campylobacter*. *Vaccine*, **22**, 1379–1389 (2004)
 104. Wyszynska A., Zycka J., Godlewska R., Jagusztyn-Krynicka E.K.: The *Campylobacter jejuni/coli cjaA* (*cj0982c*) gene encodes an N-glycosylated lipoprotein localized in the inner membrane. *Curr. Microbiol.* **57**, 181–188 (2008)
 105. Yaguchi K., Ohgitani T., Noro T., Kaneshige T., Shimizu Y.: Vaccination of chickens with liposomal inactivated avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) vaccine by eye drop or coarse spray administration. *Avian Dis.* **53**, 245–249 (2009)
 106. Zeng X., Xu F., Lin J.: Development and Evaluation of CmeC Subunit Vaccine against *Campylobacter jejuni*. *J. Vaccines Vaccin.* **1**, (2010)

ANTYGENY REKOMBINANTOWE W DIAGNOSTYCE SEROLOGICZNEJ BORELIOZY

Weronika Grąźlewska, Lucyna Holec-Gąsior*

Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Wydział Chemiczny,
Politechnika Gdańska, Gdańsk, Polska

Wpłynęło w styczniu, zaakceptowano w listopadzie 2019 r.

Streszczenie: Borelioza jest najczęstszą chorobą odkleszczową dotykającą mieszkańców półkuli północnej. Chorobę tę wywołują bakterie zakwalifikowane do grupy *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Współcześnie podstawą diagnostyki laboratoryjnej boreliozy jest dwustopniowe badanie serologiczne. Pierwszym etapem jest test immunoenzymatyczny (ELISA), jeżeli wynik badania jest dodatni lub wątpliwy jako test potwierdzający stosuje się technikę Western blot. W obu metodach jako główne źródło antygenów wykorzystuje się całkowite lizaty komórkowe *B. burgdorferi* s.l. Jednak ogromna różnorodność gatunków w obrębie *B. burgdorferi* s.l. oraz niski stopień zakonserwowania sekwencji ich białek sprawia, że wykorzystanie lizatów komórkowych jednego z genogatunków nie jest wystarczające do prawidłowego rozpoznania boreliozy. Liczne doniesienia literaturowe wykazują, że wykorzystanie antygenów rekombinantowych lub chimerycznych *B. burgdorferi* s.l. może być potencjalnym rozwiązaniem problemów występujących w immunodiagnostyce boreliozy. Jednak, aby testy diagnostyczne oparte na białkach rekombinantowych miały jak największą skuteczność należy wykorzystać w nich starannie wyselekcjonowane antygeny lub ich fragmenty. Dzięki takiemu podejściu można opracować test, którego czułość pozostanie niezależna od genogatunku *B. burgdorferi* s.l., który wywołał chorobę. Dodatkowo wykorzystanie jedynie fragmentów białek może zdecydowanie ograniczyć częstość występowania reakcji krzyżowych.

1. Wprowadzenie. 2. Charakterystyka wybranych antygenów *B. burgdorferi* s.l. 3. Diagnostyka boreliozy. 4. Problemy w serodiagnostyce boreliozy. 5. Wykorzystanie białek rekombinantowych i peptydów syntetycznych w diagnostyce boreliozy. 6. Podsumowanie

RECOMBINANT ANTIGENS IN SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF LYME BORRELIOSIS

Abstract: Lyme borreliosis, an infectious disease caused by tick-borne spirochetes of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, is regarded as the most commonly reported vector-borne infection in the Northern Hemisphere. Currently, the basis for laboratory diagnosis of Lyme disease is a two-step serological examination. The first is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). If the test result is positive or questionable, a Western blot is used as the second phase test. In both methods, the total cell lysates of *B. burgdorferi* s.l. are used as the main source of antigens. However, the huge diversity of genospecies within *B. burgdorferi* s.l. and the low degree of preservation of the sequence of their proteins means that using the cell lysates of one of the species is not sufficient to correctly diagnose Lyme disease. Numerous literature reports show that the use of *B. burgdorferi* s.l. recombinant or chimeric antigens may be a potential solution to problems occurring in Lyme disease immunodiagnosis. However, for diagnostic tests based on recombinant proteins to be as effective as possible, carefully selected antigens or fragments should be used. With this approach, a test can be developed with a sensitivity that remains independent of the *B. burgdorferi* s.l. species which caused the disease. In addition, the exclusive use of protein fragments may definitely reduce the frequency of cross-reactions.

1. Introduction. 2. Characterization of selected *B. burgdorferi* s.l. antigens. 3. Diagnosis of Lyme disease. 4. Problems in Lyme disease serodiagnosis. 5. Use of recombinant antigens and synthetic peptides in the diagnosis of Lyme disease. 6. Summary

Słowa kluczowe: antygeny rekombinantowe, borelioza, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, immunodiagnostyka

Keywords: recombinant antigens, Lyme borreliosis, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, immunodiagnosis

1. Wprowadzenie

Borelioza jest chorobą odzwierzęcą wywoływaną przez krętki należące do kompleksu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.). Schorzenie to zostało opisane po raz pierwszy u ludności zamieszkującej miejscowość Lyme (stan Connecticut, USA), dlatego też często określane jest mianem choroby z Lyme (LD, Lyme Disease) [71]. Borelioza należy do najczęstszych chorób odkleszczowych (tj. przenoszonych na człowieka w czasie ugry-

zienia zakażonego bakterią kleszcza z rodzaju *Ixodes*), występujących wśród mieszkańców półkuli północnej. W większości przypadków, aby doszło do zakażenia krętciem potrzebny jest czas żerowania kleszcza wynoszący około 36 godz. przy czym ryzyko to wzrasta do 100% po upływie 72 godz. [40, 74].

Kompleks *B. burgdorferi* s.l. jest heterogenną grupą bakterii z rodzaju *Borrelia* o globalnym zasięgu występowania. Obecnie, na podstawie filogenetycznego podobieństwa, w obrębie kompleksu *B. burgdorferi* s.l.

* Autor korespondencyjny: dr hab. inż. Lucyna Holec-Gąsior, Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk, e-mail: holec@pg.edu.pl

wyróżnia się około 20 genogatunków, jednakże z uwagi na podejmowane próby zidentyfikowania oraz opisanie nowych szczepów uważa się, iż liczba ta nie jest ostateczna (Tab. I) [45, 64, 69].

Krętki *B. burgdorferi* s.l. to mikroaerofilne, Gram-ujemne bakterie należące do typu *Spirochaetes*. W zależności od fazy cyklu rozwojowego mikroorganizmy te zaliczane są do pasożytów zewnątrz lub wewnątrz komórkowych. Komórki bakterii mają długość od 10 do 30 μm i od 0,2 do 0,5 μm szerokości [5]. W budowie komórek *B. burgdorferi* s.l. wyróżnia się następujące elementy: zewnętrzną błonę lipidową z wieloma lipoproteinami powierzchniowymi, przestrzeń peryplazmatyczną, rzęski oraz wewnętrzną błonę cytoplazmatyczną tworzącą protoplazmatyczny cylinder. Pomiędzy błoną zewnętrzną i wewnętrzną znajduje się przestrzeń peryplazmatyczna, w jej obrębie umieszczone są rzęski (od 7 do 11), które umożliwiają komórkom krętka aktywne poruszanie [7, 36]. Bakterie należące do kompleksu *B. burgdorferi* s.l. charakteryzuje pleomorfizm, oznacza to, że są w stanie zmienić swoją morfologię w odpowiedzi na warunki środowiska [53]. Znane są 4 formy pleomorficzne *B. burgdorferi* s.l.: (i) krętek tj. wegetatywna forma spiralna; (ii) blebs czyli forma pęcherzykowa; (iii) „round bodies” (RBs) jako forma

pozbawiona ściany komórkowej – nazywana również CWD (cell wall deficient), sferoplastem lub formą L; (iiii) biofilm like (BFL), czyli kolonia złożona z form krętkowych, sferycznych oraz blebs [53, 54].

Sekwencja nukleotydowa genomu *B. burgdorferi* sensu stricto B31 została określona w 1997 roku. Całkowity genom tego szczepu obejmuje 1 521 419 par zasad (pz), składa się na niego liniowy chromosom (910 725 pz), oraz 21 plazmidów (9 kolistych i 12 liniowych) o łącznym rozmiarze 610 694 pz [9, 19]. Wśród tak dużej liczby plazmidów dwa z nich (lp54 i cp26), obecne są u wszystkich genogatunków *B. burgdorferi* s.l. [25]. W obrębie chromosomu zlokalizowane są głównie geny kodujące białka odpowiedzialne za metabolizm podstawowy, a jego sekwencja jest dość silnie zakonserwowana wśród dotychczas przebadanych przedstawicieli *B. burgdorferi* s.l. Analiza sekwencji chromosomu wykazała, że patogen nie posiada genów kodujących enzymy konieczne do wielu podstawowych funkcji życiowych komórki m.in. syntezy aminokwasów, kwasów tłuszczowych, kofaktorów enzymów i nukleotydów oraz związków biorących udział w transporcie elektronów. Odkrycia, te wskazują na silne przystosowanie *B. burgdorferi* s.l. do pasożytniczego trybu życia [9, 19]. Znaczna część genów zlokalizowanych na plazmidach

Tabela I
Zasięg występowania dotychczas poznanych genogatunków należących do kompleksu *B. burgdorferi* s.l.

Genogatunek	Patogenność dla ludzi	Występowanie
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	Tak	Ameryka Północna, Europa
<i>B. garinii</i>	Tak	Europa, Azja
<i>B. bavariensis</i>	Tak	Europa, Azja
<i>B. afzelii</i>	Tak	Europa, Azja
<i>B. spielmanii</i>	Tak	Europa
<i>B. bissettii</i>	Podejrzewana	Europa, Ameryka Północna
<i>B. mayonii</i>	Podejrzewana	Ameryka Północna
<i>B. lusitaniae</i>	Podejrzewana	Europa
<i>B. valaisiana</i>	Podejrzewana	Europa, Japonia, Tajwan, Korea
<i>B. lanei</i>	Nie	Ameryka Północna
<i>B. americana</i>	Nie	Ameryka Północna
<i>B. andersonii</i>	Nie	Ameryka Północna
<i>B. californiensis</i>	Nie	Ameryka Północna
<i>B. carolinensis</i>	Nie	Ameryka Północna
<i>B. japonica</i>	Nie	Japonia
<i>B. kurtenbachii</i>	Nie	Ameryka Północna
<i>B. sinica</i>	Nie	Chiny
<i>B. tanukii</i>	Nie	Japonia
<i>B. turdi</i>	Nie	Japonia
<i>B. yangtze</i>	Nie	Chiny

Na podstawie: [45, 48, 50, 61].

(około 15%) koduje antygeny błony zewnętrznej. Białka te określają zdolność krętka do transmisji pomiędzy żywicielami oraz szybkość rozprzestrzeniania się zakażenia po wnikięciu do kolejnego z nich. Plazmidy zawierają, więc główną informację genetyczną wpływającą na wirulencję i patogenność bakterii z rodzaju *Borrelia* [9, 10]. Nie wszystkie szczepy *B. burgdorferi* s.l. posiadają pełen komplet plazmidów, a zatem całkowity rozmiar genomu może zmieniać się wśród różnych izolatów *B. burgdorferi* s.l. [2, 49]. Wiele z plazmidów jest łatwo traconych podczas hodowli *in vitro* co jest związane z utratą patogenności. Zatem hodowla laboratoryjna w pełni wirulentnych szczepów *B. burgdorferi* s.l. jest wyjątkowo trudna [56, 62].

Borelioza to przewlekła, wieloukładowa choroba o fazowym przebiegu. Jak dotąd udowodniono, że u ludzi wywołuje ją 5 z dotychczas poznanych genogatków *B. burgdorferi* s.l. tj. *B. burgdorferi sensu stricto* (s.s.), *Borrelia afzelii*, *Borrelia spielmanii*, *Borrelia garinii* i *Borrelia bavariensis*. W przeciwieństwie do Ameryki Północnej, gdzie boreliozę u ludzi wywołuje jedynie *B. burgdorferi* s.s., w Europie występują wszystkie genogatunki ostatecznie potwierdzone jako patogenne dla ludzi [45]. W przebiegu boreliozy lekarze najczęściej rozróżniają trzy fazy choroby: (i) wczesną – trwającą do 8 tygodni od momentu zakażenia; (ii) rozsianą – pojawiającą się 6–26 tygodni od kontaktu z kleszczem oraz (iii) późną – rozwijającą się po 6 miesiącach od momentu przeniknięcia krętka do organizmu człowieka [40, 59]. Najbardziej charakterystycznym objawem wczesnej boreliozy jest rumień wędrujący (EM, *erythema migrans*), nie pojawia się on jednak u wszystkich zakażonych, a jedynie u 40–80% pacjentów [2, 52, 59]. EM jest to zmiana skórna mająca początkowo postać czerwonej plamy, która rozszerza się, tworząc charakterystyczny wzór z centralnym przejaśnieniem. W tej fazie zakażenia pacjenci mogą nie doświadczać innych dolegliwości lub wykazywać objawy grypopodobne. Nieleczona choroba może rozwinąć się do wczesnej fazy rozsianej w trakcie, której możliwe jest wystąpienie rumienia wędrującego mnogiego. Dodatkowo często obserwowane są objawy neurologiczne (zespół Bannwartha, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie korzeni nerwowych i nerwów czaszkowych) lub rzadziej zapalenie serca oraz ostre nawracające zapalenie stawów [2, 40, 59]. Przebieg późnego etapu boreliozy jest w dużym stopniu uzależniony od genogatunku *B. burgdorferi* s.l., który wywołał chorobę, dlatego też łatwo zauważyć pewne rozbieżności w późniejszych fazach choroby pomiędzy Europą a Ameryką Północną. *B. afzelii* przypisuje się w głównej mierze wywoływanie zanikowego zapalenia skóry (ACA, *acrodermatitis chronica atrophicans*). Infekcje *B. garinii* i *B. bavariensis* przeważnie prowadzą do postaci neurologicznej choroby (NB, neuroborelioza), natomiast *B. burgdorferi* s.s.

wywołuje głównie boreliozowe zapalenie stawów (LA, *Lyme arthritis*). *B. spielmanii* do tej pory wyizolowano jedynie ze zmian skórnych [12, 17, 69].

2. Charakterystyka wybranych antygenów

B. burgdorferi s.l.

Najlepiej poznanymi antygenami *B. burgdorferi* s.l. są te znajdujące się na powierzchni komórki oraz białka budujące wici. Białka powierzchniowe *B. burgdorferi* s.l. dzielą się na dwie główne grupy: lipoproteiny, które są zakotwiczone w błonie zewnętrznej poprzez znajdujące się na N-terminalnym końcu ugrupowania lipidowe oraz integralne białka błony zewnętrznej (OMP, integral outer membrane proteins) zakotwiczone za pomocą domen transbłonowych [38].

Krętki *B. burgdorferi* s.l. charakteryzują się bardzo wysoką zmiennością sekwencji aminokwasowej antygenów powierzchniowych, wśród których przeważają silnie immunogenne lipoproteiny. Większość z nich jest kodowana przez liczne plazmidy. Budowa antygenowa *B. burgdorferi* s.l. zmienia się w zależności od warunków środowiska. Dlatego też inne białka są eksponowane na powierzchni krętka podczas bytowania w organizmie kleszcza, a inne we wnętrzu ssaczego żywiciela. Zmiana ekspresji poszczególnych genów zachodzi w związku ze zmianą temperatury oraz wartości pH otoczenia, w którym znajduje się krętek. Lipoproteiny powierzchniowe odgrywają ważną rolę w wirulencji oraz w interakcjach pomiędzy żywicielem a patogenem, są również zaangażowane w unikanie odpowiedzi immunologicznej żywiciela. Inna grupa dobrze poznanych antygenów to białka budujące wici, które są wytwarzane przez krętki bez względu na miejsce ich bytowania [38, 39, 62, 65]. Krótką charakterystykę wybranych antygenów *B. burgdorferi* s.l. przedstawiono poniżej oraz zebrano w tabeli II.

VlsE

Białko VlsE (variable major protein-like sequence expressed) to lipoproteina kodowana przez liniowy plazmid lp28-1. Locus zajmowany przez ten gen składa się z miejsca ekspresyjnego *vlsE* oraz 15 kaset wyciszających, w obrębie, których znajduje się po sześć regionów zmiennych (VR1 do VR6) rozdzielonych przez regiony niezienne (IR). Szacuje się, iż masa cząsteczkowa VlsE *B. burgdorferi* s.l. wynosi około 35 kDa [41, 82]. W trakcie trwania zakażenia białko VlsE podlega zmienności antygenowej, definiowanej jako dziedziczna i odwracalna zmienność struktury antygenowej, która występuje podczas przebiegu infekcji w tempie wyższym, niż można się było spodziewać w przypadku standardowych mechanizmów rekombinacji lub mutacji. Podczas infekcji rearanżacje te prowadzą do powstania

Tabela II
Charakterystyka wybranych antygenów *B. burgdorferi* s.l.

Etap cyklu życiowego <i>Bbsl</i>	Antygen	Umiejscowienie genu	Masa	Dodatkowe informacje	Źródło
Bytowanie w organizmie kleszcza	OspA	Plazmid lp54	31 kDa	<ul style="list-style-type: none"> Niezbędne dla przetrwania <i>Bbsl</i> w ciele kleszcza Składnik jedynej szczepionki przeciwko boreliozie 	[2, 19, 66]
	OspB	Plazmid lp54	34 kDa	<ul style="list-style-type: none"> Niezbędne dla przetrwania <i>Bbsl</i> w organizmie kleszcza 	
Transmisja z kleszcza do organizmu ssaka	OspC	Plazmid cp26	20–25 kDa	<ul style="list-style-type: none"> Niezbędne do transmisji <i>Bbsl</i> z organizmu kleszcza do ssaka Zakonserwowane fragmenty na N i C-końcu 	[3, 8, 66, 72]
Bytowanie w organizmie ssaka	DbpA/B	Plazmid lp54	20–21 kDa	<ul style="list-style-type: none"> Odpowiada za adhezję <i>Bbsl</i> do komórek gospodarza – wiąże dekorynę Bierze udział w rozprzestrzenianiu się i utrzymaniu krętka w organizmie ssaka 	[18, 29, 57]
	VlsE	Plazmid lp28-1	35 kDa	<ul style="list-style-type: none"> Locus złożony z miejsca ekspresyjnego <i>vlsE</i> oraz 15 kaset wyciszających Bierze udział w unikaniu odpowiedzi immunologicznej gospodarza (zmiennosc antygenowa) Posiada wysoko zakonserwowany region IR6 (<i>pepC6</i>) 	[41, 82]
	BmpA	Chromosom	36 kDa	<ul style="list-style-type: none"> Odpowiada za adhezję <i>Bbsl</i> do komórek ssaka – wiąże laminę Wysoce zakonserwowane 	[63, 68]
Bytowanie w organizmie kleszcza i ssaka	FlaA	Chromosom	37 kDa	<ul style="list-style-type: none"> Buduje otoczkę wici 	[15, 35, 75]
	FlaB	Chromosom	41 kDa	<ul style="list-style-type: none"> Buduje rdzeń wici Sekwencja aa wysoko rozpowszechniona wśród szerokiej gamy mikroorganizmów – głównie skrajne fragmenty białka Wewnętrzny fragment p41/i – unikalny dla <i>Bbsl</i> 	

Bbsl – *Borrelia burgdorferi* sensu lato

miliardów klonów, z których każdy eksprymuje inny wariant VlsE, pozwala to na uniknięcie odpowiedzi układu immunologicznego [56, 82]. VlsE to silny immunogen indukujący produkcję zarówno przeciwciał klasy IgM jak i IgG już na wczesnych etapach infekcji. Głębsze badania nad VlsE wykazały, że w jego obrębie znajduje się wysoko zakonserwowany 26-aminokwasowy region (IR6). Dodatkowo wykazano, że to właśnie ten fragment białka VlsE jest głównym antygenem stymulującym produkcję przeciwciał klasy IgG [27, 44, 82].

DbpA i DbpB

Białka DbpA oraz DbpB (decorin binding protein A/B) kodowane są przez operon *dbpB/A* zlokalizowany na plazmidzie lp54 [29]. Ich produkcja w komórce krętka wzrasta wraz z spadkiem pH oraz wzrostem temperatury do 37°C, a więc wraz z zmianami warunków jakie towarzyszą transmisji patogenu z kleszcza do organizmu ssaka. Białka te odpowiadają za adhezję bakterii do tkanek żywiciela poprzez wiązanie dekoryny – proteoglikanu oddziałującego z włóknami kolagenowymi. Wykazano, że DbpA i DbpB odgrywają kluczową rolę w późniejszych etapach infekcji: rozprzestrzenianiu się oraz utrzymaniu krętka w organizmie ssaka. O ich

ogromnej roli w rozwoju zakażenia może świadczyć fakt, że szczepy *B. burgdorferi* s.l. pozbawione plazmidu lp54 są awirulentne [18, 57]. Dodatkowo białko DbpA jest silnym immunogenem, który indukuje wytwarzanie przeciwciał klasy IgG [27].

BmpA

Gen *bmpA* zlokalizowany jest na chromosomie *B. burgdorferi* s.l. w sąsiedztwie trzech genów paralogicznych o nazwach *bmpB*, *bmpC* i *bmpD*, które razem tworzą złożony operon [68]. Białko BmpA (basic membrane protein A) znane również jako P39 umiejscowione jest w błonie komórkowej bakterii, a jego masa cząsteczkowa wynosi około 36 kDa. Proteina ta charakteryzuje się wysokim stopniem zakonserwowania sekwencji aminokwasowej [63]. Wyniki badań wskazują, że białko BmpA wiąże składniki macierzy zewnątrzkomórkowej, głównie laminę, co umożliwia krętkom adhezję do komórek ssaka. Wykryto, że domena wiążąca obejmuje osiemdziesiąt C-końcowych aminokwasów białka [73]. Uważa się, że białko to może odgrywać znaczącą rolę w indukowaniu odpowiedzi immunologicznej w komórkach błony maziowej torebki stawowej, co prowadzi do rozwoju LA [81].

OspA i OspB

Białka OspA i OspB są eksponowanymi na powierzchni komórek *B. burgdorferi* s.l. lipoproteinami odpowiednio o masie 31 kDa i 34 kDa. Transkrybowane są z pojedynczego promotora umiejscowionego na liniowym plazmidzie lp54 [19, 34, 38]. Produkcja białek OspA i OspB zachodzi głównie, gdy bakteria znajduje się w jelitach kleszczy, ponieważ białka te są konieczne do przetrwania krętka w jego organizmie. Ekspresja regionu promotora *ospA/B* zanika, gdy kleszcz zaczyna żerować, jednak OspA jest wciąż obecne na powierzchni komórek znajdujących się w organizmie ssaka. Świadczą o tym przeciwciała skierowane przeciwko temu antygenowi wykryte w surowicy pacjentów nawet podczas późnej fazy infekcji [66]. Białko OspA, było składnikiem jedynej szczepionki przeciwko boreliozie stosowanej w Stanach Zjednoczonych do 2002 roku [2].

OspC

Lipoproteina OspC o masie cząsteczkowej wynoszącej, w zależności od genogatunku krętka, od 20 do 25 kDa. Kodowana jest przez locus umiejscowione na plazmidzie cp26. Białko OspC jest niezbędne do transmisji *B. burgdorferi* s.l. z organizmu kleszcza do ssaka. Jego produkcja następuje co najmniej po 24 godz. od momentu rozpoczęcia pobierania krwi przez kleszcza (szczyt przypada po 48 godz.), co tłumaczy dlaczego zakażenie ssaka przez krętka odbywa się z opóźnieniem. Po pobraniu krwi przez pajęczaka zastępuje ono białko OspA produkowane podczas bytowania krętka wewnątrz organizmu kleszcza [8, 66, 72]. OspC charakteryzuje się bardzo dużym zróżnicowaniem sekwencji aminokwasowej pomiędzy genogatunkami *B. burgdorferi* s.l. Dotychczas, wśród izolatów pochodzących zarówno z Europy jak i z Ameryki Północnej określono 16 serotypów białka OspC, w związku z tym OspC jest często stosowany do typowania szczepów *B. burgdorferi* s.l. [76, 78]. W sekwencji aminokwasowej antygeny OspC zakonserwowane fragmenty zlokalizowano jedynie na jego końcach (aminokwasy od 11 do 30 na N-końcu, oraz 10 terminalnych reszt aminokwasowych z C-końca) [3, 4, 51]. OspC jest jednym z najbardziej immunogennych białek we wczesnej fazie zakażenia *B. burgdorferi* s.l. Swoiste wobec OspC przeciwciała IgM pojawiają się wcześniej niż te skierowane przeciwko antygenowi VlsE [2, 51, 72]. Wiele badań wykazało, że OspC (obok białek wici) jest głównym antygenem wykorzystywanym do wykrywania swoistych przeciwciał IgM [27, 77].

FlaA i FlaB

Rzęski *B. burgdorferi* s.l. zbudowane są z dwóch rodzajów białek (FlaA oraz FlaB) kodowanych przez geny zlokalizowane na chromosomie. Białko FlaB (41 kDa)

buduje rdzeń natomiast FlaA (37 kDa) stanowi otoczkę wici. W niektórych przypadkach powierzchnia rzęski może być tylko w niewielkim stopniu pokryta białkiem FlaA, pozostawiając odsłoniętym jej rdzeń. Spowodowane jest to faktem, iż gen *flaA* ulega ekspresji na znacznie niższym poziomie, niż ten kodujący białko FlaB [15, 22]. Porównania sekwencji aminokwasowej białka FlaB wykazały, że jest ona wysoce rozpowszechniona wśród szerokiej gamy mikroorganizmów (np. *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*), w szczególności dotyczy to skrajnych fragmentów antygeny. Natomiast wewnętrzna część białka FlaB (fragment p41/i obejmujący aminokwasy od 129 do 251), cechuje się większą specyficznością dla *B. burgdorferi* s.l. [35, 75].

3. Diagnostyka boreliozy

Rozpoznanie choroby z Lyme dokonuje się na podstawie objawów klinicznych, które są następstwem ugryzienia przez kleszcza. Najbardziej charakterystycznym z nich jest rumień wędrujący. Jego obecność jest zwykle wystarczająca do postawienia prawidłowej diagnozy. Niestety EM, jak wspomniano wcześniej, występuje jedynie u 40–80% pacjentów, więc nie zawsze istnieje możliwość rozpoznania boreliozy na tej podstawie. Dodatkowym utrudnieniem w rozpoznaniu są alergeny obecne w ślinie kleszcza, które wprowadzane do organizmu żywiciela mogą powodować miejscowy proces zapalny, przybierający postać różnej wielkości zaczerwienienia, nie świadczącego o przebiegu boreliozy. W związku z tym konieczna jest konsultacja z doświadczonym lekarzem, który będzie w stanie odróżnić EM od zwykłego odczynu zapalnego. Inne symptomy choroby z Lyme nie są wystarczająco charakterystyczne aby umożliwić na ich podstawie rozpoznanie choroby, dlatego bardzo ważną rolę odgrywa tutaj diagnostyka laboratoryjna. Dzieli się ona na dwie główne grupy: metody bezpośrednie oraz pośrednie. Metody bezpośrednie polegają na identyfikacji całej komórki patogenu, jego antygenów lub materiału genetycznego w próbach biologicznych. Natomiast metody pośrednie polegają na wykrywaniu swoistych przeciwciał w surowicy pacjenta [2, 26, 40, 52, 59, 67]. W laboratoryjnej diagnostyce boreliozy materiałem badanym może być pobrana od pacjenta surowica krwi, płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn maziowy lub wycinek tkanki (np. skóry) [45, 59].

Jedną z bezpośrednich metod diagnostycznych jest laboratoryjna hodowla krętków, w której materiał wyjściowy stanowią próbki pobrane od pacjentów (biopaty skóry, płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn stawowy, krew). Mimo 100% specyficzności podejście to nie jest wykorzystywane w rutynowej diagnostyce boreliozy, ze względu na wysokie wymagania wzrostowe krętków

oraz długi czas potrzebny na przeprowadzenie testu (jednoznacznie negatywny wynik można stwierdzić dopiero po 5 tygodniach hodowli). Dodatkowo test ten nie charakteryzuje się wysoką czułością, która w znaczącym stopniu uzależniona jest od rodzaju próbki stanowiącej materiał wyjściowy. Skuteczność wyżej wymienionej metody dla biopłatów pobranych z miejsca występowania EM waha się między 40% a 90% i między 20% a 60% dla próbek pobranych ze zmian ACA [33, 45, 79]. Dużo niższą czułość (10–26%) otrzymuje się dla płynu mózgowo-rdzeniowego. W przypadku hodowli z krwi wskaźnik ten wynosi zaledwie 9% dla pacjentów z Europy i wzrasta nawet do 40% przy użyciu większych objętości krwi u pacjentów z EM w USA. Płyn maziowy stanowi materiał wyjściowy, dla którego skuteczność tego podejścia diagnostycznego jest najniższa – wynik testu w tym przypadku prawie nigdy nie jest pozytywny. Z wyżej wymienionych powodów metoda ta jest głównie wykorzystywana jako narzędzie uzupełniające proces diagnostyczny u pacjentów z dysfunkcjami układu immunologicznego [45, 79].

Detekcja DNA *B. burgdorferi* s.l. przy pomocy łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, polymerase chain reaction) możliwa jest w zróżnicowanym materiale klinicznym, takim jak wycinki skórne, płyn mózgowo-rdzeniowy oraz płyn stawowy. Zastosowanie reakcji PCR jest najbardziej wskazane we wczesnych etapach choroby, gdy organizm nie wytworzył jeszcze swoistych przeciwciał. Należy pamiętać, że metoda ta nie różnicuje materiału genetycznego pochodzącego od żywych i martwych patogenów, a więc nie pozwala na stwierdzenie czy ma miejsce aktywne zakażenie, co jest jej znaczącą wadą. Czułość metody PCR zależy od liczebności krętków w organizmie żywiciela, stadium choroby oraz od rodzaju materiału klinicznego. Wykorzystanie reakcji PCR jest najbardziej skuteczne w przypadku płynu stawowego (czułość na poziomie 80%), natomiast dla materiału pochodzącego ze zmian skórnych czułość jest nieco niższa i wynosi 60–70%. Dane dotyczące czułości w wykrywaniu DNA *B. burgdorferi* s.l. w płynie mózgowo-rdzeniowym są rozbieżne i wahają się w granicach 10–30% [2, 70, 79].

Ze względu na duże ograniczenia różnych metod bezpośrednich, w rutynowej laboratoryjnej diagnostyce boreliozy najczęściej wykorzystywane są testy pośrednie bazujące na wykrywaniu przeciwciał klasy IgM i IgG. W obecnych badaniach serologicznych rekomendowane jest dwuetapowe podejście diagnostyczne, które po raz pierwszy zostało wprowadzone w 1993 roku w USA przez kilka tamtejszych agencji ochrony zdrowia [11]. W Polsce ten sposób diagnostyki zalecany jest przez Polskie Towarzystwo Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych od 2007 roku. Pierwszym etapem tego podejścia diagnostycznego jest czuły test immunoenzymatyczny (ELISA, enzyme-linked immunosorbent

assay). Jeżeli test ELISA da wynik dodatni lub wątpliwy jako test drugiego stopnia (potwierdzający) stosuje się Western blot (WB) [2, 45].

Testy ELISA ze względu na swoją wysoką czułość pełnią rolę testów przesiewowych. Oparte są one głównie na całkowitych lizatach komórkowych krętków. Niestety takie preparaty antygenowe nie mają wysokiej specyficzności ze względu na obecność w lizacie *B. burgdorferi* s.l. antygenów reagujących krzyżowo, wśród których wymienia się np. białka wstrząsu termicznego czy białka wici, które powszechnie występują w komórkach innych mikroorganizmów. Ze względu na niezbyt wysoką specyficzność testy ELISA charakteryzują się nadrozpoznawalnością, dlatego dodatni wynik nie pozwala na postawienie ostatecznej diagnozy [6, 42]. Z tego też powodu konieczne jest wykonywanie testu potwierdzającego drugiego stopnia, którym jest Western blot, charakteryzujący się dużo większą specyficznością. Związane jest to z możliwością rozróżnienia poszczególnych pasm białkowych. W celu osiągnięcia jak najlepszej użyteczności diagnostycznej w teście WB wytypowano najbardziej reaktywne i charakterystyczne antygeny znajdujące się w lizacie komórkowym krętków. Ustalono, że dla wykrywania przeciwciał klasy IgM, najbardziej wiarygodne są testy, w których pod uwagę bierze się trzy pasma antygenowe (p23 [OspC], p39 [BmpA] i p41 [FlaB]). Taki test interpretowany jest jako pozytywny, gdy zareagują co najmniej dwa z nich [16]. Natomiast do wykrywania przeciwciał IgG, najlepszą specyficzność i czułość otrzymuje się biorąc pod uwagę 10 różnych antygenów (tj. p18 [DbpA], p23 [OspC], p28, p30, p39 [BmpA], p41 [FlaB], p45, p58 [fragment białka Hsp60], p66 i p93). Test jest określany jako dodatni, gdy pojawi się co najmniej 5 z 10 oczekiwanych pasm [14, 55].

4. Problemy w serodiagnostyce boreliozy

Mimo, że to diagnostyka serologiczna stanowi podstawę w rozpoznaniu boreliozy nie jest ona wolna od problemów, z którymi codziennie boryka się wiele laboratoriów diagnostycznych. Czułość tej metody w dużym stopniu zależy od czasu trwania choroby. Jako pierwsze w organizmie żywiciela pojawiają się przeciwciała klasy IgM, ma to miejsce po około 2 tygodniach od zakażenia, natomiast produkcja przeciwciał klasy IgG rozpoczyna się zwykle po 3–6 tygodniach i w miarę rozwoju choroby zastępują one przeciwciała klasy IgM. Jednak nie u wszystkich pacjentów swoiste immunoglobuliny IgM zanikają w ciągu kilku miesięcy od momentu infekcji. W niektórych przypadkach utrzymują się one we krwi nawet przez kilkanaście lat. Dodatkowo przeciwciała IgM mogą być wykrywane zarówno podczas reaktywacji choroby oraz w przypadku ponownego zakaże-

nia *B. burgdorferi* s.l. Dlatego też odróżnienie świeżej infekcji od przewlekłej jedynie w oparciu o stwierdzenie obecności swoistych IgM jest niemożliwe [1, 21].

Z powodu czasu koniecznego na wytworzenie przez organizm swoistych przeciwciał w pierwszym etapie infekcji (tzw. okienko serologiczne) wyniki badań serologicznych są często negatywne [13, 37, 72]. Tylko u 10–50% pacjentów z wczesną boreliozą (EM występującym krócej niż 7 dni) są wykrywalne przeciwciała skierowane przeciwko *B. burgdorferi* s.l. W miarę trwania infekcji odpowiedź immunologiczna stopniowo dojrzewa, w wyniku czego czułość testów serologicznych podczas późniejszych stadiów choroby znacząco wzrasta. W przypadkach późnej fazy choroby swoiste przeciwciała IgG są wykrywane niemal u wszystkich badanych pacjentów [30, 31, 79].

Kolejnym z ograniczeń jest różny wzór ekspresji genów krętka w kleszczu i w organizmie ssaka [24]. Dodatkowo różnorodność białek powierzchniowych jest zwiększana poprzez zjawisko zmienności antygenowej, które jest jednym ze sposobów unikania odpowiedzi immunologicznej przez *B. burgdorferi* s.l. Oznacza to, że przeciwciała swoiste dla jednej postaci antygeny nie będą reagować z innymi jego wariantami [56].

Innym problemem jest uzyskanie lizatów komórkowych, zawierających wszystkie najbardziej immunogenne antygeny, ponieważ geny kodujące niektóre z nich ulegają ekspresji jedynie *in vivo* [24, 65]. Dodatkowo produkcja niektórych białek zanika poprzez utratę kodujących je plazmidów w wyniku wielokrotnego pasażowania. Skład antygenowy lizatów komórkowych zależy również od fazy wzrostu krętków w jakim zostały one zebrane. Wyżej wymienione czynniki są powodem problemów związanych ze standaryzacją natywnych preparatów antygenowych, co znacząco wpływa na powtarzalność wyników uzyskiwanych z wykorzystaniem testów diagnostycznych na nich opartych [13, 43, 56, 62].

Ogromna różnorodność genogatunków zaliczanych do kompleksu *B. burgdorferi* s.l. również nie pozostaje bez wpływu na skuteczność obecnej diagnostyki boreliozy. Sekwencje aminokwasowe większości najbardziej immunogennych białek są nisko zakonserwowane wśród *B. burgdorferi* s.l., a co za tym idzie wykorzystanie w serodiagnostyce jako preparatów antygenowych lizatów komórkowych jednego genogatunku niesie ze sobą ryzyko uzyskania wyniku fałszywie ujemnego. Problem ten w szczególności dotyczy Europy, gdzie występuje aż 5 patogennych dla ludzi przedstawicieli *B. burgdorferi* s.l. Jego rozwiązaniem mogłoby być wykorzystanie w pojedynczym teście diagnostycznym lizatów komórkowych kilku genogatunków. Zwiększyłoby to czułość stosowanych testów, jednakże spowodowałoby również znaczący wzrost kosztów rutynowej diagnostyki [45, 78].

Komórki *B. burgdorferi* s.l. wytwarzają wiele białek, które są homologiczne wśród drobnoustrojów, co jest przyczyną występowania częstych reakcji krzyżowych. Do antygenów tych zaliczają się wszechobecne białka szoku termicznego oraz flagelina, która jest białkiem budującym wici. Fałszywie dodatnie wyniki można otrzymać w przypadku pacjentów zakażonych takimi patogenami jak: wirus Epsteina-Barr, *Treponema pallidum*, *Borrelia hermsii*, *Borrelia recurrentis*, cytomegalowirus oraz cierpiących na reumatoidalne zapalenie stawów [6, 30, 43].

5. Wykorzystanie białek rekombinantowych i peptydów syntetycznych w diagnostyce boreliozy

Intensywny rozwój metod biologii molekularnej i inżynierii genetycznej umożliwił otrzymywanie antygenów rekombinantowych, które stanowią nowe narzędzia diagnostyczne. Antygeny rekombinantowe są to białka wytwarzane metodami biotechnologicznymi, które mogą zawierać dodatkowe domeny fuzyjne wpływające na ich rozpuszczalność lub umożliwiające ich łatwiejsze oczyszczanie czy detekcję. Białka takie stanowią alternatywne źródło antygenów, które można wykorzystać do opracowania nowych testów serologicznych. Jednakże, aby testy serodiagnostyczne oparte na białkach rekombinantowych miały jak największą skuteczność należy wykorzystać w nich starannie wyselekcjonowane antygeny lub ich fragmenty. Dostępne w bazach danych sekwencje aminokwasowe białek *B. burgdorferi* s.l. oraz narzędzia bioinformatyczne umożliwiają wytypowanie najbardziej immunogennych oraz zakonserwowanych fragmentów poszczególnych antygenów. Wykorzystanie jedynie wyselekcjonowanych fragmentów białek może zdecydowanie ograniczyć częstość występowania reakcji krzyżowych, co znacznie ułatwi interpretację wyników testów serologicznych, ponadto biotechnologiczna produkcja antygenów może pozwolić na otrzymanie preparatów antygenowych zawierających białka wytwarzane przez krętki jedynie *in vivo*. Inną możliwością jest wykorzystanie w pojedynczym teście diagnostycznym białek pochodzących od kilku genogatunków *B. burgdorferi* s.l. Bardzo prawdopodobne jest, iż takie podejście umożliwi prawidłowe rozpoznanie boreliozy, bez względu na to jakim genogatunkiem *B. burgdorferi* s.l. nastąpiło zakażenie. Łatwiejszą standaryzację oraz większą skuteczność testów można osiągnąć konstruując antygeny chimeryczne, które powstają na skutek połączenia dwóch lub większej liczby genów w jeden gen fuzyjny. Ekspresja genu fuzyjnego prowadzi do powstania produktu chimerycznego, który łączy cechy białek kodowanych przez pojedyncze geny będące częścią takiego połączenia.

W związku z dużymi nadziejami jakie pokłada się w zastosowaniu antygenów rekombinantowych

i chimerycznych laboratoria na całym świecie prowadzą badania naukowe dotyczące oceny przydatności tych białek w rozpoznaniu różnych faz boreliozy (Tab. III). Obecnie na rynku dostępne są testy ELISA III generacji (zestawy diagnostyczne *Borrelia* IgM oraz *Borrelia* IgG firmy Biomedica, *Borrelia burgdorferi* IgG Recombinant Antigens firmy GenWay Biotech) oraz testy Immuno-

blot i Line Immunoblot (EUROLINE *Borrelia* firmy Euroimmun, *recomLine Borrelia* IgG i *recomLine Borrelia* IgM firmy Microgen Diagnostic) oparte na antygenach rekombinantowych [27, 45].

W licznych laboratoriach na całym świecie prowadzone są badania mające na celu stworzenia jednoetapowego testu diagnostycznego, opartego na tańszej

Tabela III
Użyteczność białek rekombinantowych w diagnostyce boreliozy

Nazwa białka	Pochodzenie preparatu antygenowego	Test diagnostyczny	Wyniki	Źródło
VlsE (<i>B. burgdorferi</i> s.s. B31)	Priokariotyczny system ekspresyjny Tabora-Studiera; komórki <i>E. coli</i> szczep BL21	IgG ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Czulość niezależnie od czasu trwania choroby: 66% (184/280)* • Czulość w fazie wczesnej (EM): 44% (35/80)* • Czulość w fazie wczesnej po leczeniu: 59% (63/106)* • Czulość w fazie wczesnej rozsianej (wczesna NB): 100% (15/15)* • Czulość w fazie wczesnej rozsianej (wczesna NB) po leczeniu: 64% (7/11)* • Czulość w fazie późnej (LA): 97% (32/33)* • Czulość w fazie późnej (LA) po leczeniu: 88% (21/24)* • Czulość w fazie późnej (NB): 100% (11/11)* • Specyficzność: 99% (6/553)* 	[4]
		IgM ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Czulość niezależnie od czasu trwania choroby: 36% (102/280)* • Czulość w fazie wczesnej (EM): 19% (15/80)* • Czulość w fazie wczesnej po leczeniu: 43% (46/106)* • Czulość w fazie wczesnej rozsianej (wczesna NB): 73% (11/15)* • Czulość w fazie wczesnej rozsianej (wczesna NB) po leczeniu: 55% (6/11)* • Czulość w fazie późnej (LA): 39% (13/33)* • Czulość w fazie późnej (LA) po leczeniu: 42% (10/24)* • Czulość w fazie późnej (NB): 9% (1/11)* • Specyficzność: 99% (6/553)* 	[4]
pepC6	Synteza chemiczna	IgM/IgG ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Czulość w fazie wczesnej zlokalizowanej: 74% (29/39)* • Czulość po leczeniu: 90% (35/39)* • Czulość w fazie wczesnej rozsianej (wczesna NB): 95% (19/20)* • Czulość w fazie późnej (LA): 100% (49/49)* • Czulość w fazie późnej (NB): 100% (10/10)* • Specyficzność: 99% (2/176)* 	[43]
pepC6	Synteza chemiczna	IgM/IgG ELISA (test komercyjny)	<ul style="list-style-type: none"> • Czulość niezależnie od czasu trwania choroby: 75% (426/569)* • Czulość w fazie wczesnej (EM): 66,5% (268/403)* • Czulość w fazie wczesnej rozsianej (wczesna NB): 88,6% (39/44)* • Czulość w fazie późnej (NB): 100% (8/8)* • Czulość w fazie późnej (LA): 98,2% (112/114)* • Specyficzność: 99,5% (2/366)* 	[80]
DbpA (<i>B. burgdorferi</i> s.s. ia)	Prokariotyczny system ekspresyjny Tabora-Studiera; komórki <i>E. coli</i> szczep M15	IgG ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Czulość w fazie późnej (NB): 43% (6/14)* • Czulość w fazie późnej (LA): 60% (9/15)* 	[32]
DbpA (<i>B. afzelii</i> A91)	Prokariotyczny system ekspresyjny Tabora-Studiera; komórki <i>E. coli</i> szczep M15	IgG ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Czulość w fazie późnej (NB): 50% (7/14)* • Czulość w fazie późnej (LA): 80% (12/15)* 	[32]
DbpA (<i>B. garinii</i> 40)	Prokariotyczny system ekspresyjny Tabora-Studiera; komórki <i>E. coli</i> szczep M15	IgG ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Czulość w fazie późnej (NB): 50% (7/14)* • Czulość w fazie późnej (LA): 20% (3/15)* 	[32]

Tabela III. C.d.

Nazwa białka	Pochodzenie preparatu antygenowego	Test diagnostyczny	Wyniki	Źródło
OspC (<i>B. burgdorferi</i> s.s. 297)	Prokariotyczny system ekspresyjny Tabora-Studiera; komórki <i>E. coli</i> szczep SR2	IgM ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Czulość w fazie wczesnej (zlokalizowana i rozsiana): 53% (40/75)* • Czulość w fazie wczesnej zlokalizowanej: 25% (4/16)* • Czulość w fazie wczesnej rozsianej: 61% (36/59)* • Czulość w fazie wczesnej (zlokalizowana i rozsiana) po leczeniu: 73% (55/75)* • Czulość w fazie późnej (zapalenie opon mózgowych lub porażenie twarzy): 72% (29/40)* • Czulość w fazie późnej (LA): 45% (22/49)* • Czulość w fazie późnej (NB): 20% (5/25)* • Specyficzność: 98% (2/106)* 	[20]
		IgG ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Czulość w fazie wczesnej (zlokalizowana i rozsiana): 33% (25/75)* • Czulość w fazie wczesnej zlokalizowanej: 31% (5/16)* • Czulość w fazie wczesnej rozsianej: 34% (20/59)* • Czulość w fazie wczesnej (zlokalizowana i rozsiana) po leczeniu: 49% (37/75)* • Czulość w fazie późnej (zapalenie opon mózgowych lub porażenie twarzy): 65% (26/40)* • Czulość w fazie późnej (LA): 84% (41/49)* • Czulość w fazie późnej (NB): 36% (9/25)* • Specyficzność: 86% (15/106)* 	[20]
OspC (<i>B. afzelii</i> A91)	Prokariotyczny system ekspresyjny Tabora-Studiera; komórki <i>E. coli</i> szczep M15	IgM ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Czulość w fazie wczesnej: 65% (11/17)* • Czulość po leczeniu: 65% (11/17)* 	[60]
		IgG ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Czulość w fazie wczesnej: 53% (9/17)* • Czulość po leczeniu: 71% (12/17)* 	[60]
OspC (<i>B. garinii</i> 40)	Prokariotyczny system ekspresyjny Tabora-Studiera; komórki <i>E. coli</i> IgG szczep M15	IgM ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Czulość w fazie wczesnej: 41% (7/17)* • Czulość po leczeniu: 47% (8/17)* 	[60]
		ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Czulość w fazie wczesnej: 18% (3/17)* • Czulość po leczeniu: 36% (6/17)* 	[60]
OspC (<i>B. burgdorferi</i> s.s. ia)	Prokariotyczny system ekspresyjny Tabora-Studiera; komórki <i>E. coli</i> szczep M15	IgM ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Czulość w fazie wczesnej: 12% (2/17)* • Czulość po leczeniu: 18% (3/17)* 	[60]
		IgG ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Czulość w fazie wczesnej: 6% (1/17)* • Czulość po leczeniu: 6% (1/17)* 	[60]
pepC10	Synteza chemiczna	IgM ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Czulość niezależnie od czasu trwania choroby: 38% (107/280)* • Czulość w fazie wczesnej (EM): 40% (32/80)* • Czulość w fazie wczesnej rozsianej (wczesna NB): 53% (8/15)* • Czulość w fazie wczesnej rozsianej (wczesna NB) po leczeniu: 36% (4/11)* • Czulość w fazie późnej (LA): 9% (3/30)* • Czulość w fazie późnej (LA) po leczeniu: 10% (2/22)* • Czulość w fazie późnej (NB): 18% (2/9)* • Specyficzność: 99% (6/553)* 	[4]
pepC10	Synteza chemiczna	IgM ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Czulość w fazie wczesnej (EM): 41,2 % (40/97)* • Czulość w fazie późnej: 10% (2/20)* 	[3]
		IgG ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Czulość w fazie wczesnej (EM): 16,3 % (16/97)* • Czulość w fazie późnej: 10% (2/20)* 	[3]
OspC1	Synteza chemiczna	IgM ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Czulość w fazie wczesnej (EM): 48,5% (47/97)* • Czulość w fazie późnej: 15% (3/20)* 	[3]
		IgG ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Czulość w fazie wczesnej (EM): 24,5% (24/97)* • Czulość w fazie późnej: 25% (5/20)* 	[3]

Tabela III. C.d.

Nazwa białka	Pochodzenie preparatu antygenowego	Test diagnostyczny	Wyniki	Źródło
OspA-p93 (62 kDa) (<i>B. burgdorferi</i> s.s. B31)	Prokariotyczny system ekspresyjny Tabora-Studiera; komórki <i>E. coli</i> szczep BL21(DE3) pLysS lub B834 (DE3)	IgM/IgG ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Czulość w fazie wczesnej: 10% (2/20)* • Czulość w fazie późnej: 56% (9/16)* 	[28]
OspA-p93 (97 kDa) (<i>B. burgdorferi</i> s.s. B31)	Prokariotyczny system ekspresyjny Tabora-Studiera; komórki <i>E. coli</i> szczep BL21(DE3) pLysS lub B834 (DE3)	IgM/IgG ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Czulość w fazie wczesnej: 50% (49/99)* • Czulość w fazie późnej: 89% (47/53)* • Specyficzność w przypadku choroby autoimmunologicznej (reumatoidalne zapalenie stawów/toczeń rumieniowaty układowy): 97% (1/40)* • Specyficzność w przypadku kiły: 78% (6/27)* • Specyficzność w przypadku ludzi zdrowych z terenów endemicznych: 85% (3/20)* • Specyficzność w przypadku ludzi zdrowych z terenów nieendemicznych: 100% (0/20)* 	[28]
OspB-Fla (43 kDa) (<i>B. burgdorferi</i> s.s. B31)	Prokariotyczny system ekspresyjny Tabora-Studiera; komórki <i>E. coli</i> szczep BL21(DE3) pLysS lub B834 (DE3)	IgM/IgG ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Czulość w fazie wczesnej 28% (11/47)* • Czulość w fazie późnej: 48% (10/21)* 	[28]
OspB-OspC-Fla (64 kDa) (<i>B. burgdorferi</i> s.s. B31)	Prokariotyczny system ekspresyjny Tabora-Studiera; komórki <i>E. coli</i> szczep BL21 (DE3) pLysS lub B834 (DE3)	IgM/IgG ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • Czulość fazy wczesnej: 62% (86/139)* • Czulość w fazie późnej: 87% (60/69)* • Specyficzność w przypadku choroby autoimmunologicznej (reumatoidalne zapalenie stawów/toczeń rumieniowaty układowy): 92% (4/50)* • Specyficzność w przypadku kiły: 93% (4/56)* • Specyficzność w przypadku ludzi zdrowych z terenów endemicznych: 84% (5/30)* • Specyficzność w przypadku ludzi zdrowych z terenów nieendemicznych: 100% (0/28)* 	[28]

* (liczba surowic seropozytywnych / liczba surowic przebadanych)

i łatwiejszej w interpretacji technice ELISA. Nowe narzędzia diagnostyczne jakimi są antygeny rekombinantowe i białka chimeryczne rozbudzają nadzieję na osiągnięcie tego celu. Jednak aby takie testy wykazywały się wysoką czułością i specyficznością należy wykorzystać w nich starannie wyselekcjonowane antygeny lub ich fragmenty. W związku z tym wielu naukowców prowadzi badania naukowe mające na celu przetestowanie skuteczności testów serodiagnostycznych opartych na poszczególnych antygenach *B. burgdorferi* s.l. lub ich fragmentach.

Antygen VlsE ze względu na swoją wyjątkowo silną immunogenność oraz obecność w sekwencji zakonserwowanego fragmentu, był obiektem zainteresowania wielu naukowców. W badaniach przeprowadzonych przez Bacon i wsp. ogólna czulość (niezależnie od czasu trwania infekcji) testów IgG ELISA opartych wyłącznie na antygenie VlsE (ELISA VlsE) wynosiła

66%. Nie był to wynik znacznie odbiegający od tego uzyskanego przy pomocy standardowego testu dwuetapowego (STD 68%). Gdy uwzględniono podział na fazy choroby, wykazano, że czulość testu IgG ELISA VlsE w przypadku pacjentów, u których EM występował od tygodnia, wynosiła zaledwie 16%, za to wzrastała ona znacząco pomiędzy 2 i 4 tygodniem od zakażenia osiągając w tym przedziale czasowym 61%. Podczas późnej fazy choroby testy IgG ELISA VlsE charakteryzowały się niemalże 100% czułością, a specyficzność utrzymywała się na poziomie 98% (90–100% w zależności od grupy kontrolnej pacjentów). W przypadku zastosowania testu ELISA VlsE do wykrywania przeciwciał klasy IgM uzyskano niższą czulość oznaczenia wynoszącą 36%, test ten był również mniej skuteczny w przypadku wykrywania swoistych immunoglobulin w surowicach pacjentów z chorobą trwającą od 2 do 4 tygodni (32%). Natomiast w przypadku wykrywania

choroby u pacjentów z EM trwającym od tygodnia, czułość tego testu była skrajnie niska i wynosiła zaledwie 3%. Specyficzność testów IgM ELISA VlsE wynosiła 99%, a więc była nieznacznie wyższa niż w przypadku wykrywania swoistych przeciwciał IgG [4].

Skuteczność pojedynczych testów IgG i IgM ELISA wykorzystujących syntetyczny 26-aminokwasowy peptyd, którego sekwencja oparta jest na regionie IR6 umiejscowionym w obrębie genu *vlsE* została oceniona przez Liang i wsp. (1999). Zespół ten przebadał surowice pobrane od pacjentów we wczesnej fazie choroby, po antybiotykoterapii oraz w fazie przewlekłej. Czułość testów IgM/IgG ELISA C6 we wczesnej fazie choroby wynosiła 74%, w fazie późnej wzrastała do 100%, a dla pacjentów po antybiotykoterapii osiągała 90%. Aby ocenić swoistość testu IgM/IgG ELISA C6 zbadano próby surowicy pobrane od pacjentów z innymi zakażeniami wywołanymi przez krętki, przewlekłymi chorobami autoimmunologicznymi lub chorobami neurologicznymi oraz od osób hospitalizowanych z terenów gdzie choroba z Lyme nie jest endemiczna. Dla tych surowic ogólna specyficzność przeprowadzonych testów ELISA wyniosła 99% [43]. Ponadto, w 2013 roku Wormser i wsp. przeprowadzili badania porównawcze między dostępnym na rynku amerykańskim testem C6 Lyme ELISA kit (Immunitics, Boston, MA, USA), a STD. Wykazano, iż ogólna czułość testu komercyjnego (bez względu na podział na fazy choroby) wynosiła 75%, co znacznie przewyższało czułość STD (50,6%), wykonanego na puli tych samych surowic. Tak duża różnica była wynikiem znacznie wyższej czułości C6 Lyme ELISA kit w przypadku badania surowic pobranych od pacjentów z EM – test komercyjny osiągał skuteczność na poziomie 66,5%, podczas gdy czułość STD wynosiła zaledwie 34,5%. W późnej fazie boreliozy czułość obu testów wzrosła do niemal 100%, jednak test ELISA C6 wciąż wykazał się nieznacznie wyższą skutecznością. Gdy dokonano porównania specyficzność obu testów, wynosiła ona 99,5% dla testu komercyjnego oraz 98,9% dla STD [80].

Kolejnym antygenem, silnie stymulującym produkcję przeciwciał IgG, jest białko DbpA, które cechuje się wysokim zróżnicowaniem sekwencji aminokwasowej wśród genogatunków *B. burgdorferi* s.l. W celu oszacowania wpływu niskiego stopnia zakonserwowania sekwencji niniejszego białka na wyniki otrzymywanych badań serodiagnostycznych wyprodukowano trzy warianty antygeny DbpA pochodzące od patogennych dla ludzi genogatunków *B. burgdorferi* s.l. występujących powszechnie w Europie (DbpA_{bia} – *B. burgdorferi* s.s. ia, DbpA_{a91} – *B. afzelii* A91, DbpA_{g40} – *B. garinii* 40) [32]. Otrzymane preparaty białek rekombinantowych wykorzystane zostały następnie jako podstawa testów immunoenzymatycznych fazy stałej. Przeprowadzone testy ELISA wykazały, iż wszystkie surowice pobrane

od pacjentów cierpiących na neuroboreliozę zawierały przeciwciała swoiste przynajmniej wobec jednego wariantu antygeny DbpA (ogólna czułość 100%). Czułością na poziomie 50% cechowały się testy ELISA oparte na białku DbpA_{a91}, taki sam wynik osiągnięto dla testu ELISA wykorzystującego antygen DbpA_{g40}. Najniższą czułością, na poziomie 43%, w wykrywaniu NB wykazywały się testy ELISA oparte na antygenie DbpA pochodzącym z *B. burgdorferi* s.s. ia. Ogólna skuteczność tych samych testów w przypadku pacjentów z LA była nieco niższa i wynosiła 93%. Tutaj również testy ELISA wykorzystujące białko DbpA_{a91} cechowały się najwyższą czułością (80%), jednak w przeciwieństwie do surowic pobranych od pacjentów z NB w tym przypadku najmniej efektywnym testem był ten oparty na antygenie DbpA pochodzącym od *B. garinii* 40 (20%), którego skuteczność była znacznie niższa niż testu ELISA wykorzystującym DbpA_{bia} (60%). Immunoglobuliny zawarte w surowicach pobranych od chorych w większości przypadków reagowały tylko z jednym z wariantów DbpA, a reakcje krzyżowe pomiędzy białkami były bardzo rzadkie. U pacjentów z wczesną fazą choroby (EM), czułość testów IgG lub IgM ELISA wykorzystujących różne warianty antygeny DbpA była bardzo niska, na poziomie kilku-kilkunastu procent [32].

Dane literaturowe dotyczące skuteczności testów opartych na antygenie OspC w diagnostyce wczesnej boreliozy są bardzo rozbieżne. Przeciwciała klasy IgM przeciwko OspC obserwowano u 25–80% pacjentów z EM [20, 23, 46, 47, 51, 58] oraz u 48–72% pacjentów z NB [20, 51]. Badania wykonane przez Fung i wsp. (1994) wykazują, że prawdopodobnie nawet do 50% pacjentów rozwija odpowiedź przeciwciał klasy IgM skierowaną przeciwko antygenowi OspC w pierwszym tygodniu od zakażenia, a podczas fazy wczesnej rozsianej odsetek ten wzrasta do 60%. Po upływie 2 miesięcy immunoglobuliny te można wykryć w surowicach 60–70% pacjentów [20]. Naukowcy przypuszczają, że rozbieżności te wynikają z wyjątkowo niskiego stopnia zakonserwowania sekwencji antygeny OspC wśród genogatunków. Przeciwciała zawarte w surowicach mogą rozpoznawać epitopy białka ze zróżnicowaną skutecznością w zależności od użytego w teście wariantu antygeny. W celu zweryfikowania tej hipotezy Panelius i wsp. (2002) wykonali testy IgM i IgG ELISA, gdzie każdy z nich oparty był na białku OspC pochodzącym z innego genogatunku *B. burgdorferi* s.l. (*B. afzelii* A91, *B. garinii* 40, *B. burgdorferi* s.s. ia). Jak się spodziewano otrzymano znaczące różnice w czułości testów, w których do wykrywania swoistych przeciwciał zastosowano różne białka OspC. Największą skutecznością wykazywał się test ELISA wykorzystujący białko OspC pochodzące z *B. afzelii* A91. Testy te miały znaczną przewagę bez względu na to jaką klasę przeciwciał wykrywano oraz czy badano surowice pochodzące od

pacjentów we wczesnej fazie choroby czy od tych będących po antybiotykoterapii. Drugim co do skuteczności testem był ten wykorzystujący białko OspC pochodzące od *B. garinii* 40. Najmniej obiecujące wyniki uzyskano dla testu ELISA opartego na białku OspC pochodzącym z *B. burgdorferi* s.s. ia, co jest zrozumiałe ponieważ ten genogatunek jest najmniej rozpowszechniony w Europie [60]. W celu rozwiązania problemów związanych z wysokim zróżnicowaniem antygeny OspC wśród genogatunków *B. burgdorferi* s.l., naukowcy przeprowadzili porównanie sekwencji aminokwasowych wyżej wspomnianego białka. W wyniku tej analizy wyodrębniono dwa zakonserwowane fragmenty antygeny OspC, zlokalizowane na jego końcach. Badania Bacon i wsp. (2003) wykazały, że testy IgM ELISA oparte na peptydzie C10 (pepC10, obejmuje 10 aminokwasów z C-końca białka) są skuteczniejsze w wykrywaniu wczesnej fazy choroby niż STD. Czułość testów IgM ELISA pepC10 u pacjentów z EM trwającym nie dłużej niż tydzień była na poziomie 27%. Wzrastała ona w miarę dojrzewania odpowiedzi immunologicznej osiągając 55% w przypadku surowic pobranych od pacjentów w ciągu 2–4 tygodni od wystąpienia EM [4]. Natomiast Arnaldi i wsp. (2013) wykazali, że testy IgM ELISA oparte na peptydzie OspC1 (20 N-końcowych aminokwasów) wykrywały wczesną boreliozę z czułością 48,5% i specyficznością na poziomie 100%. Zarówno testy IgG ELISA wykorzystujące pepC10 jak i OspC1 wykazywały się znacznie niższą czułością niż te bazujące na wykrywaniu przeciwciał klasy IgM. Czułość testów IgG ELISA OspC1 wynosiła około 25%, natomiast dla testów IgG ELISA pepC10 spadła ona do zaledwie 15%. Uzyskane wyniki pozwoliły na wysnucie wniosku, iż to peptyd OspC1 charakteryzuje się wyższą skutecznością w serodiagnostyce wczesnej boreliozy [3].

Wiele wyników wskazuje na to, iż ciężko otrzymać czuły i specyficzny test immunodiagnostyczny wykorzystujący jedynie pojedynczy antygen. Dlatego też naukowcy próbowali udoskonalić testy diagnostyczne konstruując tzw. białka chimeryczne. W 2000 roku Gomes-Solecki i wsp. skonstruowali 17 białek chimerycznych złożonych z fragmentów antygenów powierzchniowych takich jak: OspA, OspB, OspC, flageliny (FlaB) i białka 93 kDa (p93). Do konstrukcji chimer wykorzystano głównie fragmenty antygenów pochodzące od *B. burgdorferi* s.s. B31, jednak niektóre z nich zawierały sekwencje uzyskane od *B. afzelii* Pko oraz *B. garinii* K48. Po wstępnej selekcji, za pomocą testów WB z wszystkich wyprodukowanych antygenów chimerycznych wytypowano cztery najbardziej obiecujące do dalszych testów serologicznych. Były to białka chimeryczne: OspB-Fla (43 kDa), OspB-OspC-Fla (64 kDa), OspA-p93 (62 kDa) i OspA-p93 (97 kDa). Przydatność skonstruowanych białek chimerycznych oceniono wykonując testy IgM/IgG ELISA. Najbar-

dziej skuteczny w wykrywaniu wczesnej boreliozy był test ELISA wykorzystujący antygen OspB-OspC-Fla (62%). Charakteryzował się on również wysoką czułością w wykrywaniu późnej boreliozy (87%), jednak w tej fazie choroby najskuteczniejszym okazał się test ELISA oparty o białko OspA-p93 (97 kDa) (89%). Badania te wykazały jak ogromny wpływ na skuteczność w wykrywaniu swoistych przeciwciał ma dobór odpowiednich fragmentów białek do tworzenia chimer. Doskonale pokazuje to przykład testów ELISA opartych na białkach chimerycznych OspA-p93 (62 kDa) i OspA-p93 (97 kDa) (różniących się wielkością fragmentu antygeny p93), które charakteryzowały się odmienną czułością w wykrywaniu wczesnej jak i późnej choroby z Lyme. W celu określenia specyficzności testów ELISA opartych na wyżej wymienionych białkach chimerycznych wykorzystano surowice pacjentów cierpiących na kiłę i choroby autoimmunologiczne (reumatoidalne zapalenie stawów lub układowy toczeń rumieniowaty), a także surowice zdrowych ludzi z obszarów, na których choroba ta jest endemiczna oraz z terenów gdzie *B. burgdorferi* s.l. nie występuje. Wspomniane antygeny nie dawały reakcji krzyżowych z próbami surowic pacjentów zamieszkujących obszar, na których borelioza nie występuje endemicznie. Niestety uzyskiwano wyniki fałszywie dodatnie w przypadku surowic pacjentów cierpiących na kiłę, choroby autoimmunologiczne oraz zamieszkujących tereny występowania *B. burgdorferi* s.l. [28].

6. Podsumowanie

Rozpoznanie boreliozy jedynie na podstawie obrazu klinicznego, ze względu na jej zróżnicowaną postać, jest niezmiernie trudne, bądź często nawet niemożliwe. Z tego powodu główną rolę w diagnostyce choroby z Lyme odgrywają badania laboratoryjne. W ich zakresie w ciągu ostatnich lat nastąpił ogromny postęp. Dotyczy to w szczególności metod serologicznych, w których do wykrywania swoistych przeciwciał w surowicach pacjentów wykorzystuje się biotechnologicznie produkowane antygeny rekombinantowe. Ten intensywny rozwój zawdzięczamy nowym rozwiązaniom wykorzystywanym w inżynierii genetycznej, dzięki którym udało się stworzyć wydajne eukariotyczne i prokariotyczne systemy ekspresji genów. Umożliwiło to łatwe otrzymywanie białek rekombinantowych i chimerycznych stanowiących nowe, obiecujące narzędzia diagnostyczne, będące podstawą do opracowania lepszych testów. Z racji tego, iż czułość dostępnych testów serologicznych w wykrywaniu późnej boreliozy (LA, ACA, NB) jest zadowalająca, głównym celem naukowców jest poprawa skuteczności metod serodiagnostycznych wykorzystywanych w rozpoznawaniu wczesnego

etapu choroby z Lyme. Być może pozwoli na to wykorzystanie w testach immunodiagnostycznych starannie wyselekcjonowanych antygenów lub ich fragmentów. Dzięki opracowaniu nowych testów, które umożliwią wczesną i prawidłową identyfikację zakażenia krętkiem, pacjenci szybko zostaną poddani odpowiedniej terapii, co znacznie może ograniczyć rozwój późnych postaci boreliozy. Również ważne jest zwiększenie specyficzności przesiewowych testów ELISA, które obecnie często dają wyniki wątpliwe lub fałszywie dodatnie. Dodatkowo ograniczenie liczby wykonywanych testów potwierdzających WB, znacznie obniżyłoby koszty diagnostyki boreliozy. Wiele czynników wskazuje, że najlepszym rozwiązaniem w rutynowej diagnostyce choroby z Lyme byłoby opracowanie jednoetapowego testu ELISA. Ma on znaczącą przewagę nad WB ze względu na łatwiejszą standaryzację, niższy koszt oraz zdolność ilościowego wykrywania swoistych przeciwciał w próbach pobranych od pacjenta. Niestety wiele doniesień literaturowych wskazuje, iż aby osiągnąć ten cel nie będą wystarczające testy diagnostyczne oparte jedynie na pojedynczych antygenach rekombinantowych, ponieważ ich czułość i specyficzność ze względu na niski stopień zakonserwowania sekwencji wśród genogatunków *B. burgdorferi* s.l. nie jest zadowalająca. Rozwiązaniem może być zastosowanie mieszanek odpowiednich białek rekombinantowych pochodzących od kilku genogatunków krętka lub opracowanie preparatów antygenowych nowej generacji tj. białek chimericznych złożonych z dobrze wyselekcjonowanych fragmentów różnych antygenów. Liczne prace w tej tematyce dają nadzieję, na opracowanie skuteczniejszych testów diagnostycznych opartych na antygenach otrzymywanych metodami biotechnologicznymi.

Piśmiennictwo

1. Agüero-Rosenfeld M.E., Nowakowski J., Bittker S., Cooper D., Nadelman R.B., Wormser G.P.: Evolution of the serologic response to *Borrelia burgdorferi* in treated patients with culture-confirmed erythema migrans. *Microbiology*, **34**, 1–9 (1996)
2. Agüero-Rosenfeld M.E., Wang G., Schwartz I., Wormser G.P.: Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 484–509 (2005)
3. Arnaboldi P.M., Seedarnee R., Sambir M., Callister S.M., Imperato J.A., Dattwyler R.J.: Outer surface protein C peptide derived from *Borrelia burgdorferi* sensu stricto as a target for serodiagnosis of early Lyme disease. *Clin. Vaccine Immunol.* **20**, 474–481 (2013)
4. Bacon R.M., Biggerstaff B.J., Schriefer M.E., Gilmore R.D., Philipp M.T., Steere A.C.: Serodiagnosis of Lyme disease by kinetic enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant VlsE1 or peptide antigens of *Borrelia burgdorferi* compared with 2-tiered testing using whole-cell lysates. *J. Infect. Dis.* **187**, 1187–1199 (2003)
5. Barbour A.G., Hayes S.F.: Biology of *Borrelia* species. *Microbiol. Rev.* **50**, 381–400 (1986)
6. Bruckbauer H.R., Preac-Mursic V., Fuchs R., Wilske B.: Cross-reactive proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **11**, 224–232 (1992)
7. Burgdorfer W., Barbour A.G., Hayes S.F., Benach J.L., Grunwaldt E., Davis J.P.: Lyme disease – a tick-borne spirochetosis? *Science*, **216**, 1317–1319 (1982)
8. Carrasco S.E., Troxell B., Yang Y., Brandt S.L., Li H., Sandusky G.E., Yang X.F.: Outer surface protein OspC is an antiphagocytic factor that protects *Borrelia burgdorferi* from phagocytosis by macrophages. *Infect. Immun.* **83**, 4848–4860 (2015)
9. Casjens S.R., Palmer N., Van Vugt R., Huang W., Stevenson B., Rosa P., Haft D.: A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* **35**, 490–516 (2000)
10. Casjens S.R., Gilcrease E.B., Vujadinovic M., Mongodin E.F., Luft B.J., Schutzer S.E., Qiu W.G.: Plasmid diversity and phylogenetic consistency in the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi*. *BMC Genom.* **18**, 1–18 (2017)
11. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for test performance and interpretation from the Second National Conference on Serological Diagnosis of Lyme Disease. *Morb. Mortal. Wkly. Re.* **44**, 590–591 (1995)
12. van Dam A.P., Kuiper H., Vos K., Widjojokusumo A., de Jongh B.M., Spanjaard L., Dankert J.: Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clin. Infect. Dis.* **17**, 708–717 (1993)
13. Dessau R.B., Strle F. i wsp.: To test or not to test? Laboratory support for the diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Infect.* **24**, 118–124 (2018)
14. Dressler F., Whalen J.A., Reinhardt B.N., Steere A.C.: Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *J. Infect. Dis.* **167**, 392–400 (1993)
15. Eiffert H.F., Hanefeld R., Thomssen H., Christen J.: Reinfection in Lyme borreliosis. *Infection*, **24**, 437–439 (1996)
16. Engstrom S.M., Shoop E., Johnson R.C.: Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 419–427 (1995)
17. Fingerle V., Schulte-Spechtel U.C., Leonhard S., Hofmann H., Weber K., Pfister K., Strle F., Wilske B.: Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**, 279–290 (2008)
18. Fischer J.R., Parveen N., Magoun L., Leong J.M.: Decorin-binding proteins A and B confer distinct mammalian cell type-specific attachment by *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **66**, 567–589 (2003)
19. Fraser C.M., Casjens S., Huang W.M., Sutton G.G., Clayton R., Lathigra R.: Genomic sequence of a Lyme disease *Spirochaeta*, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, **390**, 580–586 (1997)
20. Fung B.P., McHugh J.M., Leong A., Steere A.C.: Humoral immune response to outer surface protein C of *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease: role of the immunoglobulin M response in the serodiagnosis of early infection. *Infect. Immun.* **62**, 3213–3221 (1994)
21. Gąsiorowski J., Witecka-Knysz E., Knysz B., Gerber H., Gładysz A.: Diagnostyka boreliozy. *Med. Pr.* **58**, 438–447 (2007)
22. Ge Y., Li C., Corum L., Slaughter C.A., Charon N.W.: Structure and expression of the flaA periplasmic flagellar protein of *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* **180**, 2418–2425 (1998)
23. Gerber M.A., Shapiro E.D., Bell G.L., Sampieri A., Padula S.J.: Recombinant outer surface protein C ELISA for the diagnosis of early Lyme disease. *J. Infect. Dis.* **171**, 724–727 (1995)
24. Gilmore Jr. R.D., Mbow M.L., Stevenson B.: Analysis of *Borrelia burgdorferi* gene expression during life cycle phases of the tick vector *Ixodes scapularis*. *Microb. Infect.* **3**, 799–808 (2001)

25. Glöckner G.: Comparative analysis of the *Borrelia garinii* genome. *Nucleic Acids Res.* **32**, 6038–6046 (2004)
26. Goddard J.: Not all erythema migrans lesions are Lyme disease. *Am. J. Med.* **130**, 231–233 (2017)
27. Goettner G., Schulte-Spechtel U., Hillermann R., Liegl G., Wilske B., Fingerle V.: Improvement of Lyme borreliosis serodiagnosis by a newly developed recombinant immunoglobulin G (IgG) and IgM line immunoblot assay and addition of VlsE and DbpA homologues. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 3602–3609 (2005)
28. Gomes-Solecki M.J., Dunn J.J., Luft B.J., Castillo J., Dykhuizen D.E., Yang X.: Recombinant chimeric *Borrelia* proteins for diagnosis of Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2530–2535 (2000)
29. Hagman K.E., Lahdenne P., Popova T.G., Porcella S.F., Akins D.R., Radolf J.D., Norgard M.V.: Decorin-binding protein of *Borrelia burgdorferi* is encoded within a two-gene operon and is protective in the murine model of Lyme borreliosis. *Infect. Immun.* **66**, 2674–2683 (1998)
30. Hansen K., Hindersson P., Pedersen S.P.: Measurement of antibodies to the *Borrelia burgdorferi* flagellum improves serodiagnosis in Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 338–346 (1988)
31. Hansen K., Asbrink E.: Serodiagnosis of erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans by the *Borrelia burgdorferi* immunodominant 60-kilodalton antigen common to. *Infect. Immun.* **27**, 545–551 (1989)
32. Heikkilä T., Seppälä I., Saxen H., Panelius J., Yrjänäinen H., Lahdenne P.: Species-specific serodiagnosis of Lyme arthritis and neuroborreliosis due to *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, and *B. garinii* by using decorin binding protein. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 453–460 (2002)
33. Hofmann H., Fingerle V., Hunfeld K.P., Huppert H.I., Krause A., Rauer S., Ruf B.: Cutaneous Lyme borreliosis: guideline of the German Dermatology Society. *Ger. Med. Sci.* **15**, 1–31 (2017).
34. Howe T.R., LaQuier F.W., Barbour A.G.: Organization of genes encoding two outer membrane proteins of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* within a single transcriptional unit. *Infect. Immun.* **54**, 207–212 (1986)
35. Johnson B.J., Robbins K.E., Bailey R.E., Cao B.L., Sviat S.L., Craven R.B., Dennis D.T.: Serodiagnosis of Lyme disease: accuracy of a two-step approach using a flagella-based ELISA and immunoblotting. *J. Infect. Dis.* **174**, 346–353 (1996)
36. Johnson R.C., Schmid G.P., Hyde F.W., Steigerwalt A.G., Brenner D.J.: *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**, 496–497 (1984)
37. Kalish R.A., McHugh G., Granquist J., Shea B., Ruthazer R., Steere A.C.: Persistence of immunoglobulin M or immunoglobulin G antibody responses to. *Clin. Infect. Dis.* **33**, 780–785 (2001)
38. Kenedy M.R., Lenhart T.R., Akins D.R.: The Role of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* **66**, 1–19 (2012)
39. Kraiczy P.: Hide and seek: how Lyme disease spirochetes overcome complement attack. *Front. Immunol.* **7**, 385–393 (2016)
40. Krzyczmanik D., Sińczuk-Walczyk H., Wittczak T., Cyran A., Pałczyński C., Walusiak-Skorupa J.: Borreliosis in occupational medicine practice. *Med. Pr.* **63**, 483–492 (2012)
41. Lawrenz M.B., Hardham J.M., Owens R.T., Nowakowski J., Steere A.C., Wormser G.P., Norris S.J.: Human antibody responses to VlsE antigenic variation protein of *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 3997–4004 (1999)
42. Leeflang M.M.G., Sprong H. i wsp.: The diagnostic accuracy of serological tests for Lyme borreliosis in Europe: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis.* **16**, 140–157 (2016)
43. Liang F.T., Steere A.C., Marques A.R., Johnson B.J., Miller J.N., Philipp M.T.: Sensitive and specific serodiagnosis of Lyme disease by enzyme-linked immunosorbent assay with a peptide based on an immunodominant conserved region of *Borrelia burgdorferi* VlsE. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 3990–3996 (1999)
44. Liang F.T., Philipp M.T.: Epitope mapping of the immunodominant invariable region of *Borrelia burgdorferi* VlsE in three host species. *Infect. Immun.* **68**, 2349–2352 (2000)
45. Lohr B., Fingerle V., Norris D.E., Hunfeld K.P.: Laboratory diagnosis of Lyme borreliosis: current state of the art and future perspectives. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **55**, 1–27 (2018)
46. Magnarelli L.A., Fikrig E., Padula S.J., Anderson J.F., Flavell R.A.: Use of recombinant antigens of *Borrelia burgdorferi* in serologic tests for diagnosis of Lyme borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 237–240 (1996)
47. Magnarelli L.A., Ijdo J.W., Padula S.J., Flavell R.A., Fikrig E.: Serologic diagnosis of Lyme borreliosis by using enzyme-linked immunosorbent assays with recombinant antigens. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 1735–1739 (2000)
48. Margos G., Fedorova N., Kleinjan J.E., Hartberger C., Schwan T.G., Sing A., Fingerle V.: *Borrelia lanei* sp. nov. extends the diversity of *Borrelia* species in California. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **67**, 3872–3876 (2017)
49. Margos G., Hepner S., Mang C., Sing A., Liebl B., Fingerle V.: Completed genome sequences of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto B31 (NRZ) and closely related patient isolates from Europe. *Genome Announc.* **5**, e00637 (2017)
50. Margos G., Lane R.S., Fedorova N., Koloczec J., Piesman J., Hojgaard A., Sing A., Fingerle V.: *Borrelia bissettiae* sp. nov. and *Borrelia californiensis* sp. nov. prevail in diverse enzootic transmission cycles. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**, 1447–1452 (2016).
51. Mathiesen M.J., Holm A., Christiansen M., Blom J., Hansen K., Østergaard S., Theisen M.: The dominant epitope of *Borrelia garinii* outer surface protein C recognized by sera from patients with neuroborreliosis has a surface-exposed conserved structural motif. *Infect. Immun.* **66**, 4073–4079 (1998)
52. Matyjasek A., Zdrojewski Z.: Borelioza – najnowsze rekomendacje w diagnostyce i leczeniu. *Forum Reumatol.* **2**, 58–64 (2016)
53. Meriläinen L., Herranen A., Schwarzbach A., Gilbert L.: Morphological and biochemical features of *Borrelia burgdorferi* pleomorphic forms. *Microbiology*, **161**, 516–527 (2015)
54. Moniuszko-Malinowska A., Penza P., Czupryna P., Pancewicz S., Zajkowska J.: *Borrelia burgdorferi* – morphological structure and motility as adaptation for transmission and survival in the habitat of a tick – vertebrate setup. *Prz. Epidemiol.* **70**, 420–427 (2016)
55. Moore A., Nelson C., Molins C., Mead P., Schriefer M.: Current guidelines, common clinical pitfalls, and future directions for laboratory diagnosis of Lyme disease, United States. *Emerging Infect. Dis.* **22**, 1169–1177 (2016)
56. Norris S.J.: The vls antigenic variation systems of Lyme disease *Borrelia*: eluding host immunity through both random, segmental gene conversion and framework heterogeneity. *Microbiol. Spectr.* **2**, 34–41 (2014)
57. Ojaimi C., Brooks C., Casjens S., Rosa P., Elias A., Barbour A.: Profiling of temperature-induced changes in *Borrelia burgdorferi* gene expression by using whole genome arrays. *Infect. Immun.* **71**, 1689–1705 (2003)
58. Padula S.J., Dias F., Sampieri A., Craven R.B., Ryan R.W.: Use of recombinant OspC from *Borrelia burgdorferi* for serodiagnosis of early Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 1733–1738 (1994)
59. Pancewicz S.A., Garlicki A.M., Moniuszko-Malinowska A., Zajkowska J., Kondrusik, M., Grygorczuk S., Czupryna P., Dunaj, J. Diagnosis and treatment of tick-borne diseases recommendations of the Polish Society of Epidemiology and Infectious Diseases. *Przegl Epidemiol.* **69**, 309–316 (2015)
60. Panelius J., Lahdenne P., Heikkilä T., Peltomaa M., Oksi J., Seppälä I.: Recombinant OspC from *Borrelia burgdorferi* sensu stricto *B. afzelii* and *B. garinii* in the serodiagnosis of Lyme borreliosis. *J. Med. Microbiol.* **51**, 731–739 (2002)

61. Pritt B.S., Petersen J.M. i wsp.: *Borrelia mayonii* sp. nov., a member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, detected in patients and ticks in the upper midwestern United States. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**, 4878–4880 (2016)
62. Purser E., Norris J.S.: Correlation between plasmid content and infectivity in *Borrelia burgdorferi*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **97**, 13865–13870 (2000)
63. Roessler D., Hauser U., Wilske B.: Heterogeneity of BmpA (P39) among European isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and influence of interspecies variability on serodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 2752–2758 (1997).
64. Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L., Oliver Jr J.H.: Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks Tick Borne Dis.* **2**, 123–128 (2011)
65. Schwan T.G., Piesman J., Golde W.T., Dolan M.C., Rosa P.A.: Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **92**, 2909–2913 (1995)
66. Schwan T.G., Piesman J.: Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease – associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 382–388 (2000)
67. Shapiro E.D.: Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* **370**, 1724–1731 (2014)
68. Simpson W.J., Cieplak W., Schrumph M.E., Barbour A.G., Schwan T.G.: Nucleotide sequence and analysis of the gene in *Borrelia burgdorferi* encoding the immunogenic P39 antigen. *FEMS Microbiol. Lett.* **119**, 381–387 (1994)
69. Stanek G., Reiter M.: The expiing Lyme *Borrelia* complex-clinical significance of genomic species? *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 487–493 (2011)
70. Stanek G., Wormser G.P., Gray J., Strle F.: Lyme borreliosis. *Lancet*, **379**, 461–473 (2012)
71. Steere A.C., Malawista S.E., Hardin J.A., Ruddy S., Askenase, P.W., Andiman W.A.: Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis. *Ann. Intern. Med.* **86**, 685–698 (1977)
72. Theel E.S.: The past present and (possible) future of serologic testing for Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* **54**, 1191–1196 (2016)
73. Verma A., Brissette C.A., Bowman A., Stevenson B.: *Borrelia burgdorferi* BmpA is a laminin-binding protein. *Infect. Immun.* **77**, 4940–4946 (2009)
74. des Vignes F., Piesman J., Heffernan R., Schulze T.L., Stafford III K.C., Fish D.: Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs. *J. Infect. Dis.* **183**, 773–778 (2001)
75. Wallich R., Moter S.E., Simon M.M., Ebnet K., Heiberger A., Kramer M.D.: The *Borrelia burgdorferi* flagellum-associated 41-kilodalton antigen (flagellin): molecular cloning, expression and amplification of the gene. *Infect. Immun.* **58**, 1711–1719 (1990)
76. Wang G., van Dam A.P., Schwartz I., Dankert J.: Molecular typing of *Borrelia burgdorferi sensu lato*: taxonomic, epidemiological and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 633–653 (1999)
77. Wilske B., Fingerle V., Herzer P., Hofmann A., Lehnert G., Peters H., Weber K.: Recombinant immunoblot in the serodiagnosis of Lyme borreliosis-comparison with indirect immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay. *Med. Microbiol. Immun.* **182**, 255–270 (1993)
78. Wilske B.: Epidemiology and diagnosis of Lyme borreliosis. *Ann. Med.* **37**, 568–579 (2005)
79. Wilske B., Fingerle V., Schulte-Spechtel U.: Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* **49**, 13–21 (2007)
80. Wormser G.P., Schriefer M., Aguero-Rosenfeld M.E., Levin A., Steere A.C., Nadelman R.B., Dumler J.S.: Single-tier testing with the C6 peptide ELISA kit compared with two-tier testing for Lyme disease. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **75**, 9–15 (2013)
81. Yang X., Izadi H., Coleman A.S., Wang P., Ma Y., Fikrig E., Anguita J., Pal U.: *Borrelia burgdorferi* lipoprotein BmpA activates pro-inflammatory responses in human synovial cells through a protein moiety. *Microbes Infect.* **10**, 1300–1308 (2008)
82. Zhang J.R., Hardham J.M., Barbour A.G., Norris S.J.: Antigenic variation in Lyme disease borreliae by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes. *Cell*, **89**, 275–285 (1997)

MECHANIZMY FUNKCJONOWANIA I REGULACJI SYSTEMÓW POBIERANIA HEMU U PATOGENNYCH BAKTERII GRAM-UJEMNYCH

Karolina Jaworska*, Adrianna Raczowska, Julia Frindt, Joanna Wachowicz, Katarzyna Brzostek

Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Wpłynęło w lipcu, zaakceptowano we wrześniu 2019 r.

Streszczenie: Żelazo jest jednym z istotniejszych mikroelementów wykorzystywanych przez bakterie, niezbędnym dla metabolizmu podstawowego komórki. Ponad 70% biodostępnego żelaza w organizmach ssaków znajduje się w cząsteczce hemu. Gram-ujemne bakterie patogenne podczas kolonizacji organizmu gospodarza wykorzystują hem jako główne źródło żelaza. Bakterie wykształciły dwa typy receptorów/transporterów błony zewnętrznej zaangażowanych w pobieranie cząsteczki hemu. Pierwszy z nich skupia receptory rozpoznające hem wolny lub związany w hemoproteinach i transportujące ligand przez błonę zewnętrzną. Drugi typ receptorów rozpoznaje i transportuje hem w kompleksie z hemoforem, niskocząsteczkowym białkiem uwalnianym z komórki bakteryjnej. Mikroorganizmy wykształciły transkrypcyjne i potranskrypcyjne mechanizmy kontrolujące proces transportu żelaza/hemu, chroniące przed ich toksycznym nadmiarem. Jeden z ważniejszych mechanizmów regulujących opiera się na funkcjonowaniu białka Fur, represora transkrypcji genów. Coraz więcej wiadomo o roli niekodujących RNA w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów regulonu Fur.

1. Wprowadzenie. 2. Hem i związki hemu w organizmie gospodarza. 3. Wiązanie i transport hemu przez osłony bakteryjne. 3.1. Aktywny transport hemu przez błonę zewnętrzną bakterii Gram-ujemnych. 3.2. Transport przez błonę cytoplazmatyczną zależny od ATP. 4. Regulacja ekspresji genów systemów transportu i pozyskiwania hemu. 4.1. Charakterystyka białka Fur. 4.2. Oddziaływanie Fur-DNA. 4.3. Regulacja ekspresji *fur* u *E. coli*. 4.4. Fur jako globalny regulator ekspresji genów u *E. coli*. 4.5. Inne mechanizmy kontroli ekspresji systemów transportu i pozyskiwania hemu. 5. Podsumowanie

MECHANISMS OF FUNCTIONING AND CONTROL OF HEME UPTAKE IN GRAM-NEGATIVE PATHOGENIC BACTERIA

Abstract: Iron is one of the most important micronutrients used by bacteria, essential for their basic metabolism. Over 70% of bioavailable iron in mammals is in the heme molecule. Gram-negative pathogenic bacteria during colonization and infection of the host organism use heme as the main source of iron. Bacteria have developed two types of outer membrane receptors/transporters involved in the heme uptake. The first one focuses on the receptors recognizing heme or hemoproteins and transporting the ligand through the outer membrane. The second type of receptor recognizes and takes up heme in a complex with a hemophore, a small protein released from a bacterial cell. Microorganisms have developed appropriate transcriptional and post-transcriptional mechanisms that control the iron/heme uptake, protecting against their toxic excess. One of the most important regulatory systems is based on the functioning of the Fur protein, a repressor of gene transcription. More and more is known about the role of non-coding RNAs in post-transcriptional regulation of Fur regulon gene expression.

1. Introduction. 2. Hem and heme compounds in the host organism. 3. Binding and transport of heme through bacterial wall and membranes. 3.1. Active transport of heme through the outer membrane of Gram-negative bacteria. 3.2. ATP-dependent transport across the cytoplasmic membrane. 4. Regulation of gene expression of heme uptake. 4.1. Characteristics of Fur protein. 4.2. Fur-DNA interaction. 4.3. Regulation of *fur* gene expression in *E. coli*. 4.4. Fur as a global regulator of gene expression in *E. coli*. 4.5. Other mechanisms for controlling the expression of heme uptake genes. 5. Summary

Słowa kluczowe: hem/hemoproteiny, system transportu hemu, Gram-ujemne patogenne bakterie, regulacja ekspresji genów, represor Fur
Key words: heme/hemoproteins, heme transport system, Gram-negative pathogenic bacteria, regulation of gene expression, Fur repressor

1. Wstęp

Żelazo to jeden z najobficiej występujących pierwiastków na Ziemi, który w historii naszej planety podlegał skomplikowanym procesom geochemicznym. Ważnym wydarzeniem w historii Ziemi była zmiana 2,5 miliarda lat temu pierwotnej atmosfery ziemskiej, pozbawionej tlenu, na atmosferę tlenową, co sprawiło, że

łatwo dostępne jony żelaza Fe (II) stały się niedostępne. Przybrały formę nierozpuszczalnych tlenków żelaza (II/III), hematytów (Fe_2O_3) czy magnetytów (Fe_3O_4). Obecność tlenu w atmosferze miała kolosalny wpływ na powstanie tlenowych form życia. Żelazo jest mikroelementem niezbędnym do życia prawie wszystkich mikroorganizmów, gdyż pełni rolę kofaktora w wielu procesach metabolicznych, takich jak metabolizm

* Autor korespondencyjny: Karolina Jaworska, Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096, Warszawa, tel. 22 55 41 310; e-mail: kjaworska@biol.uw.edu.pl

cukrów i białek, pozyskiwanie energii czy synteza DNA i RNA. Pierwiastek ten stanowi istotny czynnik w procesie wzrostu i proliferacji komórek. Dodatkowo wpływa na odpowiedź mikroorganizmów na stres oksydacyjny oraz na ekspresję genów kodujących bakteryjne czynniki wirulencji podczas infekcji organizmu gospodarza [1]. Z kolei nadmiar żelaza bywa toksyczny, a zredukowana forma Fe (II), choć rozpuszczalna, to w reakcji Fentona, generuje toksyczne rodniki hydroksylowe. Reaktywne formy tlenu (ROS, reactive oxygen species) mogą wywierać szkodliwe działanie na komórki uszkadzając ich DNA, oraz budujące je, lipidy czy białka [2].

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* to pierwsze organizmy, u których zaobserwowano względną niezależność życia od tego mikroelementu. W przypadku bakterii *L. plantarum* rosnących w podłożu hodowlanym o niskiej zawartości żelaza ($0,6 \mu\text{M Fe}$) szacowana ilość tego pierwiastka wynosiła średnio $3,6 \pm 1,5$ atomu tego metalu na komórkę. Natomiast komórki *Escherichia coli*, hodowane w tych samych warunkach, zawierały średnio $1,2 \pm 0,2 \times 10^5$ atomów żelaza na komórkę [3]. Uniezależnienie od żelaza prawdopodobnie wyjaśnia zdolność tych bakterii do wzrostu w mleku, w którym dostępność tego mikroelementu jest bardzo ograniczona ze względu na występowanie laktoferyny [3]. Innym przykładem jest *Borrelia burgdorferi*, czynnik etiologiczny boreliozy, której analiza sekwencji genomu wykazała brak genów kodujących białka związane z asymilacją żelaza. W dodatku znaczne ograniczenie żelaza w hodowli ($< 0,1 \mu\text{M Fe}$) nie miało wpływu na wzrost bakterii, a wyznaczona przy zastosowaniu spektrometrii mas sprzężonej z plazmą wzbudzaną indukcyjnie (ICP-MS) zawartość tego pierwiastka w komórce była niższa niż 10 atomów [4]. Również *Treponema pallidum*, czynnik etiologiczny syfilisu, wydaje się nie wymagać żelaza do sprawnego funkcjonowania. Należy jednak zauważyć, że zarówno *B. burgdorferi*, jak i *T. pallidum* są obligatoryjnymi pasożytami wewnątrzkomórkowymi o zredukowanej wielkości genomu i chociaż nie wymagają żelaza, to ich funkcjonowanie opiera się na metabolizmie gospodarza zależnym od żelaza. Ścisłej mówiąc, życie obu tych patogenów zależy od tego pierwiastka, choć w minimalnym stopniu [5].

Bakterie chorobotwórcze zasiedlające komórki i/lub tkanki zwierzęce muszą korzystać z żelaza dostępnego w organizmie gospodarza, którego stężenie jest bardzo niskie, gdyż prawie cała jego pula występuje w postaci związanej. Ponadto patogeny napotykać jeszcze większe trudności w zdobyciu żelaza w wyniku indukcji nieswoistej odpowiedzi immunologicznej gospodarza [1]. Ta odpowiedź to przede wszystkim połączone działanie kluczowych regulatorów homeostazy żelazowej, hepcydyny i ferroportyny. Hepcydyna, peptyd syntetyzowany w wątrobie ssaków, pełni podwójną funkcję, jest chelatorem jonów żelaza oraz induktorem hypoferremii (nie-

doboru żelaza), w wyniku której następuje zmniejszenie zdolności wiązania żelaza przez surowicę, a zwiększenie poziomu ferrytyny w tkankach. Ponadto aktywność innych białek gospodarza indukowanych w odpowiedzi na infekcję bakteryjną obniża poziom żelaza. Lipokalina-2, wydzielana przez neutrofile i makrofagi, zdolna jest do wychwytu bakteryjnych sideroforów, np. enterobaktyny. Laktoferyna, glikoproteina podobna do transferyny, wiąże każde wolne żelazo. Wszystko to skutkuje osłabieniem zdolności patogenów do przewycięzania odpowiedzi immunologicznej gospodarza [6, 7].

Niskie stężenie wolnego żelaza w środowisku sprawia, że bakterie korzystają z różnych strategii/mechanizmów pozyskiwania tego pierwiastka. Co więcej, lokalizacja bakterii w organizmie gospodarza (wewnątrz- czy zewnątrzkomórkowa) wpływa na strukturę chemiczną żelaza dostępnego dla bakterii. Głównym jego źródłem dla bakteryjnych patogenów, ale także dla niepatogennych symbiontów, jest wolny hem i hemoproteiny [1, 8].

2. Hem i związki hemu w organizmie gospodarza

Ponad 70% biodostępnego żelaza w organizmach ssaków znajduje się w cząsteczce hemu. Hem jest grupą prostetyczną zawierającą żelazo, wchodzącą w skład wielu białek. U zwierząt synteza hemu zachodzi w konserwowanym ewolucyjnie ośmioetapowym szlaku biosyntezy [9]. Hem jest syntetyzowany w prawie wszystkich typach komórek ludzkich, choć zdecydowanie najwięcej hemu produkują komórki erytroidalne, w dalszej kolejności hepatocyty. Hem może być także dostarczany z pożywieniem. Cząsteczka hemu jest biologicznie aktywnym chelatorem żelaza, wolny hem (niezwiązany z białkiem) może generować ROS, a ze względu na swoje właściwości hydrofobowe może interkalować do błony lipidowej niszcząc jej strukturę. Dlatego też biosynteza hemu jak i jego degradacja są w komórce ściśle regulowane. Ponad 95% hemu jest związana w organizmie człowieka z białkami (hemoproteiny). Większość hemoprotein zlokalizowana jest wewnątrzkomórkowo, a około 67% hemu w organizmie człowieka jest związana w hemoglobinie obecnej w erytrocytach. Inne główne hemoproteiny to mioglobina występująca w komórkach mięśniowych, a także cytochromy, cytoglobina i neuroglobina [6, 7].

Pula zewnątrzkomórkowego hemu to około $0,1 \mu\text{M}$, co stanowi mniej niż 0,1% całego hemu komórkowego. Ograniczona ilość sprawia, że hem jest trudno dostępny dla patogenów zewnątrzkomórkowych. Głównym jego źródłem jest hemoglobina obecna w osoczu krwi (około 80–800 nM w surowicy). Hemoglobina pochodząca ze zlizowanych erytrocytów jest wiązana przez haptoglobinę, natomiast wolny hem, pochodzący z uszkodzonej hemoglobiny, jest wiązany przez hemopeksyny suro-

wicy i w mniejszym stopniu przez albuminy surowicy. W układzie pokarmowym hem dostarczany z pożywieniem może być biodostępny jako cząsteczka wolna lub związana z hemopeksyną. W organizmie gospodarza, gdzie stężenie hemu jest niskie, hem i hemoproteiny mogą być dostępne w wyniku uszkodzenia komórek podczas infekcji bakteryjnej. W tym celu bakterie produkują egzotoksyny, które uwalniają hem z hemoprotein, są to hemolizyny, cytolizyny czy proteazy bakteryjne. Wśród tych ostatnich dobrze scharakteryzowane zostały proteazy cysteinowe *Porphyromonas gingivalis*, gingipainy, jak również autotransportujące białko Hbp (hemoglobin-binding protein) o aktywności proteazy występujące u patogennych szczepów *E. coli* [1, 6, 10].

Hem jest doskonałym źródłem żelaza dla bakterii. Patogeny pozyskują żelazo z hemu dzięki aktywności oksygenazy hemowej (HO) katalizującej konwersję hemu do biliwerdyny z uwolnieniem żelaza i dwutlenku węgla. Ponadto cząsteczka hemu po pobraniu przez komórkę bakteryjną może być włączona do cząsteczki białka i jako kofaktor w hemoproteinach pełnić ważną rolę w procesie: oddychania (transport tlenu, transport elektronów), fotosyntezy, transdukcji sygnału, detoksykacji ksenobiotyków, odpowiedzi na stres oksydacyjny czy produkcji i unieszkodliwiania toksycznych nadtlenków. Hem jest grupą prostetyczną także katalazy, peroksydazy oraz enzymów z grupy cytochromu P450. Hem może również pełnić rolę regulatorową w procesie transkrypcji DNA, translacji, stabilności białek oraz różnicowania komórek [8, 10, 11].

Jak już wspomniano, nadmiar wolnego hemu jest toksyczny dla komórek dlatego bakterie wykształciły kilka mechanizmów pozwalających na niwelowanie jego szkodliwego działania przez wyrzut na zewnątrz komórki (pompy typu efflux), sekwestrację, konwersję hemu w nietoksyczne związki czy degradację (między innymi przy użyciu oksygenazy hemowej) [1].

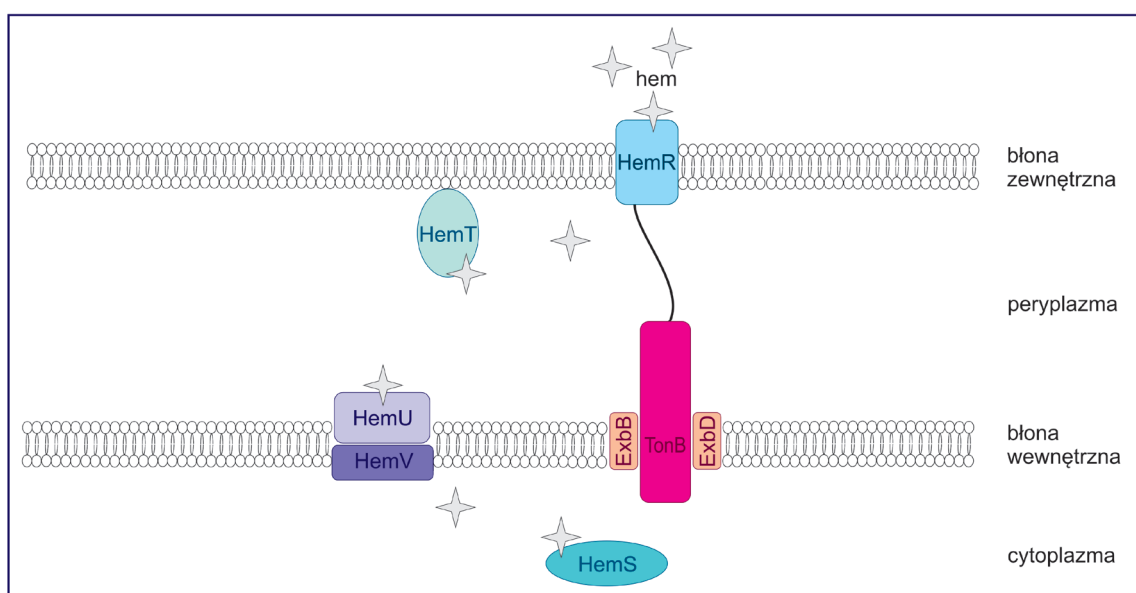
3. Wiązanie i transport hemu przez osłony bakteryjne

Bakterie, w celu pozyskania żelaza/hemu wykształciły specyficzne transportery błonowe pozwalające na transport hemu przez błonę zewnętrzną (OM) i cytoplazmatyczną (bakterie Gram-ujemne) oraz przez grubą warstwę mureiny ściany komórkowej (bakterie Gram-dodatnie). Dodatkowo bakterie mogą wydzielac krótkie peptydy zwane hemoformami, które wiążą wolny hem, a następnie dostarczają go do komórek [1, 8].

3.1. Aktywny transport hemu przez błonę zewnętrzną bakterii Gram-ujemnych

Mechanizm wychwytu hemu jest bardzo podobny dla większości Gram-ujemnych bakterii. Ogólny proces pobierania hemu przedstawiono na przykładzie systemu transportu hemu u *Yersinia enterocolitica*, ludzkiego enteropatogenu (Ryc. 1).

Zidentyfikowano i dobrze scharakteryzowano ponad 30 różnych transporterów hemu, które funkcjonują



Ryc. 1. Schemat transportu hemu u *Y. enterocolitica*

W pierwszym etapie tego procesu następuje rozpoznanie hemu, w postaci wolnej lub związanej w hemoproteinach, przez specyficzny receptor błony zewnętrznej, białko HemR. Cząsteczka hemu, w tym także ta uwolniona z hemoprotein, po przedostaniu się do peryplazmy ulega związaniu przez białko HemT, a następnie jest transportowana przez błonę wewnętrzną poprzez kompleks transporterów ABC (HemU/HemV). Energię do transportu przez błonę dostarcza kompleks białkowy TonB/ExbB/ExbD. Po przedostaniu się do cytoplazmy, hem może być degradowany w wyniku aktywności białka HemS, bądź przechowywany w komórce patogenu.

w błonie zewnętrznej patogenów Gram-ujemnych. Transportery hemu można podzielić na dwie klasy. Do pierwszej należą te, które rozpoznają hem i specyficzne kompleksy białkowe zawierające hem, np. hemoglobinę. Niektóre gatunki bakterii posiadają wiele różnych receptorów tej klasy dla odmiennych hemoprotein. Receptory te mogą być syntetyzowane w ściśle określonych warunkach środowiskowych/niszach ekologicznych organizmu gospodarza (np. u *Haemophilus influenzae*). Inne gatunki bakterii posiadają jeden typ receptora OM charakteryzujący się zdolnością do wiązania wielu hemoprotein, co świadczy o tym, że rozpoznanie substratu ma miejsce na poziomie cząsteczki hemu. Dobrym przykładem takiego receptora jest HemR u *Y. enterocolitica*, który jest zdolny do wiązania hemu, hemoglobiny, mioglobiny, kompleksu hemoglobina-haptoglobina, hem-hemopeksyny, hem-albuminy [12, 13]. W ostatnim czasie wykazano, iż *Y. enterocolitica* koduje dwa receptory hemu, które nazwano HemR1 oraz HemR2. Obydwa geny zlokalizowane są w różnych miejscach w genomie i wchodzi w skład dwóch operonów, *hemPRSTUV-1* oraz *hemPRST-2*. Z prowadzonych badań wynika, iż obydwa receptory są funkcjonalne, chociaż HemR2 wydaje się być mniej efektywny niż HemR1, co może wynikać z niższej ekspresji *hemPRST-2* w porównaniu do *hemPRSTUV-1* [14].

Wszystkie cząsteczki transporterów hemu bakterii Gram-ujemnych tworzą w błonie zewnętrznej strukturę β -baryłki zbudowanej z 22 łańcuchów aminokwasowych przyjmujących formę antyrównoległych β -kartek. Dodatkowo posiadają domenę globularną, która może blokować por transportera. Łańcuchy β -kartek tworzą w peryplazmie krótkie pętle, natomiast na powierzchni komórki długie hydrofilowe pętle służące do oddziaływań białko-białko i wiązania hemu bądź hemoprotein. Niezależnie od strukturalnego podobieństwa oraz sekwencji aminokwasowej, wszystkie znane receptory hemu posiadają dwie konserwowane reszty histydyny (np. His128 oraz His461 u HemR *Y. enterocolitica*), które koordynują hem i są zlokalizowane w konserwowanych domenach niezbędnych dla funkcjonowania receptora, np. w domenie FRAP/NPNL [1, 10]. Proponowany model działania HemR postuluje istnienie TonB-zależnego transferu hemu z His461 do His128, co pozwala na przejście hemu przez kanał w błonie zewnętrznej [12].

Wiele receptorów hemowych wiąże wolny hem lub hem związany z kompleksem białkowym, takim jak hemoglobina lub hemopeksyna. Przykładem są białka FrpB1 *Helicobacter pylori* i ChuA *Campylobacter jejuni*, które jak wykazano za pomocą spektrofotometrii UV-VIS, wiążą się z hemem i/lub hemoglobina [15, 16]. Szczególnym przypadkiem wśród znanych receptorów hemowych jest receptor HpuAB występujący u bakterii z rodzaju *Neisseria* dla haptoglobiny-hemoglobiny i hemoglobiny [17]. Składa się on z dwóch białek

o wielkości 42 kDa (HpuA) i 89 kDa (HpuB). HpuB jest białkiem zależnym od TonB. HpuA jest zewnętrzną lipoproteiną błonową. Oba białka są wymagane do wiązania hemoprotein [18].

Do drugiej klasy transporterów należą te białka, które rozpoznają i pobierają hem w kompleksie z hemofoforem. Hemofofory to niskocząsteczkowe białka bakteryjne wydzielane z komórki do środowiska. Ich rolą jest wiązanie hemu i dostarczanie go do specyficznych receptorów w błonie zewnętrznej. Główną klasą hemofoforów są białka HasA, które zidentyfikowano u wielu patogenów bakteryjnych, w tym *Serratia marcescens* i *Pseudomonas aeruginosa* [19–21]. Badania struktury HasA [22, 23], wykazały, że białko to występuje jako monomer o wielkości 19 kDa [22]. Po związaniu hemu hemofofor HasA wiąże się z receptorem błony zewnętrznej HasR, co skutkuje przeniesieniem hemu na HasR [19, 24]. Nie do końca wiadomo jakie zmiany strukturalne występują podczas przenoszenia kompleksu HasA/hemu na receptor HasR. Wiadomo jedynie, że proces zachodzi nawet w nieobecności ATP, co sugeruje, że transfer ten nie wymaga energii [24].

Jak wspomniano wcześniej, do transportu cząsteczki hemu przez osłony komórkowe, potrzebna jest energia. W procesie tym bierze udział system transportu TonB/ExbB/ExbD. Chociaż nie określono całkowitego zapotrzebowania na energię potrzebną do transportu, to ustalono, że podczas transportu protonów przez błonę wewnętrzną, z peryplazmy do cytoplazmy, tworzona jest siła protonomotoryczna. W procesie tym bierze udział białko ExbB, którego helisy tworzą w błonie wewnętrznej strukturę poru. Por ma strukturę pentameru utworzonego z helis białka ExbB oraz jednej helisy białka ExbD. Pozostałe hydrofobowe helisy ExbD prawdopodobnie znajdują się w błonie wewnętrznej, poza strukturą utworzonego pentameru [25]. Nie wiadomo, w jaki sposób siła protonomotoryczna jest przekształcana w energię potrzebną do transportu hemu przez błonę, ale zaproponowano dwa mechanizmy. Według jednej hipotezy może to być ruch rotujący białka ExbD, albo działanie białka ExbD jako tłok, wzdłuż centralnej osi ExbB. Ten mechaniczny ruch odbierany jest przez białko TonB, wywołując jego interakcję z receptorem błony zewnętrznej [25]. C-końcowa domena TonB oddziałuje z „TonB box”, tj. z N-końcowym regionem receptora błony zewnętrznej, skierowanym do peryplazmy, który może być odpowiedzialny za transfer energii z kompleksu TonB do receptora hemowego [26].

Często bywa tak, iż w komórce bakteryjnej funkcjonuje kilka różnych systemów wychwytu hemu [10, 27]. Przykładem jest *P. aeruginosa*, który posiada receptor hemu w błonie zewnętrznej (PhuR), system transporterów ABC (PhuTUV), jak i hemofofor HasA wraz z receptorem HasR rozpoznającym kompleks hemofofor/hemu [1]. System transportu warunkujący pobieranie

hemu związanego w żelazoproteinach u *P. aeruginosa* jest kodowany przez geny operonu *phu* (*Pseudomonas* heme uptake). Gen *phuR* koduje receptor PhuR, którego funkcja zależy od aktywności TonB. Geny *phuTUV* kodują system transportujący zależny od peryplazmatycznego białka wiążącego hem, niezbędny do transportu przez błonę cytoplazmatyczną. System transportu *P. aeruginosa* kodowany przez operon *phuSTUV* jest homologiczny do systemu obecnego u *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* i *Y. pestis* [28, 29].

3.2. Transport przez błonę cytoplazmatyczną zależny od ATP

Kluczową rolę w przenoszeniu hemu przez peryplazmę do błony cytoplazmatycznej pełni rozpuszczalne peryplazmatyczne białko wiążące substrat (PBP, periplasmic binding protein). Mechanizm uwalniania hemu z receptora błony zewnętrznej do PBP jest nieznany. Możliwe, że powinowactwo hemu do receptora maleje w wyniku oddziaływania z PBP. Białka PBP zostały podzielone na trzy klasy w zależności od liczby połączeń międzydomenowych. Wszystkie trzy klasy białek charakteryzują się obecnością N-końcowych i C-końcowych globularnych domen, które tworzą szczelinę pomiędzy domenami odpowiedzialną za wiązanie ligandu. Białka należące do klasy I i II mają dwa z trzech połączeń międzydomenowych. Do klasy I należy między innymi białko PBP wiążące maltozę, a do klasy II reduktaza rybonukleotydowa. Oba te białka podlegają dużym zmianom strukturalnym niezbędnym do związania i uwolnienia substratu. Białka klasy III mają jedno połączenie międzydomenowe, które ulega małym zmianom konformacyjnym. Do tej klasy należy między innymi białko wiążące witaminę B₁₂ (BtuF). Białko PhuT *P. aeruginosa* ma podobną budowę do BtuF, gdzie domeny C- i N-końcowe zawierają pięcioniciowe β-kartki oflankowane α-helisami. Hem jest związany przez tyrozynę w N-końcowej domenie znajdującej się w szczelinie wiążącej hem [1]. Podczas gdy większość odkrytych PBP wiąże się z hemem w stosunku 1:1 HmuT *Y. pestis* wiąże dwie cząsteczki hemu jednocześnie [30]. Białko to posiada dwie β-kartki połączone α-helisą, jednakże odległość pomiędzy resztami Tyr70 i Arg167 jest większa w porównaniu z innymi PBP. Może to wyjaśniać zdolność HmuT do wiązania więcej niż jednej cząsteczki hemu [30].

Transportery ABC błony cytoplazmatycznej stanowią jedną z większych białkowych superrodzin i są odpowiedzialne za transport substratów przez błonę zależny od ATP. Białka są zbudowane z dwóch transbłonowych domen tworzących kanał translokacyjny oraz dwóch domen cytoplazmatycznych odpowiedzialnych za wiązanie i hydrolizę ATP. Domena transbłonowa

transporterów różni się długością i sekwencją aminokwasową, co zapewnia specyficzność substratową. Domena wiążąca ATP jest silnie konserwowana. Transport ten przebiega według modelu „ATP-switching” [1]. W tym modelu peryplazmatyczne białko wiążące hem oddziałuje z domeną transbłonową transportera ABC indukując zmianę jego konformacji. Zmiana ta prowadzi do obniżenia energii aktywacji wymaganej do wiązania ATP z domeną cytoplazmatyczną. Wiązanie ATP indukuje tworzenie zamkniętej formy dimerycznej domeny transbłonowej i skutkuje uwolnieniem hemu do kanału transportowego. Dzięki hydrolizie ATP, następuje translokacja hemu do cytoplazmatycznego białka wiążącego hem. Przyrównanie sekwencji aminokwasowej transporterów ABC wykazało, że wszystkie posiadają dwie konserwowane reszty histydyny zlokalizowane w domenie tworzącej kanał [1].

Cząsteczka hemu obecna w cytoplazmie może powodować efekt cytotoksyczny, dlatego w komórce uruchamiany jest mechanizm katabolizmu cząsteczki. Polega on na degradacji pierścienia protoporfirynowego hemu za pomocą oksygenazy hemowej, co prowadzi do otrzymania labilnego żelaza, biliwerdiny oraz dwutlenku węgla. Bakteryjne oksygenazy są funkcjonalnymi i strukturalnymi homologami eukariotycznych oksygenaz [7, 11, 31].

4. Regulacja ekspresji genów systemów transportu i pozyskiwania hemu

Bakterie patogenne podczas kolonizacji i infekcji organizmu gospodarza wykorzystują hem/hemoproteiny jako źródło żelaza, jednakże w nadmiarze pierwiastek ten jest wysoce toksyczny, dlatego też mikroorganizmy wykształciły odpowiednie mechanizmy kontrolujące importowanie hemu lub białek zawierających żelazo do wnętrza komórek [8]. Jeden z ważniejszych systemów regulacyjnych występujący powszechnie u bakterii Gram-ujemnych opiera się na funkcjonowaniu globalnego regulatora transkrypcji genów, białka Fur. Chociaż regulator ten zidentyfikowano i najlepiej zbadano u *E. coli*, jego homologi odnaleziono u innych Gram-ujemnych patogenów, w tym *H. pylori*, *C. jejuni*, *P. aeruginosa*, *Y. pestis* oraz *Y. pseudotuberculosis* [29, 32–35].

4.1. Charakterystyka białka Fur

Białko cytoplazmatyczne Fur u *E. coli* jest zbudowane z 148 reszt aminokwasowych o łącznej masie 16,8 kDa. W strukturze Fur wyróżnia się dwie domeny: N-terminalną domenę wiążącą DNA (2–84 aa) oraz C-terminalną domenę dimeryzacyjną (85–148 aa).

Domena wiążąca zbudowana jest z czterech α -helis (α_1 , α_2 , α_3 , α_4), które tworzą motyw uskrzydłonej helisy (motyw WH, winged helix) oraz z dwóch antyrównoległych β -katek (β_1 , β_2). Za wiązanie DNA odpowiedzialne są glicyna w pozycji 50 oraz alanina w pozycji 64, będące aminokwasami helisy α_4 . C-terminalna domena dimeryzacyjna zbudowana jest z trzech ułożonych antyrównolegle β -katek (β_3 , β_4 , β_5), otoczonych pojedynczą α -helisą (α_5). Za dimeryzację odpowiedzialne są β -kateki, które łączą monomery. Co ciekawe, między helisami α_5 monomerów, tworzą się liczne oddziaływania hydrofobowe i hydrofilowe. Umożliwiają one uformowanie konserwowanych mostków solnych między asparaginą w pozycji 103 i arginina w pozycji 109 helisy α_5 jednego monomeru, a tymi samymi aminokwasami helisy α_5 drugiego monomeru. Wszystkie pozostałe aminokwasy helisy α_5 odpowiedzialne są za wiązanie się z β -katekami domeny dimeryzacyjnej drugiego monomeru [36, 37].

W budowie białka Fur wyróżnia się dwa miejsca, które charakteryzują się zdolnością do wiązania dwuwartościowych jonów metali, takich jak cynk, mangan, żelazo czy kobalt [38]. W przypadku dużej dostępności jonów Fe^{2+} w środowisku, oba monomery białka wiążą po jednym jonie. Taka sytuacja prowadzi do zmiany pozycji domen wiążących DNA w białku, co zwiększa jego powinowactwo do DNA nawet 1000-krotnie. Kompleks Fe^{2+} -Fur wiąże się do regionów promotorowych genów związanych z asymilacją żelaza, uniemożliwiając tym samym przyłączenie się polimerazy RNA i hamując transkrypcję. Można zatem stwierdzić, iż żelazo jest niezbędne do hamowania ekspresji genów znajdujących się pod kontrolą Fur [5]. Co ciekawe, białko Fur zawiera przynajmniej jedno miejsce w dimerze, które może wiązać wyłącznie dwuwartościowe jony cynku [39]. W 1998 roku Jacquamet i wsp., posługując się metodą spektroskopii fotoelektronów w zakresie promieniowania X, wykazali obecność takiego miejsca w białku Fur *E. coli*, zlokalizowanego w obrębie cystein w pozycji 92 i 95 na C-końcu [40]. Miejsce to nie jest konserwowane i nie występuje u wszystkich bakterii. Cynk wiązany w tych miejscach odpowiedzialny jest za utrzymanie integralności dimeru, nie pełni on natomiast funkcji regulatorowej [36].

4.2. Oddziaływanie Fur-DNA

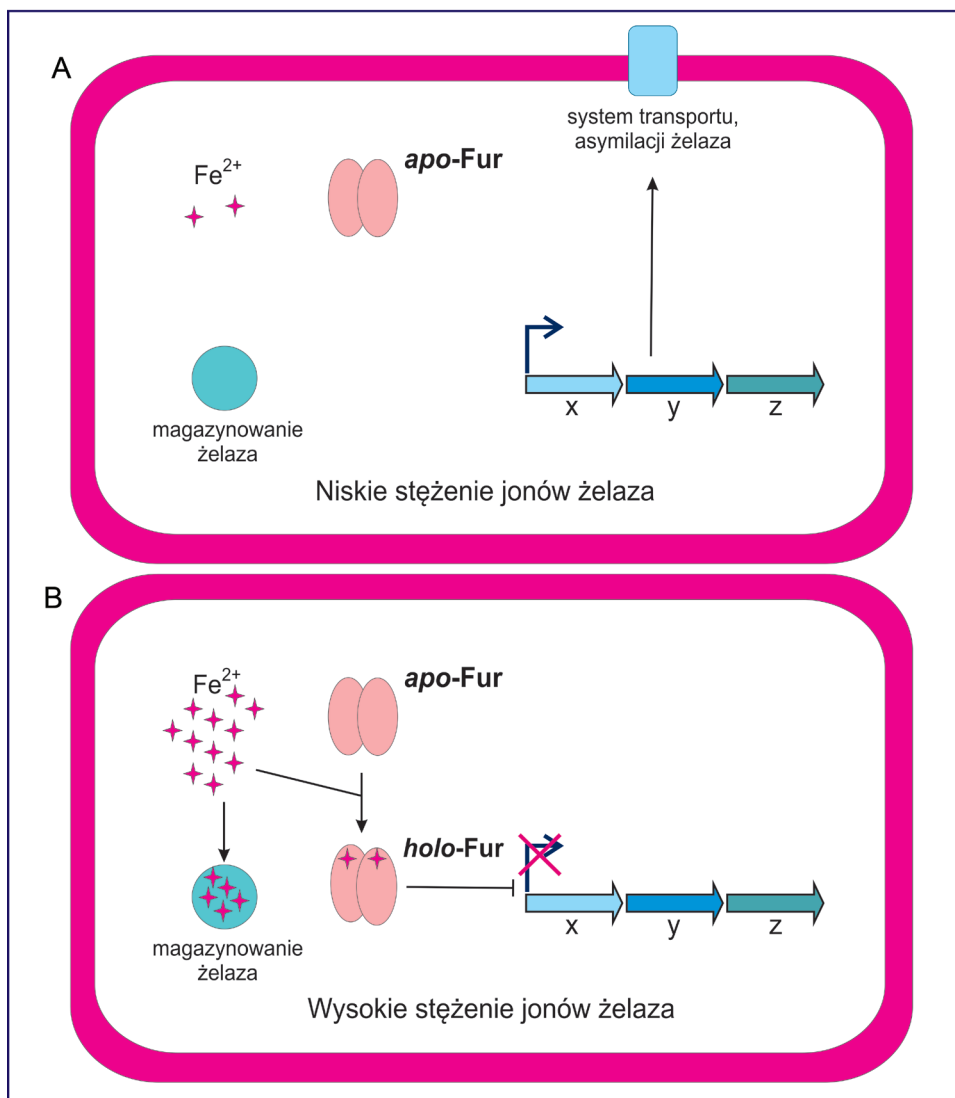
Do represji genów, związanych z asymilacją jonów żelaza, dochodzi w przypadku dużego stężenia tego mikroelementu w środowisku. To właśnie wtedy białko Fur wiąże jony Fe^{2+} , co powoduje zmianę jego konformacji i umożliwia przyłączenie do regionów promotorowych genów, hamując ich ekspresję. W odwrotnej sytuacji, kiedy stężenie jonów żelaza w środowisku jest zbyt niskie, aby bakterie mogły się namnażać dochodzi

do odblokowania ekspresji genów, których produkty są odpowiedzialne za ich asymilację. Ze względu na zbyt małą ilość żelaza nie powstaje kompleks Fe^{2+} -Fur i nie dochodzi do zahamowania transkrypcji regulowanych genów [41] (Ryc. 2).

Kompleks Fe^{2+} -Fur przyłącza się zazwyczaj między sekwencjami -35 i -10 w obszarze promotorów regulowanych genów. U *Y. enterocolitica* miejsce wiązania dla tego represora pokrywa się z sekwencją -10 promotora operonu *hemPRSTUV-1*, jak również *hemPRST-2*. Wykazano, iż Fur kontroluje w sposób negatywny aktywność obydwu operonów w warunkach nadmiaru żelaza w środowisku [14]. Dodatkowo, wewnętrzny promotor przed genami *hemSTUV* zidentyfikowano u *Y. enterocolitica*, *Y. pestis* oraz *Y. pseudotuberculosis*, ale transkrypcja tego operonu pozostaje niezależna od Fur [13, 28, 29].

Pierwotnie twierdzono, iż miejsce wiązania Fur do DNA to palindromiczna sekwencja konsensus o długości 19 pz, zwana „Fur box” lub „Iron box” (5'-GATA-ATGAT(A/T)ATCATATATC-3'). Jednakże, w 2000 roku, dzięki analizom footprinting, Escolar i wsp. wykazali, że białko Fur może wiązać fragment DNA większy niż 19 pz [42]. Dzieje się tak, ponieważ często dochodzi do sytuacji, kiedy dwie lub więcej sekwencji typu „Iron box” sąsiaduje ze sobą lub zachodzi na siebie, co sugeruje wiązanie DNA przez wiele kompleksów Fe^{2+} -Fur jednocześnie. W rzeczywistości, do promotorów niektórych genów potrafi przyłączyć się kilka kompleksów, które łącznie obejmują obszar o długości nawet 100 pz. Takie sytuacje doprowadziły do reinterpretacji miejsca „Fur box”, jako sekwencji trzech powtórzeń, składających się z motywów o długości 6 pz (5'-NAT(A/T)AT-3'); NAT(A/T)AT; N; AT(A/T)ATN-3'). Powtórzone motywy zwiększają siłę wiązania białka Fur do DNA [5]. Jednakże wspomniane badania nie wyjaśniają dokładnie jak poszczególne dimery Fur są rozmieszczone wzdłuż podwójnej helisy DNA oraz ile sześcionukleotydowych powtórzeń jest wymaganych do wiązania pojedynczego dimeru. Z kolei Lavrrar i wsp. (2002) sugerowali, iż białko Fur wiąże się z 13 pz motywem typu 6-1-6 [43]. Taki układ pozwala obu dimerom białka Fur wiązać się do miejsc „Fur box”, znajdujących się po przeciwnych stronach podwójnej nici DNA i przesuniętych o około pół skrętu helisy. Zgodnie z tym modelem, każdy kolejny 6 pz motyw pozwala na przyłączenie kolejnego dimeru białka Fur. Dodatkowo, taki układ potwierdza słuszność badań, które wskazują, że dimery Fur owijają się wokół podwójnej helisy [44].

Klasyczny model regulacji z udziałem białka Fur opiera się na wiązaniu z DNA dimerów tego białka w kompleksach z żelazem (Fe^{2+}) jako kofaktorem (holo-Fur). Udowodniono również, że aktywacja jak i represja genów jest możliwa z udziałem dimeru apo-Fur (bez udziału Fe^{2+}) [45]. U *H. pylori* Fur może



Ryc. 2. Schemat regulacji ekspresji genów z udziałem represora Fur

(A) Przy niskim stężeniu jonów żelaza, nie powstaje kompleks Fe²⁺-Fur (holo-Fur) w komórce bakteryjnej. Dimery apo-Fur nie oddziałują z DNA, co umożliwia wiązanie polimerazy RNA i transkrypcję genów kodujących białka odpowiedzialne za transport i asymilację żelaza. (B) W warunkach wysokiego stężenia jonów żelaza, kofaktor (Fe²⁺) wiąże się z apo-Fur, co prowadzi do wiązania dimerów holo-Fur w obszarze promotorowym regulowanych genów. Przyłączenie represora do DNA uniemożliwia wiązanie polimerazy RNA, blokując transkrypcję genów. x, y, z – geny, których ekspresja jest zależna od Fur.

hamować ekspresję genów zarówno indukowanych obecnością żelaza (FeON), jak i tych, których ekspresja jest hamowana nadmiarem tego pierwiastka (FeOFF). Wykazano, że Fur w zależności od tego czy jest związany z żelazem czy nie, preferencyjnie wiąże się z konkretnymi motywami operatorów, i tak odwrócone powtórzenia TAA są istotne dla wiązania holo-Fur, podczas gdy motyw TCAT_nTT jest rozpoznawany przez apo-Fur [46]. Co ciekawe obydwa typy sekwencji mogą występować jednocześnie w tych samych operatorach, a przykładem promotora zawierającego taką sekwencję jest promotor genu *fur*, który wiąże zarówno apo- jak i holo-Fur z takim samym powinowactwem [47]. Eksperyment przeprowadzony metodą chromatografii

wykluczania (Size Exclusion Chromatography – SEC) pokazał, że w zależności od stężenia żelaza w środowisku Fur może tworzyć również formy multimeryczne. W roztworze Fur występuje jako dimer, a w obecności Fe²⁺/Mn²⁺ wiąże się z DNA jako dimer, tetramer, a nawet jako podwójny tetramer. Preferencyjnie apo-Fur wiąże się z DNA jako dimer, a holo-Fur jako tetramer [46]. Fur po przybraniu odpowiedniej konformacji wiąże się z DNA dzięki domenie wiążącej. Wykazano, że helisy H4 i H4' oddziałują z dużym rowkiem DNA [36]. Badania z wykorzystaniem dystamycyny A, antybiotyku wiążącego się w małym rowku DNA w regionach bogatych w pary AT, wykazały wpływ tego leku na wiązanie holo-Fur już w małych ilościach. Duże

stężenia dystamycyny A powodowało całkowite zahamowanie wiązania tej formy białka. Takiego efektu nie zaobserwowano dla apo-Fur. Regulacja typu FeOFF, ale nie FeON, jest podporządkowana wiązaniu do małego rowka DNA, co nie wyklucza możliwości wiązania Fur również w dużym rowku DNA. Wiązanie dwóch form białka Fur (apo- i holo-Fur), do różnych motywów w operatorach, w zależności od struktury przestrzennej DNA, może wyjaśniać udział Fur w regulacji ekspresji wielu genów zarówno w sposób negatywny jak i pozytywny [46].

4.3. Regulacja ekspresji genu *fur* u *E. coli*

Ilość białka Fur w komórce *E. coli* jest zaskakująco wysoka. Liczba cząsteczek białka sięga bowiem 5000 w fazie logarytmicznego wzrostu i dochodzi do aż 10000 w fazie stacjonarnej. Tak duże stężenie Fur jest prawdopodobnie związane z ilością genów (ponad 90 u *E. coli*), których ekspresja znajduje się pod jego kontrolą. W genomie *E. coli* gen *fur* zlokalizowany jest w obrębie bicistronowego operonu *fldA-fur*. Taki układ obecny jest również u innych patogenów, np. *Klebsiella pneumoniae*, *H. influenzae* czy *Y. pestis*. Gen *fldA* jest bardzo istotny dla życia bakterii, koduje on bowiem flawodoksynę – białko zawierające flawiny, które zaangażowane są w reakcje typu redoks. Istnieje duże prawdopodobieństwo, iż flawodoksyny odgrywają znaczącą rolę w utrzymywaniu odpowiedniego stężenia zredukowanych jonów żelazowych w cytoplazmie, co ułatwia tworzenie kompleksów Fe^{2+} -Fur [5]. Ekspresja genów operonu *fldA-fur* jest indukowana poprzez system SoxRS w odpowiedzi na stres, wynikający z podwyższonego stężenia nadtlenu, powstałych w wyniku reakcji redoks [48]. Dodatkowo, gen *fur* posiada własny promotor, z którego zachodzi indukcja ekspresji w obecności regulatora OxyR, w odpowiedzi na zwiększone stężenie nadtlenu wodoru, co również związane jest z zachodzeniem reakcji utleniania i redukcji [49]. Okazuje się jednak, iż pomimo tak wyraźnej regulacji reakcje redoks zwiększają poziom ekspresji genu *fur* tylko dwukrotnie. Taki wynik ukazuje ciekawą zależność między reakcjami redoks a homeostazą żelazową. Zwiększenie liczby kopii białka Fur podczas zachodzenia tego rodzaju reakcji skutkuje wiązaniem większej ilości jonów Fe^{2+} , zmniejszeniem wydajności transportu żelaza oraz indukcją systemów związanych z jego magazynowaniem. W efekcie dochodzi do znacznego zmniejszenia stężenia wolnego żelaza w komórce wywołanego zachodzeniem reakcji redoks [48]. Okazało się również, że gen *fur* podlega również słabej autoregulacji, a miejscem oddziaływania jest „Fur box” zlokalizowany w regionie międzygenowym operonu *fldA-fur*. Dodatkowo, wykazano udział kompleksu cAMP/CRP w regulacji ekspresji *fur* [44].

4.5. Inne regulatory kontrolujące proces transkrypcji genów systemów transportu i pozyskiwania hemu

Proces adaptacji bakterii do zmieniających się parametrów fizykochemicznych środowiska możliwy jest dzięki funkcjonowaniu różnorodnych mechanizmów regulacyjnych. U *E. coli* oraz innych bakterii Gram-ujemnych, w efektywnym odbiorze, przekazywaniu i przetwarzaniu sygnałów biorą udział dwuskładnikowe systemy transdukcji sygnału, w tym szlak sygnałowy EnvZ/OmpR. EnvZ jest białkiem o aktywności kinazy i fosfatazy, zlokalizowanym w błonie cytoplazmatycznej i pełniącym funkcje sensora odbierającego sygnały środowiskowe. OmpR to cytoplazmatyczny regulator odpowiedzi, który w wyniku fosforylacji przez partnerską kinazę EnvZ, a co za tym idzie zmian konformacyjnych w białku, nabiera zdolności do przyłączania się do sekwencji regulatorowych w genach kontrolujących pozytywnie lub negatywnie ich transkrypcję. U *E. coli* wykazano, iż białko OmpR pełni funkcję globalnego regulatora, który kontroluje różne procesy życiowe tej bakterii [50]. Analizy ekspresji promotorów dwóch operonów *hemPRSTUV-1* i *hemPRST-2* kodujących składowe systemy transportu hemu u *Y. enterocolitica* wykazały, iż OmpR, obok Fur, hamuje transkrypcję obu operonów poprzez bezpośrednie oddziaływanie z DNA w obrębie motywu -35 sekwencji promotorowej. Ponadto, wpływ OmpR na aktywność promotora *hemPRSTUV-1* obserwowano zarówno w warunkach niedoboru, jak i nadmiaru żelaza [14].

Przeprowadzono szereg badań dotyczących regulacji systemów pozyskiwania żelaza/hemu *in vitro* oraz *in vivo*, tj. w zależności od lokalizacji patogenu w organizmie gospodarza i dostępności do różnych źródeł żelaza. U *Y. enterocolitica* wykazano, iż ekspresja genu kodującego receptor hemu HemR jest specyficzna tkankowo. Ekspresja *hemR* jest wyższa w śledzionie i otrzewnej, a niższa w wątrobie i jelitach. Ponadto ekspresja *hemR in vivo*, w otrzewnej jest wyższa niż ekspresja w warunkach *in vitro*, w podłożu pozbawionym żelaza. Badania te sugerują, iż mogą istnieć dodatkowe specyficzne sygnały, poza spadkiem stężenia jonów żelaza, pochodzące z organizmu gospodarza, które regulują transkrypcję *hemR* [10, 51].

W przypadku *Y. pseudotuberculosis* w kontroli ekspresji *hmuRSTUV* biorą udział co najmniej dwa globalne regulatory, Fur i IscR. U *E. coli* białko IscR (iron-sulphur cluster regulator), bezpośrednio lub pośrednio kontroluje ekspresję ~40 genów [52, 53]. U *Y. pseudotuberculosis* IscR, kontroluje ekspresję systemu sekrecji III typu (T3SS) związanego z wirulencją, a także bierze udział w pozytywnej regulacji ekspresji *hmuRSTUV* [29, 54]. Ponieważ u *E. coli* stres oksydacyjny, a także ograniczenie dostępności tlenu i żelaza regulują aktyw-

ność IscR, to wydaje się, iż zarówno tlen jak i żelazo mogą stanowić ważne czynniki regulujące wychwyt hemu/hemoprotein ze środowiska, również u gatunków z rodzaju *Yersinia* [52, 55, 56]. U *Vibrio vulnificus* zaobserwowano natomiast współzawodnictwo między represorem Fur a pozytywnym regulatorem HupR. W środowisku o niskiej zawartości żelaza, gdy obecny jest hem, HupR może wiązać się z promotorem genu *hupA*, kodującym receptor hemowy błony zewnętrznej, aby indukować jego ekspresję. W warunkach wysokiego stężenia żelaza Fe^{+2} -Fur wiąże się z promotorem *hupA*, hamując jego ekspresję, tym samym zapobiegając wiązaniu HupR [57].

4.6. Potranskrypcyjna regulacja ekspresji genów związanych z pobieraniem hemu

Indukowane termicznie zmiany strukturalne w mRNA pełnią fundamentalną rolę w termoregulacji ekspresji czynników zjadliwości u wielu bakterii chorobotwórczych [58–60]. Jak sugerują badania, pobieranie hemu przez bakterie może być regulowane w odpowiedzi na zmianę temperatury otoczenia. Termoregulację ekspresji genów transportu hemu opisano u niektórych bakterii chorobotwórczych, które są zdolne do przeżycia wewnątrz organizmu gospodarza (~37°C) jak i na zewnątrz, tj. w temp. ok. 25°C. Ponieważ organizm gospodarza jest środowiskiem bogatym w hem, w 37°C u bakterii zachodzi ekspresja genów niezbędnych do wychwytu hemu, natomiast w 25°C, w środowisku pozbawionym tego związku, ekspresja genów jest wyciszona, gdyż byłaby zbędnym wydatkiem energetycznym. Potranskrypcyjny mechanizm termoregulacji dotyczy m. in. ekspresji genu *shuA*, kodującego receptor hemu zlokalizowany w błonie zewnętrznej *Shigella dysenteriae*. Za proces ten odpowiada fragment regionu 5'UTR mRNA *shuA* pełniący funkcję swoistego termometru [61]. Termosensory w komórkach bakteryjnych, poprzez tworzenie wiązań pomiędzy zasadami mRNA (model zamka błyskawicznego), regulują ekspresję genów wirulencji i szoku cieplnego w odpowiedzi na zmiany temperatury w środowisku [62]. W niskiej temperaturze obecność struktury II-rzędowej w mRNA, w miejscu wiązania rybosomu, hamuje proces translacji. Z chwilą wzrostu temperatury, dochodzi do rozwinięcia struktury II-rzędowej, co prowadzi do uruchomienia translacji. Dane literaturowe wskazują, iż w wyniku funkcjonowania opisanego mechanizmu potranskrypcyjnej regulacji u *S. dysenteriae* w 37°C obserwuje się zwiększoną ekspresję genu *shuA*, a co za tym idzie zwiększony poziom syntezy receptora ShuA. Za tę regulację jest odpowiedzialny fragment 5'UTR mRNA *shuA* złożony z ciągu czterech uracyli (FourU). Taki typ termosensora zidentyfikowano także w genie *chuA* receptora hemu *E. coli* UPEC oraz udowodniono

termoregulację syntezy receptora ChuA, co sugeruje iż ten mechanizm potranskrypcyjnej regulacji może występować także w innych gatunkach bakterii [61]. Chociaż w 5'UTR mRNA *hemR* *Y. enterocolitica* zidentyfikowano ciąg FourU to poziom HemR w komórce tego patogenu nie podlega termoregulacji [14].

Inny mechanizm potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów wiąże się z obecnością/aktywnością małych regulatorowych RNA (sRNA), które pełnią istotną funkcję w szybkiej odpowiedzi komórek na zmiany zachodzące w środowisku. W ciągu ostatniej dekady wiele sRNA zostało zidentyfikowanych jako regulatory różnych procesów komórkowych, takich jak synteza białek błony zewnętrznej [63], metabolizm [64], patogenesa [65–67], ruchliwość/produkcja biofilmu [68, 69]. W regulacji ekspresji genów związanych z transportem żelaza u *E. coli* zidentyfikowano mały regulatorowy sRNA RyhB. Udowodniono, że RyhB pełni kluczową rolę w homeostazie żelaza regulując ekspresję co najmniej 50 różnych genów kodujących białka zaangażowane w transport i wykorzystanie tego pierwiastka [70]. RyhB może działać na dwa sposoby, przede wszystkim wyciszając ekspresję genów poprzez hamowanie translacji i destabilizację/degradację docelowego mRNA, oraz rzadziej promując ekspresję genów [71]. Regulacja negatywna z udziałem RyhB polega na parowaniu sRNA/mRNA, które zazwyczaj zachodzi w miejscu inicjacji translacji (na odcinku ok. 50 nt, zawierającym RBS oraz kodon start translacji regulowanego genu). Przyłączenie tego sRNA prowadzi do zahamowania inicjacji translacji i degradacji dupleksów sRNA/mRNA przez RNazę E [72, 73]. Aby zaszło parowanie RyhB z mRNA wymagane jest białko chaperonowe Hfq [74]. Homologi RyhB zostały opisane u wielu gatunków bakterii, głównie w rodzinie *Enterobacteriaceae* [66, 70, 75, 76]. Co ciekawe niektóre gatunki bakterii kodują dwa sRNA RyhB w swoim genomie, a rola każdego z nich może być podobna bądź zupełnie różna. Do takich gatunków należą *Salmonella* sp. [77, 78], *Y. pestis* [79] i *K. pneumoniae* [80]. RyhB-zależna regulacja ekspresji genów odpowiedzialnych za transport żelaza wynika głównie z oddziaływania dwóch regulatorów, RyhB i Fur, na zasadzie negatywnego sprzężenia zwrotnego, gdzie (i) ekspresja *ryhB* jest hamowana przez Fur [81], (ii) ekspresja *fur* jest hamowana przez RyhB [82]. Poza tym, że RyhB uczestniczy w kontroli ekspresji genów poprzez modulowanie transkrypcji represora Fur, ma również wiele bezpośrednich celów wśród genów kodujących białka odpowiedzialne za transport i pozyskiwanie żelaza, tj. (i) *shiA* – gen transportera kwasu szikimowego [83], (ii) *cirA* – gen receptora w błonie zewnętrznej [84], (iii) *bfr* – gen bakterioferrytyny [81], (iv) *febB* – gen białka wiążącego enterobaktynę [84], (v) *hemH*, *hemB*, *hemN* – geny białek zaangażowanych w biosyntezę hemu [85].

5. Podsumowanie

Od czasu odkrycia systemów transportu i pobierania żelaza w postaci hemu u bakterii poczyniono ogromne postępy w identyfikowaniu kluczowych komponentów zaangażowanych w wychwyt tego związku, jak również charakteryzowaniu struktur białek zaangażowanych w procesy przenoszenia hemu ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórki bakteryjnej. Szczególnie ważne jest poznawanie tych systemów w różnych mikroorganizmach, ze względu na konieczność zrozumienia ich funkcjonowania, aby w przyszłości stały się celem działania nowych terapii antybakteryjnych.

Podziękowania

Artykuł powstał w wyniku realizacji projektu finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki (NCN, Polska) przyznanych na podstawie umowy nr UMO-2016/21/B/NZ6/01009.

Piśmiennictwo

- Smith A.D., Wilks A.: Extracellular heme uptake and the challenges of bacterial cell membranes. *Curr. Top. Membr.* **69**, 359–392 (2012)
- Guan L., Liu Q., Li C., Zhang Y.: Development of a Fur-dependent and tightly regulated expression system in *Escherichia coli* for toxic protein synthesis. *BMC Biotechnol.* **13**, 25 (2013)
- Weinberg E.D.: The Lactobacilli anomaly: total iron abstinence. *Perspect. Biol. Med.* **40**, 1–6 (1997)
- Posay J.E., Gherardini F.C.: Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science*, **288**, 1651–1653 (2000)
- Andrews S.C., Robinson A.K., Rodriguez-Quinones F.: Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 215–237 (2003)
- Cassat J.E., Skaar E.P.: Iron in infection and immunity. *Cell Host Microbe*, **13**, 509–519 (2013)
- Gozzelino R., Soares M.P.: Coupling heme and iron metabolism via ferritin H chain. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 1754–1769 (2014)
- Anzaldi L.L., Skaar E.P.: Overcoming the heme paradox: heme toxicity and tolerance in bacterial pathogens. *Infect. Immun.* **78**, 4977–4989 (2010)
- Hamza I., Dailey H.A.: One ring to rule them all: trafficking of heme and heme synthesis intermediates in the metazoans. *Biochim. Biophys. Acta*, **9**, 1617–1632 (2012)
- Runyen-Janecky L.J.: Role and regulation of heme iron acquisition in Gram-negative pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **3**, 55 DOI: 10.3389/fcimb.2013.00055 (2013)
- Wilks A., Ikeda-Saito M.: Heme utilization by pathogenic bacteria: not all pathways lead to biliverdin. *Acc. Chem. Res.* **47**, 2291–2298 (2014)
- Bracken C.S., Baer M.T., Abdur-Rashid A., Helms W., Stojiljkovic I.: Use of heme-protein complexes by the *Yersinia enterocolitica* HemR receptor: histidine residues are essential for receptor function. *J. Bacteriol.* **181**, 6063–6072 (1999)
- Stojiljkovic I., Hantke K.: Hemin uptake system of *Yersinia enterocolitica*: similarities with other TonB-dependent systems in Gram-negative bacteria. *EMBO J.* **11**, 4359–4367 (1992)
- Jaworska K., Nieckarz M., Ludwiczak M., Raczkowska A., Brzostek K.: OmpR-mediated transcriptional regulation and function of two heme receptor proteins of *Yersinia enterocolitica* bio-Serotype 2/O:9. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, 333, DOI: 10.3389/fcimb.2018.00333 (2018)
- Carrizo-Chávez M.A., Cruz-Castañeda A., Olivares-Trejo J.J.: The *frpB1* gene of *Helicobacter pylori* is regulated by iron and encodes a membrane protein capable of binding haem and haemoglobin. *FEBS Lett.* **586**, 875–879 (2012)
- Ridley K.A., Rock J.D., Li Y., Ketley J.M.: Heme Utilization in *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriol.* **188**, 7862–7875 (2006)
- Lewis L.A., Gray E., Wang Y.P., Roe B.A., Dyer D.W.: Molecular characterization of *hpuAB*, the haemoglobin-haptoglobin-utilization operon of *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* **23**, 737–749 (1997)
- Rohde K.H., Gillaspay A.F., Hatfield M.D., Lewis L.A., Dyer D.W.: Interactions of haemoglobin with the *Neisseria meningitidis* receptor HpuAB: the role of TonB and an intact proton motive force. *Mol. Microbiol.* **43**, 335–354 (2002)
- Dent A.T., Mourinho S., Huang W., Wilks A.: Post-transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* heme assimilation system (Has) fine-tunes extracellular heme sensing. *J. Biol. Chem.* **294**, 2771–2785 (2019)
- Kumar R., Qi Y., Matsumura H., Lovell S., Yao H., Battaile K.P., Im W., Moënné-Loccoz P., Rivera M.: Replacing arginine 33 for alanine in the hemophore HasA from *Pseudomonas aeruginosa* causes closure of the H32 loop in the apo-protein. *Biochemistry*, **55**, 2622–2631 (2016)
- Yukl E.T., Jepkoror G., Alontaga A.Y., Pautsch L., Rodriguez J.C., Rivera M., Moënné-Loccoz P.: Kinetic and spectroscopic studies of hemin acquisition in the hemophore HasAp from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, **49**, 6646–6654 (2010)
- Izadi N., Henry Y., Haladjian J., Goldberg M.E., Wandersman C., Delepierre M., Lecroisey A.: Purification and characterization of an extracellular heme-binding protein, HasA, Involved in Heme Iron Acquisition. *Biochemistry*, **23**, 7050–7057 (1997)
- Jepkoror G., Rodriguez J.C., Rui H., Im W., Lovell S., Battaile K.P., Alontaga A.Y., Yukl E.T., Moënné-Loccoz P., Rivera M.: Structural, NMR spectroscopic, and computational investigation of hemin loading in the hemophore HasAp from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 9857–9872 (2010)
- Izadi-Pruneyre N., Huché F., Lukat-Rodgers G.S., Lecroisey A., Gilli R., Rodgers K., Wandersman C., Deleplaire P.: The heme transfer from the soluble HasA hemophore to its membrane-bound receptor HasR is driven by protein-protein interaction from a high to a lower affinity binding site. *J. Biol. Chem.* **281**, 25541–25550 (2006)
- Celia H., Noinaj N., Zakharov S.D., Bordignon E., Botos I., Santamaria M., Barnard T.J., Cramer W.A., Lloubes R., Buchanan S.: Structural insight into the role of the Ton complex in energy transduction. *Nature*, **538**, 60–65 (2016)
- Shultis D.D., Purdy M.D., Banchs C.N., Wiener M.C.: Outer membrane active transport: structure of the BtuB:TonB complex. *Science*, **312**, 1396–1399 (2006)
- Santander J., Golden G., Wanda S., Curtiss R.: Fur-regulated iron uptake system of *Edwardsiella ictaluri* and its influence on pathogenesis and immunogenicity in the Catfish Host. *Infect. Immun.* **80**, 2689–2703 (2012)
- Thompson J.M., Jones H.A., Perry R.D.: Molecular characterization of the hemin uptake locus (*hmu*) from *Yersinia pestis* and analysis of *hmu* mutants for hemin and hemoprotein utilization. *Infect. Immun.* **67**, 3879–3892 (1999)
- Schwiesow L., Mettert E., Wei Y., Miller H.K., Herrera N.G., Balderas D., Kiley P.J., Auerbuch V.: Control of *hmu* heme uptake genes in *Yersinia pseudotuberculosis* in response to iron sources. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, 47, DOI: 10.3389/fcimb.2018.00047 (2018)

30. Mattle D., Zeltina A., Woo J., Goetz B.A., Locher K.P.: Two stacked heme molecules in the binding pocket of the periplasmic heme-binding protein HmuT from *Yersinia pestis*. *J. Mol. Biol.* **404**, 220–231 (2010)
31. Farhana A., Saini V., Kumar A., Lancaster J.R., Steyn A.J.C.: Environmental heme-based sensor proteins: implications for understanding bacterial pathogenesis. *Antiox. Redox Signal.* **17**, 1232–1245 (2012)
32. Van Vliet A.H.M., Stoof J., i wsp.: The role of the ferric uptake regulator (Fur) in regulation of *Helicobacter pylori* iron uptake. *Helicobacter*, **7**, 237–244 (2002)
33. Butcher J., Sarvan S., Brunzelle J.S., Couture J., Stinzi A.: Structure and regulon of *Campylobacter jejuni* ferric uptake regulator Fur define apo-Fur regulation. *PNAS*, **109**, 10047–10052 (2012)
34. Sun F., Gao H., Zhang Y., Wang L., Fang N., Tan Y., Guo Z., Xia P., Zhou D., Yang R.: Fur is a repressor of biofilm formation in *Yersinia pestis*. *PLoS One*, **7**, e52392, DOI: 10.1371/journal.pone.0052392 (2012)
35. Visca P., Imperi F.: An essential transcriptional regulator: the case of *Pseudomonas aeruginosa* Fur. *Future Microbiol.* **13**, 853–856 (2018)
36. Pohl E., Haller J.C., Mijovilovich A., Meyer-Klaucke W., Garman E., Vasil M.L.: Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol. Microbiol.* **47**, 903–915 (2003)
37. Deng Z., Wang Q., i wsp.: Mechanistic insights into metal iron activation and operator recognition by the ferric uptake regulator. *Nat. Commun.* **6**, 7642 (2015)
38. Pecqueur L., D'Autréaux B., Dupuy J., Nicolet Y., Jacquamet L., Brutscher B., Michaud-Soret I., Bersch B.: Structural changes of *Escherichia coli* ferric uptake regulator during metal-dependent dimerization and activation explored by NMR and X-ray crystallography. *J. Biol. Chem.* **281**, 21286–21295 (2006)
39. Althaus E.W., Outten C.E., Olson K.E., Cao H., O'Halloran T.V.: The ferric uptake regulation (Fur) repressor is a zinc metalloprotein. *Biochem.* **38**, 6559–6569 (1999)
40. Jacquamet L., Aberdam D., Adrait A., Hazemann J.L., Latour J.M., Michaud-Soret I.: X-ray absorption spectroscopy of a new zinc site in the Fur protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **37**, 2564–2571 (1998)
41. Bagg A., Neilands J.B.: Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron(II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **26**, 5471–5477 (1987)
42. Escolar L., Pérez-Martín J., De Lorenzo V.: Evidence of an unusually long operator for the Fur repressor in the aerobactin promoter of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**, 24709–24714 (2000)
43. Lavrrar J.L., Christoffersen C.A., McIntosh M.A.: Fur-DNA interactions at the bi-directional *fepDGC-entS* promoter region in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **322**, 983–995 (2002)
44. De Lorenzo V., Herrero M., Giovannini F., Neilands B.: Fur (ferric uptake regulation) protein and CAP (catabolite-activator protein) modulate transcription of *fur* gene in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **173**, 537–546 (1988)
45. Carpenter B.M., Whitmire J.M., Marell D.S.: This is not your mother's repressor: the complex role of Fur in pathogenesis. *Infect. Immun.* **77**, 2590–2601 (2009)
46. Agriesti F., Roncarati D., Musiani F., Del Campo C., Iurlaro M., Sparla F., Ciurli S., Danielli A., Scarlato V.: FeON-FeOFF: the *Helicobacter pylori* Fur regulator commutates iron-responsive transcription by discriminative readout of opposed DNA grooves. *Nucleic Acid Res.* **42**, 3138–3151 (2014)
47. Delany I., Spohn G., Pacheco A.F., Ieva R., Alaimo C., Rappuoli R., Scarlato V.: Autoregulation of *Helicobacter pylori* Fur revealed by functional analysis of the iron-binding site. *Mol. Microbiol.* **46**, 1107–1122 (2002)
48. Zheng M., Doan B., Schneider T.D., Storz G.: OxyR and SoxRS regulation of *fur*. *J. Bacteriol.* **181**, 4639–4643 (1999)
49. Varghese S., Wu A., Park S., Imlay K.R., Imlay J.A.: Submicromolar hydrogen peroxide disrupts the ability of Fur protein to control free-iron levels in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **64**, 822–830 (2007)
50. Oshima T., Aiba H., Masuda Y., Kanaya S., Sugiura M., Wanner B.L., Mori H., Mizuno T.: Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **46**, 281–291 (2002)
51. Jacobi C.A., Gregor S., Rakin A., Heesemann J.: Expression analysis of the yersiniabactin receptor gene *fyuA* and the heme receptor *hemR* of *Yersinia enterocolitica* *in vitro* and *in vivo* using the reporter for green fluorescent protein and luciferase. *Infect. Immun.* **69**, 7772–7782 (2001)
52. Giel J.L., Rodionov D., Liu M., Blattner F.R., Kiley P.J.: IscR-dependent gene expression links iron-sulphur cluster assembly to the control of O₂-regulated genes in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **60**, 1058–1075 (2006)
53. Nesbit A.D., Giel J.L., Rose J.C., Kiley P.J.: Sequence-specific binding to a subset of IscR-regulated promoters does not require IscR Fe-S cluster ligation. *J. Mol. Biol.* **387**, 28–41 (2009)
54. Miller H.K., Kwuan L., i wsp.: IscR is essential for *Yersinia pseudotuberculosis* type III secretion and virulence. *PLoS Pathog.* **10**, e1004194 (2014)
55. Yeo W., Lee J., Lee K., Roe J.: IscR acts as an activator in response to oxidative stress for the *suf* operon encoding Fe-S assembly proteins. *Mol. Microbiol.* **61**, 206–218 (2006)
56. Wu Y., Outten F.W.: IscR controls iron-dependent biofilm formation in *Escherichia coli* by regulating type I fimbria expression. *J. Bacteriol.* **191**, 1248–1257 (2009)
57. Litwin C.M., Quackenbush J.: Characterization of a *Vibrio vulnificus* LysR homologue, HupR, which regulates expression of the haem uptake outer membrane protein, HupA. *Microb. Pathog.* **31**, 295–307 (2001)
58. Narberhaus F., Waldminghaus T., Chowdhury S.: RNA thermometers. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 3–16 (2006)
59. Narberhaus F.: Translational control of bacterial heat shock and virulence genes by temperature-sensing mRNAs. *RNA Biol.* **7**, 84–89 (2010)
60. Böhme K., Steinmann R., i wsp.: Concerted actions of a thermo-labile regulator and a unique intergenic RNA thermosensor control *Yersinia* virulence. *PLoS Pathog.* **8**, e1002518 (2012)
61. Kouse A.B., Righetti F., Kortmann J., Narberhaus F., Murphy E.R.: RNA-mediated thermoregulation of iron-acquisition genes in *Shigella dysenteriae* and pathogenic *Escherichia coli*. *PLOS One*, **8**, e63781 (2013)
62. Kortmann J., Narberhaus F.: Bacterial RNA thermometers: molecular zippers and switches. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 255–265 (2012)
63. Guillier M., Gottesman S., Storz G.: Modulating the outer membrane with small RNAs. *Genes. Dev.* **20**, 2338–2348 (2006)
64. Görke B., Yogel J.: Noncoding RNA control of the making and breaking of sugars. *Genes. Dev.* **22**, 2914–2925 (2008)
65. Romby P., Vandenesch F., Wagner E.G.: The role of RNAs in the regulation of virulence gene expression. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 229–236 (2006)
66. Murphy E.R., Payne S.M.: RyhB, an iron-responsive small RNA molecule, regulates *Shigella dysenteriae* virulence. *Infect. Immun.* **75**, 3470–3477 (2007)
67. Porcheron G., Dozois C.M.: Interplay between iron homeostasis and virulence: Fur and RyhB as a major regulator of bacterial pathogenicity. *Vet. Microbiol.* **31**, 2–14 (2015)

68. Mika F, Hengge R.: Small regulatory RNAs in the control of motility and biofilm formation in *E. coli* and *Salmonella*. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 4560–4579 (2013)
69. Kim J.N., Kwon Y.M.: Identification of target transcripts regulated by small RNA RyhB homologs in *Salmonella*: RyhB-2 regulates motility phenotype. *Microbiol. Res.* **168**, 621–629 (2013)
70. Massé E., Vanderpool C.K., Gottesman S.: Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**, 6962–6971 (2005)
71. Chareyre S., Mandin P.: Bacterial iron homeostasis regulation by sRNAs. *Microbiol. Spectrum*. **6**, RWR-0010-2017, DOI: 10.1128/microbiolspec (2018)
72. Massé E., Escorcia F.E., Gottesman S.: Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes. Dev.* **17**, 2374–2383 (2003)
73. Morita T, Maki K, Aiba H.: RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes. Dev.* **19**, 2176–2186 (2005)
74. De Lay N., Schu D.J., Gottesman S.: Bacterial small RNA-based negative regulation: Hfq and its accomplices. *J. Biol. Chem.* **288**, 7996–8003 (2013)
75. Oglesby A.G., Murphy E.R., Iyer V.R., Payne S.M.: Fur regulates acid resistance in *Shigella flexneri* via RyhB and YdeP. *Mol. Microbiol.* **58**, 1354–1367 (2005)
76. Davis B.M., Quinones M., Pratt J., Ding Y., Waldor M.K.: Characterization of the small untranslated RNA RyhB and its regulon in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **187**, 4005–4014 (2005)
77. Kim J.N.: Roles of two RyhB paralogs in the physiology of *Salmonella enterica*. *Microbiol. Res.* **186–187**, 146–152 (2016)
78. Calderon I.L., Morales E.H., Collao B., Calderon P.F., Chahuan C.A., Acuna L.G., Gil F., Saavedra C.P.: Role of *Salmonella* Typhimurium small RNAs RyhB-1 and RyhB-2 in the oxidative stress response. *Res. Microbiol.* **165**, 30–40 (2013)
79. Deng Z., Meng X., Su S., Liu Z., Ji X., Zhang Y., Zhao X., Wang X., Yang R., Han Y.: Two sRNA RyhB homologs from *Yersinia pestis* biovar *microtus* expressed *in vivo* have differential Hfq-dependent stability. *Res. Microbiol.* **163**, 413–418 (2012)
80. Huang S.H., Wang C.K., Peng H.L., Wu C.C., Chen Y.T., Hong Y.M., Lin C.T.: Role of the small RNA RyhB in the Fur regulon in mediating the capsular polysaccharide biosynthesis and iron acquisition systems in *Klebsiella pneumoniae*. *BMC Microbiol.* **24**, DOI:10.1186/1471-2180-12-148 (2012)
81. Massé E., Gottesman S.: A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 4620–4625 (2002)
82. Večerek B., Moll I., Bläsi U.: Control of Fur synthesis by the non-coding RNA RyhB and iron-responsive decoding. *EMBO J.* **26**: 965–975 (2007)
83. Prévost K., Desnoyers G., Jacques J.F., Lavoie F., Massé E.: Small RNA-induced mRNA degradation achieved through both translation block and activated cleavage. *Genes. Dev.* **25**, 385–396 (2011)
84. Salvail H., Caron M., Bélanger J., Massé E.: Antagonistic functions between the RNA chaperone Hfq and an sRNA regulate sensitivity to the antibiotic colicin. *EMBO J.* **32**, 2764–2778 (2013)
85. Li F., Wang Y., Gong K., Wang Q., Liang Q., Qi Q.: Constitutive expression of RyhB regulates the heme biosynthesis pathway and increases the 5-aminolevulinic acid accumulation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **350**, 209–215 (2014)

ENDOTOKSEMIA I ZABURZENIA BARIERY JELITOWEJ TOWARZYSZĄCE NADWADZIE I OTYŁOŚCI

Agata Janczy^{1*}, Zdzisław Kochan¹, Sylwia Małgorzewicz²

¹Zakład Biochemii Żywności, Gdański Uniwersytet Medyczny

²Zakład Żywności Klinicznej i Dietetyki, Gdański Uniwersytet Medyczny

Wpłynęło w kwietniu, zaakceptowano w lipcu 2019 r.

Streszczenie: Zgodnie z danymi Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, World Health Organization) powszechny problem nadwagi i otyłości jest piątym co do istotności czynnikiem ryzyka zgonów na świecie. Najczęściej wymienia się czynniki genetyczne i środowiskowe, które prowadzą do pobierania nadmiernej ilości energii z pożywienia oraz gromadzenia jej w postaci zapasowej tkanki tłuszczowej. Zwraca się również uwagę na fakt, że nawet stosowanie diety niskoenergetycznej niewystarczająco wspomaga skuteczną redukcję nadmiernej masy ciała. Okazuje się, że przyczyną może być mikrobiota jelit, której skład zmienia się u osób z nadwagą i otyłością. Dysbioza mikrobioty jelit jest dodatkowo przez wielu badaczy postrzegana jako przyczyna rozwoju chorób metabolicznych, w tym otyłości czy cukrzycy typu 2. Z drugiej strony bakterie Gram-ujemne stanowiące składową ekosystemu jelit są źródłem lipopolisacharydu (LPS) odpowiedzialnego za rozwój ogólnoustrojowego stanu zapalnego i endotoksemii. Na podstawie przeglądu literatury można stwierdzić, że zaburzenia mikrobioty jelit, uszkodzenie bariery jelitowej oraz zwiększone stężenie LPS we krwi wpływają niekorzystnie na otyłość i składowe zespołu metabolicznego oraz utrudniają leczenie tych schorzeń.

1. Wprowadzenie. 2. Budowa bariery jelitowej. 3. Zaburzenia bariery jelitowej i endotoksemia. 4. Podsumowanie

ENDOTOXEMIA AND INTESTINAL BARRIER DISORDERS ASSOCIATED WITH OVERWEIGHT AND OBESITY

Abstract: According to the World Health Organization (WHO), the widespread problem of overweight and obesity is the fifth most important risk factor for deaths in the world. The most frequently mentioned are the genetic and environmental factors that lead to the absorption of excess energy from food and to accumulate it in the form of spare adipose tissue. Another important fact is that even the use of a low-energy diet does not support the effective reduction of excessive body weight. It turns out that the cause may be intestinal microbiota, the composition of which changes in people with overweight and obesity. The intestinal microbiota dysbiosis is additionally perceived by many researchers as the cause of the development of metabolic diseases, including obesity or type 2 diabetes. On the other hand, Gram-negative bacteria constituting a component of the intestinal ecosystem are the source of lipopolysaccharide (LPS), responsible for the development of systemic inflammation and endotoxemia. Based on a literature review related to the subject, it can be concluded that intestinal microbiota disorders, intestinal barrier damage and increased LPS levels in patients adversely affect the obesity and components of the metabolic syndrome and hinder the treatment of these diseases.

1. Introduction. 2. Intestinal barrier function. 3. Intestinal barrier disorders and endotoxemia. 4. Summary

Słowa kluczowe: bariera jelitowa, endotoksemia, LPS, otyłość, stan zapalny

Key words: intestinal barrier, endotoxemia, LPS, obesity, inflammation

1. Wstęp

Coraz częściej występujące nadwaga i otyłość stanowią w ostatnich latach istotny problem społeczny, który dotyka nie tylko mieszkańców krajów rozwiniętych, ale również krajów rozwijających się. Za główną przyczynę tego zjawiska uważa się niekorzystne zmiany stylu życia, szczególnie zmniejszenie aktywności fizycznej i złe nawyki żywieniowe – przede wszystkim zwiększoną konsumpcję produktów przetworzonych i wysokoenergetycznych [16].

Dane Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, World Health Organization) wskazują, że w 2016 roku wśród

osób powyżej 18 roku życia nadwaga występowała u 39% osób (39% mężczyzn i 40% kobiet), natomiast otyłość u 13% (11% mężczyzn i 15% kobiet) [33]. Globalnie problem nadwagi dotyka ponad 1,9 miliarda ludzi, a około 650 milionów cierpi z powodu otyłości. Nadmiar masy ciała uznano za piąty co do istotności czynnik ryzyka zgonów – z powodu nadwagi lub otyłości umiera rocznie blisko 2,8 miliona osób dorosłych [33].

W patogenezie nadwagi i otyłości, oprócz predyspozycji genetycznych i wpływu czynników środowiskowych, zwraca się ostatnio uwagę na trzeci ważny element, tj. zwiększoną przepuszczalność jelit, której

* Autor korespondencyjny: Agata Janczy, Zakład Biochemii Żywności, Wydział Nauk o Zdrowiu, Gdański Uniwersytet Medyczny, ul. Dębinki 7, 80-211 Gdańsk; tel. 58 349 27 23; e-mail: agata.janczy@gumed.edu.pl

może dodatkowo towarzyszyć zaburzenie homeostazy mikrobioty jelitowej [9]. Czynniki jelitowe wpływające na biologiczne i immunologiczne funkcje błony śluzowej jelit, w tym zmiany w składzie mikrobioty i funkcji barierowej, zdają się odgrywać istotną rolę w powstawaniu nadwagi i otyłości, a także związanych z nimi powikłań metabolicznych [28].

2. Budowa bariery jelitowej

Błona śluzowa przewodu pokarmowego człowieka stanowi dużą powierzchnię narażoną na ciągły kontakt z toksynami, w tym bakteryjnymi, pochodzącymi ze środowiska zewnętrznego. Bliskość organizmu i drobnoustrojów stanowiących naturalną mikrobiotę jelit wpłynęła na wykształcenie mechanizmów ograniczających kontakt mikroorganizmów z nabłonkiem jelita oraz powiązaniem z nim układem odpornościowym. Miało to ograniczyć ryzyko zainicjowania odpowiedzi zapalnej [26]. W przewodzie pokarmowym zlokalizowany jest swoisty system odpornościowy – tkanka limfatyczna związana z błonami śluzowymi (MALT, mucosa-associated lymphoid tissue), której część stanowi tkanka limfatyczna związana z jelitem (GALT, gut-associated lymphoid tissue) [30].

Tkanka GALT pełni istotną rolę zarówno w odporności miejscowej, jak i uogólnionej organizmu, a jej komórki rozproszone są w nabłonku jelita (IEC, intestinal epithelial cells), gdzie tworzą limfocyty śród-nabłonkowe (IEL, intraepithelial lymphocytes) lub w obrębie blaszki właściwej śluzówki (LP, lamina propria), w postaci grudek chłonnych, kępek Peyera czy węzłów chłonnych krezkowych [22]. Na stabilność bariery jelitowej wpływają również takie czynniki jak: niskie pH soku żołądkowego, enzymy proteolityczne obecne w soku jelitowym oraz lizozym i substancje antybakteryjne – defensyny, laktoferyna, a także skład naturalnej mikrobioty jelit. Nabłonek cylindryczny z enterocytami, komórki kubkowe, śród-nabłonkowe leukocyty i komórki Panetha, znajdujące się na dnie gruczołów jelitowych, w tzw. kryptach Lieberkühna, są istotnym elementem budowy GALT. W kontakcie z bakteriami uwalniają one przeciwbakteryjne białka o szerokim zakresie działania, co warunkuje ich funkcję ochronną. Ponadto połączenia komórek nabłonkowych błony śluzowej typu zwierającego (adherentes) i zamykającego (occludentes) stanowią element bariery odpornościowej układu GALT [8].

Część bakterii tworzących fizjologiczny ekosystem przewodu pokarmowego uwalnia substancje o charakterze przeciwdrobnoustrojowym: bakteriocyny, kwasy organiczne czy nadtlenek wodoru. Dla wsparcia prawidłowego funkcjonowania organizmu istotne są bakterie biorące udział w wytwarzaniu krótkołańcuchowych

kwasów tłuszczowych (SCFA, short-chain fatty acids) oraz poliamin dostarczających niezbędnych substratów odżywczych dla komórek nabłonka jelita i pobudzających sekrecję mucyny, substancji będącej składową śluzu jelitowego uszczelniającego nabłonek. Synteza SCFA, przede wszystkim kwasu masłowego, związana jest z zachodzącą w jelicie cienkim fermentacją węglowodanów złożonych. Za wytwarzanie kwasu masłowego odpowiada głównie *Faecalibacterium prausnitzii*, bakteria należąca do beztlenowców z typu *Firmicutes* – gatunek ten stanowi 5–10% mikrobioty jelit. Wydajna synteza maślanu przez te bakterie pozwala zaliczyć je do drobnoustrojów jelitowych o właściwościach przeciwwzapalnych. Wspólnie z *F. prausnitzii* w utrzymaniu stabilności bariery jelitowej uczestniczy *Akkermansia muciphila*, zaliczana do typu *Verrucomicrobia* [12].

Kompletną barierę jelitową tworzą zatem takie elementy jak: mikroorganizmy jelitowe, warstwa śluzu, nabłonek jelitowy oraz komórki układu odpornościowego zlokalizowane w jelicie, m.in. GALT. Pierwszą linię obrony przed przyleganiem i wnikaniem patogenów w głąb ściany jelita stanowi warstwa śluzu, w której można wyróżnić dwie charakterystyczne części:

- warstwa zewnętrzna, bogata w przeciwbakteryjne peptydy, uwalniane przez komórki Panetha oraz immunoglobuliny A, powstające w komórkach plazmatycznych; w tej części bariery jelitowej znajdują się także liczne mikroorganizmy jelitowe, należące do najbardziej aktywnych elementów bariery;
- część wewnętrzna warstwy śluzu, która jest znacznie grubsza i przylega bezpośrednio do komórek nabłonkowych; jej rolą jest głównie nawadnianie, regeneracja oraz ochrona nabłonka przed działaniem enzymów trawiennych. Przede wszystkim znajduje się tu glikokaliks syntetyzowany przez komórki kubkowe, którego funkcją jest ograniczanie przenikania antygenów do blaszki właściwej błony śluzowej [7]. Wyniki badań przeprowadzonych dotychczas na modelach zwierzęcych potwierdzają, że razem z utratą warstwy śluzu zmniejsza się szczelność bariery jelitowej, co powoduje przenikanie bakterii w głąb światła jelita i zapoczątkowuje reakcję zapalną [15]. Szczelna błona śluzowa jelit umożliwia selektywny kontakt pomiędzy światłem jelita a komórkami układu odpornościowego, jest to szczególnie istotne w indukowaniu odporności na bakterie komensalne i antygeny pochodzące z żywności [26].

Kolejnym elementem bariery jelitowej jest pojedyncza warstwa komórek nabłonka, tworzona w blisko 80% przez enterocyty, które biorą udział we wchłanianiu substancji odżywczych oraz wpływają na rozwój aktywności immunologicznej dzięki pośredniczeniu w uwalnianiu cytokin i ekspresji receptorów uczestniczących w generowaniu odpowiedzi immunologicznej [32]. W górnej części błony komórkowej zlokaliz-

zowane są tzw. połączenia ściśle (TJ, tight junction), zapewniające integralność nabłonka. Są to najważniejsze elementy odpowiedzialne za kontrolę selektywnej przepuszczalności jelit, warunkujące transport bierny cząsteczek rozpuszczalnych w wodzie [19]. Połączenia ściśle zbudowane są z wielobiałkowych kompleksów, utworzonych z białek przezłonowych: okludyn, kładyn, białek adhezyjnych (JAM, junctional adhesion molecules) oraz trixeluliny. Na skutek interakcji między wewnątrzkomórkowymi domenami białek przezłonowych z białkami obwódki zamykającej (ZO-1, ZO-2, ZO-3, zonula occludens), tzn. białkami cytozolu połączonymi z włóknami aktynowymi cytoszkieletu enterocytów, zaburzona zostaje integralność bariery jelitowej. Jeśli dochodzi do rozluźnienia struktury TJ na skutek procesu fosforylacji łańcuchów lekkich miozyny, to umożliwiony jest parakomórkowy transport substancji. Zonulina stanowi zatem fizjologiczny modulator połączeń ścisłych w jelitach. Odpowiada za przelnabłonkowy transport substancji pomiędzy światłem jelita a krwiobiegiem, a ponadto reguluje przepuszczalność bariery jelitowej. Zaobserwowano, że w komórkach pozbawionych ZO-1 nie dochodzi do utraty zdolności tworzenia ścisłych połączeń, a to zapewnia prawidłową szczelność bariery jelitowej [29, 34].

Połączenia komórek nabłonka tworzą również złącza mechaniczne (adherens junctions) oraz połączenia szczelinowe (GAP junctions). Pierwsze zbudowane są z desmosomów i kadheryn połączonych z cytoszkieletem, co gwarantuje dużą wytrzymałość mechaniczną tych złączy. Połączenia GAP z kolei tworzy 6 białek transłonowych tzw. koneksyn, uczestniczących w dojrzewaniu oraz różnicowaniu komórek nabłonka, zapewniając prawidłowe funkcjonowanie bariery jelitowej [17].

3. Zaburzenia bariery jelitowej i endotoksemia

Na skutek zaburzeń w składzie mikrobioty jelit – dysbiozy, dochodzi do osłabienia integralności ściany jelita. Dysbioza może być efektem różnych czynników, w tym diety bogatotłuszczowej, wysokobiałkowej oraz ubogiej w błonnik [23, 25, 27].

Zmniejszenie syntezy białek zonuliny-1 i okludyny, stanowiących istotny element strukturalny TJ, prowadzi do zaburzenia integralności błony śluzowej przewodu pokarmowego [32]. Nieszczelna bariera jelitowa sprzyja przenikaniu przez nią wielu substancji toksycznych, z których szczególnie niebezpieczny jest lipopolisacharyd (LPS, lipopolysaccharide). LPS to heteropolimer zbudowany z hydrofobowego lipidu A oraz hydrofilowego łańcucha cukrowego. Dzięki temu, że lipid A łączy się ściśle z innymi składnikami dwuwarstwy lipidowej, lipopolisacharyd stanowi integralną część zewnętrznej błony komórkowej bakterii Gram-

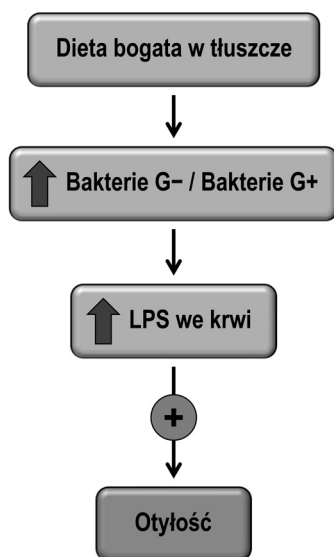
-ujemnych i cyjanobakterii, które bytują w przewodzie pokarmowym, stanowiąc do 70% mikrobioty jelit człowieka [24]. W budowie tego związku wyróżnia się trzy zasadnicze części: lipid A, region korowy oraz tzw. łańcuch O-specyficzny (antygen-O) [31]. Lipid A to wysoce konserwatywna część LPS, która zakotwicza tę cząsteczkę w błonie zewnętrznej ściany komórkowej, a specyficzna struktura tego fragmentu odgrywa ważną rolę w aktywności biologicznej cząsteczki LPS, dlatego nazywa się go centrum toksyczności. Rdzeniowy fragment LPS dzieli się na część wewnętrzną i zewnętrzną (region heksozowy), a kompletny oligosacharyd rdzeniowy prawdopodobnie wpływa na modulację właściwości lipidowej części LPS, uważanej za jego centrum aktywne. Zewnętrzna część regionu korowego lipopolisacharydu łączy się z jego częścią O-swoistą, którą stanowią heteropolisacharydy złożone z podjednostek cukrowych, tzw. jednostek powtarzających się. Ten fragment LPS charakteryzuje się dużą zmiennością składu, co sprawia że jest specyficzny dla danego szczepu bakterii [31]. Cząsteczki lipopolisacharydu, które tworzą osłonę na powierzchni wytwarzających je bakterii, stanowią barierę ochronną dla błony cytoplazmatycznej przed działaniem aktywnego dopełniacza układu odpornościowego oraz utrudniają przenikanie antybiotyków do wnętrza komórek bakteryjnych [24]. Uwolnienie LPS ze ściany komórkowej bakterii, następujące w skutek śmierci lub lizy komórki bakteryjnej, wzmacnia toksyczne działanie lipopolisacharydu [31]. Endotoksyny mogą przedostać się do krwiobiegu przez miejscowe lub ogólnoustrojowe zakażenie spowodowane przez egzogenne bakterie Gram-ujemne, absorpcję parakomórkową w jelitach oraz na drodze transportu międzykomórkowego – jako składnik chylomikronów [13]. LPS zawiera lipid A, który wiążąc się z receptorem TLR4 (Toll-like receptor) i odpowiada za inicjację kaskady sygnalizacyjnej powodującej aktywację różnych szlaków prozapalnych, przeciwzapalnych czy zwiększenie stresu oksydacyjnego. Receptor TLR4 zlokalizowany jest na powierzchni monocytów i innych komórek odpornościowych, a także komórek w mięśniach szkieletowych i tkance tłuszczowej [20].

W badaniach na myszach wykazano, że stosowanie diety wysokotłuszczowej wiąże się ze znacznym wzrostem stężenia LPS w osoczu, co określono jako „endotoksemię metaboliczną” [6]. Jednym ze skutków toksycznego działania LPS na organizm jest indukcja przewlekłego stanu zapalnego oraz nasilenie sekrecji cytokin prozapalnych. Zapalenie nabłonka jelitowego, do którego dochodzi w konsekwencji stosowania diety wysokotłuszczowej, może powodować zaburzenia w procesie trawienia pokarmu i prawdopodobnie wpływać na rozwój otyłości. Taką zależność potwierdzono w badaniu na myszach, u których indukowano endotoksemię metaboliczną poprzez wlew podskórny LPS,

pochodzącego od bakterii *Escherichia coli* 055:B5. Podawanie LPS przez 4 tygodnie spowodowało, obok stanu zapalnego, wzrost ogólnej masy ciała i masy wątroby, wzrost stężenia glukozy i triglicerydów oraz pojawienie się insulinooporności [5]. Po 4 tygodniach zwierzęta w grupie ze sztucznie wywołaną endotoksemią miały ten sam fenotyp, co zwierzęta, którym podawano dietę wysokotłuszczową, a mianowicie otyłość, insulinooporność, cukrzycę oraz stłuszczenie wątroby [5].

Uważa się, że hipertriglicydemia związana ze stosowaniem diety o dużej zawartości tłuszczu i jednoczesny wzrost stężenia endotoksyn w osoczu mogą być spowodowane wtórnym zwiększeniem przepuszczalności jelit, czemu towarzyszy zwiększona synteza dwóch białek ścisłego połączenia nabłonkowego: okludyny i zonuliny. Dysbioza mikrobioty jelit może wzmacniać uwalnianie zonuliny oraz modulację międzykomórkowych połączeń T], prowadząc do nasilenia endotoksemii [10].

Opublikowane niedawno wyniki badania przeprowadzonego na modelach zwierzęcych pozwoliły na zaproponowanie mechanizmu łączącego rozwój otyłości z mikrobiotą jelit oraz współistniejącym stanem zapalnym – zakłada on, że LPS bakteryjny może być czynnikiem wyzwalającym stan zapalny na skutek stosowania diety wysokotłuszczowej [4]. U myszy otrzymujących dietę z wysoką zawartością tłuszczu (72%) zaobserwowano, że ten sposób żywienia zwiększa endotoksemię, m.in. przez wywoływanie zmian składu mikrobioty jelit [4]. Dieta bogata w tłuszcz wpływa na zwiększenie stosunku liczby bakterii Gram-ujemnych do Gram-dodatnich, co w efekcie powoduje zwiększenie stężenia krążącego w organizmie LPS, a to z kolei indukuje otyłość (Ryc. 1).



Ryc. 1. Prawdopodobny wpływ diety wysokotłuszczowej na zmiany mikrobioty jelit powodujące rozwój endotoksemii i związanej z tym otyłości

Na występowanie wzajemnej zależności między otyłością a integralnością śluzówki jelit i związanej z tym endotoksemią wskazują wyniki badań prowadzonych na myszach genetycznie otyłych *ob/ob*, u których zaobserwowano większą przepuszczalność bariery jelita, zwiększoną dystrybucję okludyny i ZO-1 na błonie śluzowej jelit oraz wyższe stężenia krążących cytokin prozapalnych w porównaniu z myszami szczupłymi z grupy kontrolnej [3]. Znaczenie szczelności bariery jelitowej w rozwoju otyłości dowiedziono w badaniu przekrojowym z udziałem kobiet o różnych poziomach aktywności fizycznej i wskaźniku masy ciała (BMI, body mass index), w którym oceniano stan bariery jelitowej, sposób żywienia oraz zróżnicowanie mikrobioty jelitowej [21]. Grupę 102 pacjentek stanowiło 17 pań z niedoborem masy ciała (BMI < 18,5 kg/m²), 25 z BMI prawidłowym (BMI 18,5–24,9 kg/m²), 21 z nadwagą (BMI 25–29,9 kg/m²), 19 otyłych (BMI ≥ 30 kg/m²) oraz 20 wyczynowo uprawiających sport (BMI 18,5–24,9 kg/m²). Wykazano dodatnią korelację między poziomem zonuliny w surowicy (stanowiącej marker szczelności bariery jelitowej) a BMI, obwodem talii i bioder oraz masą tkanki tłuszczowej. Wyższe stężenia zonuliny były skorelowane również z większym spożyciem białka, tłuszczu oraz całkowitej energii w diecie. Dodatkowo u pacjentek z niskim poziomem zonuliny (poniżej 54 ng/ml), wskazującym na prawidłową szczelność bariery jelitowej, notowano większą liczebność bakterii należących do rodzaju *Faecalibacterium*, czyli drobnoustrojów wytwarzających SCFA i charakteryzujących się właściwościami przeciwzapalnymi. Ich wyjątkowo małą liczebność notuje się natomiast w chorobach przebiegających ze stanem zapalnym jelit, dlatego przypuszcza się, że mała liczebność *Faecalibacterium* może być przyczyną osłabienia bariery jelitowej i w efekcie przyczyną reakcji zapalnych [21].

Uważa się, że LPS uruchamia wiele procesów wpływających negatywnie na metabolizm gospodarza, z których najważniejsze to:

- aktywacja swoistych receptorów sprzężonych z białkami G (GPCR, G protein-coupled receptor), co wywołuje zwiększone wydzielanie peptydu YY, a to z kolei spowalnia pasaż treści jelitowej i ułatwia pobieranie energii;
- stymulacja aktywności lipazy lipoproteinowej (LPL, lipoprotein lipase), co prowadzi do zmniejszenia syntezy czynnika tkankowego indukowanego głodem (FIAF, fasting-induced adipocyte factor), a to sprzyja zwiększonemu magazynowaniu lipidów;
- supresja kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK, AMP-activated protein kinase), uczestniczącej w regulacji utleniania kwasów tłuszczowych w wątrobie i mięśniach, co prowadzi do odkładania się tkanki tłuszczowej;

- aktywacja układu endokannabinoidowego odpowiedzialnego za rozwój ogólnoustrojowego stanu zapalnego.

Wszystkie wymienione procesy wpływają na regulację masy ciała [1, 2, 5, 11]. Dodatkową przyczyną endotoksemii może być miejscowe zapalenie tkanki tłuszczowej i wydzielanie prozapalnych adipokin z trzewnej tkanki tłuszczowej – wskazywane jako przyczyna rozwoju zaburzeń sercowo-metabolicznych towarzyszących otyłości. Ostatnie wyniki badań klinicznych pozwoliły na sformułowanie hipotezy, że endotoksemia metaboliczna może również uczestniczyć w rozwoju zapalenia o niskim stopniu nasilenia oraz rozwoju zaburzeń sercowo-naczyniowych i zespołu metabolicznego w otyłości [14, 18].

4. Podsumowanie

W ostatnim czasie duże zainteresowanie wzbudza rola mikrobioty jelit w patogenezie otyłości i towarzyszących jej chorób. Bakterie zasiedlające jelito są źródłem LPS, który indukuje przewlekły stan zapalny. Zwiększone stężenie LPS w jelitach i osoczu obserwuje się u osób otyłych, z cukrzycą czy spożywających dietę bogatą w tłuszcze.

Biorąc pod uwagę rolę stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego w etiologii chorób sercowo-naczyniowych oraz innych zaburzeń metabolicznych związanych z nadwagą i otyłością, sugeruje się, że endotoksemia może być istotnym mediatorem zaburzeń metabolicznych obserwowanych w nadwadze i otyłości. Zaburzenia bariery jelitowej i współwystępująca endotoksemia u osób z nadwagą czy otyłością mogą być skutkiem długotrwałych nieodpowiednich nawyków żywieniowych.

Piśmiennictwo

- Bäckhed F, Manchester J.K., Semenkovich C.F., Gordon J.L.: Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 979–984 (2007)
- Boutagy N.E., McMillan R.P., Frisard M.I., Hulver M.W.: Metabolic endotoxemia with obesity: is it real and is it relevant? *Biochimie*, **124**, 11–20 (2016)
- Brun P., Castagliuolo I., Di Leo V., Buda A., Pinzani M., Palù G., Martines D.: Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **292**, 518–525 (2007)
- Cani P.D., Bibiloni R., Knauf C., Waget A., Neyrinck A.M., Delzenne N.M., Burcelin R.: Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, **57**, 1470–1481 (2008)
- Cani P.D., Burcelin R. i wsp.: Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, **56**, 1761–1772 (2007)
- Cani P.D., Neyrinck A.M., Fava F., Knauf C., Burcelin R.G., Tuohy K.M., Gibson G.R., Delzenne N.M.: Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxemia. *Diabetologia*, **50**, 2374–2383 (2007)
- Caricilli A., Castoldi A., Câmara N.: Intestinal barrier: A gentlemen's agreement between microbiota and immunity. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* **5**, 18–32 (2014)
- Działo J., Niedźwiedzka-Rystwej P., Mękal A., Deptuła W.: Charakterystyka tkanki limfatycznej błon śluzowych przewodu pokarmowego i układu oddechowego. *Alergia Astma Immunologia*, **15**, 197–202 (2010)
- Fasano A.: Gut permeability, obesity, and metabolic disorders: who is the chicken and who is the egg? *Am. J. Clin. Nutr.* **105**, 3–4 (2017)
- Fasano A.: Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol. Rev.* **91**, 151–175 (2011)
- Fleissner C.K., Huebel N., Abd El-Bary M.M., Loh G., Klaus S., Blaut M.: Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet induced obesity. *Br. J. Nutr.* **104**, 919–929 (2010)
- Flint H.J., Duncan S.H., Scott K.P., Louis P.: Interactions and competition within the microbial community of the human colon: links between diet and health. *Environ. Microbiol.* **9**, 1101–1111 (2007)
- Ghoshal S., Witta J., Zhong J., de Villiers W., Eckhardt E.: Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *J. Lipid Res.* **50**, 90–97 (2009)
- Kallio K.E., Hätönen K.A., Lehto M., Salomaa V., Männistö S., Pussinen P.J.: Endotoxemia, nutrition, and cardiometabolic disorders. *Acta Diabetol.* **52**, 395–404 (2015)
- Kawashima H.: Roles of the gel-forming MUC2 mucin and its O-glycosylation in the protection against colitis and colorectal cancer. *Biol. Pharm. Bull.* **35**, 1637–1641 (2012)
- Kłosiewicz-Latoszek L.: Otyłość jako problem społeczny, zdrowotny i leczniczy. *Probl. Hig. Epidemiol.* **91**, 339–343 (2010)
- Kojima T., Murata M., Go M., Spray D., Sawada N.: Connexins induce and maintain tight junctions in epithelial cells. *J. Membr. Biol.* **217**, 13–19 (2007)
- Lassenius M.I., Lehto M. i wsp.: Bacterial endotoxin activity in human serum is associated with dyslipidemia, insulin resistance, obesity, and chronic inflammation. *Diabetes Care*, **34**, 1809–1815 (2011)
- Lee S.H.: Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intest. Res.* **13**, 11–18 (2015)
- Lu Y.C., Yeh W.C., Ohashi P.S.: Lps/tlr4 signal transduction pathway. *Cytokine*, **42**, 145–151 (2008)
- Mörkl S., Holasek S.J. i wsp.: Gut microbiota, dietary intakes and intestinal permeability reflected by serum zonulin in women. *Eur. J. Nutr.* **57**, 2985–2997 (2018)
- Mowat A.: Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 331–341 (2003)
- Pendyala S., Walker J.M., Holt P.R.: A high-fat diet is associated with endotoxemia that originates from the gut. *Gastroenterology*, **142**, 1100–1101 (2012)
- Raetz C.R., Whitfield C.: Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 635–700 (2002)
- Tilg H., Moschen A.R., Kaser B.: Obesity and the microbiota. *Gastroenterology*, **136**, 1476–1483 (2009)
- Tokarz-Deptuła B., Śliwa-Dominiak J., Adamiak M., Bąk K., Deptuła W.: Bakterie komensalne a odporność układu pokarmowego, oddechowego i moczowo-płciowego. *Post. Hig. Med. Dośw.* **70**, 599–609 (2016)
- Turnbaugh P.J., Bäckhed F., Fulton L., Gordon J.L.: Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe*, **3**, 213–223 (2008)

28. Turnbaugh P.J., Ley R.E., Mahowald M.A., Magrini V., Mardis E.R., Gordon J.I.: An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, **444**, 1027–1031 (2006)
29. Umeda K., Matsui T., Nakayama M., Furuse K., Sasaki H., Furuse M., Tsukita S.: Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. *J. Biol. Chem.* **279**, 44785–44794 (2004)
30. Van der Sluis M., Einerhand A.W. i wsp.: Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology*, **131**, 117–129 (2006)
31. Wachowicz B., Saluk-Juszczak J.: Aktywność prozapalna lipopolisacharydu. *Post. Bioch.* **51**, 280–287 (2005)
32. Węgrzyn D., Adamek K., Łoniewska B.: Structure of the intestinal barrier. *Pomeranian J. Life Sci.* **63**, 6–9 (2017)
33. World Health Organization: Obesity and overweight. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (10.04.2019)
34. Żak-Gołąb A., Kocełak P., Aptekorz M., Zientara M., Juszczak L., Martirosian G., Chudek J., Olszanecka-Glinianowicz M.: Gut microbiota, microinflammation, metabolic profile, and zonulin concentration in obese and normal weight subjects. *Int. J. Endocrinol.* **2013**, 674106 (2013)

WYSTĘPOWANIE ZJAWISKA KOSELEKCJI W ŚRODOWISKACH POZAKLINICZNYCH

Agata Goryluk-Salmonowicz¹, Magdalena Popowska²

¹Katedra Biochemii i Mikrobiologii, Instytut Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

²Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet Warszawski

Wpłynęło w sierpniu, zaakceptowano w listopadzie 2019 r.

Streszczenie: Szczepy bakterii wieloopornych to obecnie największy problem zdrowotny na świecie. Liczne światowe organizacje zajmujące się zdrowiem publicznym apelują o konieczności ograniczenia rozprzestrzeniania się antybiotykooporności z wszelkich możliwych źródeł. Z danych literaturowych wiadomo, że takimi środowiskami źródłowymi mogą być obszary użytkowane rolniczo, gdzie powszechnie stosowano antybiotyki i sole metali ciężkich do promocji wzrostu roślin i zwierząt. Dodatkowo, wśród źródeł izolacji bakterii wieloopornych znalazły się również naturalne zbiorniki wodne, czy gleby nie użytkowane rolniczo. W ostatnich latach, bakterie odporne na antybiotyki i jednocześnie metale ciężkie, zaczęto pozyskiwać z gleb zanieczyszczonych metalami oraz z roślin zasiedlających takie gleby. Wydaje się zatem, że metale ciężkie, stanowiące zanieczyszczenie środowiska, mogą być czynnikiem selekcyjnym promującym rozprzestrzenianie się oporności na antybiotyki. Zjawisko koselekcji bakteryjnych genów oporności dotyczy najczęściej braku wrażliwości bakterii na antybiotyki oraz metale ciężkie. O zjawisku koselekcji mówimy, gdy różne geny warunkujące oporność na różne czynniki stresowe występują na tym samym ruchomym elemencie genetycznym lub, gdy te same geny warunkują oporność na różne czynniki stresowe. Niniejszy artykuł przedstawia aktualny stan wiedzy na temat tego zjawiska obserwowanego u bakterii izolowanych ze środowisk pozaklinicznych.

1. Wprowadzenie. 2. Mechanizmy koselekcji. 2.1. Mechanizm oporności krzyżowej. 2.2. Współoporność. 2.3. Współregulacja. 3. Czynniki promujące rozprzestrzenianie się zjawiska koselekcji. 4. Występowanie zjawiska koselekcji w środowiskach pozaklinicznych. 4.1. Obszary użytkowane rolniczo. 4.2. Tereny nieużytkowane rolniczo. 4.3. Naturalne zbiorniki wodne. 4.4 Endosfera roślinna. 5. Współwystępowanie genów oporności w różnych genomach środowiskowych. 6. Podsumowanie

OCCURRENCE OF THE CO-SELECTION PHENOMENON IN NON-CLINICAL ENVIRONMENTS

Abstract: Multi-resistant bacterial strains currently present the main health problem worldwide. Numerous public health organizations call for the prevention, and control the spread, of antibiotic resistance from any sources. From the literature data, it is well known that agricultural areas are a source of antibiotic resistance because of the use of antibiotics and heavy metals to promote plant and animal growth. Moreover, natural water reservoirs and soil not used for agriculture are also sources of multi-drug resistant bacteria. In recent years bacteria resistant to antibiotics and heavy metals have been isolated from heavy-metal contaminated soils and from metallophytes. Therefore, it seems that heavy metals, an environmental pollutant, may also be a selection factor that promotes the spread of antibiotic resistance. The co-selection phenomenon of resistant genes is most often connected with the lack of bacterial susceptibility to antibiotics and heavy metals. Co-selection occurs when different resistant genes that enable resistance to different stress conditions are located on the same mobile genetic elements, or when the same genes determine resistance to different stress conditions. This article presents the current state of knowledge about the co-selection phenomenon observed in bacteria isolated from nonclinical environments.

1. Introduction. 2. Co-selection mechanisms. 2.1. Cross-resistance. 2.2. Co-resistance. 2.3. Co-regulation. 3. Factors promoting spread of co-selection. 4. Occurrence of co-selection in non-clinical environments. 4.1. Areas used for agriculture. 4.2. Areas not used agriculturally. 4.3. Natural water reservoirs. 4.4. Plant endosphere. 5. Co-occurrence of resistant genes in different environmental genomes. 6. Summary

Słowa kluczowe: endofity, koselekcja, metalofity, oporność na antybiotyki

Key words: endophytes, co-selection, metallophytes, antibiotic resistance

1. Wprowadzenie

Od wielu lat, na całym świecie obserwowany jest bardzo intensywny rozwój gospodarki, w tym sektora przemysłowego i rolniczego. Wraz z postępującym rozwojem dochodzi jednak do zanieczyszczenia środowisk takich jak gleba, wody gruntowe i powierzchniowe oraz powietrze. Generowane odpady i ścieki charakteryzują się wysoką zawartością metali ciężkich. Wśród najbardziej istotnych źródeł zanieczyszczenia środowiska

wymienia się: przemysł metalurgiczny i chemiczny, składowanie odpadów, stosowanie nawozów sztucznych i osadów ściekowych w rolnictwie, a także rozwój transportu [72]. Liczne badania wskazały, iż skażenie środowiska metalami ciężkimi istotnie wpływa na rozprzestrzenianie się zjawiska antybiotykooporności [4, 6, 90]. Jest to szczególnie ważne, biorąc pod uwagę, że antropogeniczne skażenia metalami ciężkimi jest obecnie kilkukrotnie wyższy niż poziom antybiotyków w środowisku. Metale ciężkie nie ulegają rozkładowi,

* Autor korespondencyjny: dr Agata Goryluk-Salmonowicz, Katedra Biochemii i Mikrobiologii, Instytut Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa; e-mail: agata_goryluk_salmonowicz@sggw.pl

przez co wywierają długotrwałą presję selekcyjną, a tym samym przyczyniają się do nabywania i rozprzestrzeniania wśród mikroorganizmów mechanizmów oporności na metale ciężkie występujące w wysokich stężeniach [4, 93]. Najczęściej izolowanymi i opisywanymi w literaturze naukowej drobnoustrojami opornymi na metale ciężkie i antybiotyki, są bakterie zasiedlające glebę [19]. Rozpoczęcie badań metagenomicznych ujawniło, że pula znanych genów niosących oporność na antybiotyki, stanowi znikomy procent w stosunku do genów antybiotykooporności znajdujących się w glebie [2]. Zbiór wszystkich genów oporności na antybiotyki występujących w danym środowisku nazwano rezystomem (resistome) [21, 101]. W skład rezystomu mogą wchodzić zarówno geny występujące w genomach bakterii patogennych, niepatogennych, jak i prekursorów genów oporności czy geny kryptyczne. W roku 2009 opracowano bazę danych zawierającą sekwencje genów oporności na antybiotyki, w której zdeponowano 20 000 genów [50].

Intensywnie prowadzone od ponad 20 lat badania genetycznych determinant oporności na metale ciężkie ujawniły pewną zależność. Geny oporności na metale ciężkie, wykrywane u mikroorganizmów środowiskowych, bardzo często występują razem z genami antybiotykooporności i lokalizowane są na tych samych mobilnych elementach genetycznych (MGE, Mobile genetic elements). Zjawisko to nazwano koselekcją genów [4]. Zjawisko koselekcji zaobserwowano również u bakterii patogennych izolowanych od ludzi i zwierząt. W grupie bakterii chorobotwórczych mających plazmidy niosące geny oporności na antybiotyki oraz metale ciężkie, znalazły się takie rodzaje jak: *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus* oraz *Yersinia* [75]. To niepokojące zjawisko skłoniło naukowców do dalszych badań. Wykazano, że ekspresja różnych genów oporności jest często zależna od tego samego czynnika. Jak dotąd, nie jest jednak znana rola koselekcji genów dla danej wspólnoty mikroorganizmów zasiedlającej środowiska pozakliniczne. W 2016 roku, Andrea Di Cesare na łamach czasopisma *Journal of Limnology*, podkreślił, że niezbędne są badania podstawowe wyjaśniające znaczenie zjawiska koselekcji genów oporności w środowisku naturalnym [23]. W 2013 roku, Steve Bernier zasugerował, że antybiotyki najprawdopodobniej działają jako regulatorowe cząstki sygnałowe [6]. Zrozumienie problemu od strony genetycznej wymaga jednak dalszych badań. Naukowcy podejrzewają, że występowaniu antybiotykooporności sprzyjają determinanty oporności na jony metali ciężkich, które działają prawdopodobnie jako czynnik promujący antybiotykooporność. Zapewne współwystępowanie genów oporności na jony metali ciężkich i antybiotyki na MGE sprzyja rozpowszechnianiu oporności na antybiotyki oraz metale

ciężkie, nawet w przypadku występowania tylko jednego czynnika selekcyjnego: jonu metalu ciężkiego albo antybiotyku.

O istotności problemu rozprzestrzeniania się oporności na antybiotyki alarmuje Światowa Organizacja Zdrowia [100]. W raporcie opublikowanym w kwietniu 2014 roku ogłoszono, iż ze względu na problem utraty skuteczności terapii antybiotykowych, najważniejszym zadaniem jest poznanie i zredukowanie wszelkich niekontrolowanych źródeł rozprzestrzeniania się antybiotykooporności [100]. Badania ostatnich kilku lat ujawniają nowe środowiska występowania bakterii niosących jednocześnie oporność na antybiotyki i metale ciężkie. Wśród nich są zarówno tereny użytkowane rolniczo, jak i miejsca nieużytkowane, naturalne zbiorniki wodne oraz, jak ostatnio wykazano, komórki roślinne [22, 25–27, 38, 43, 45, 64, 65, 68, 98].

2. Mechanizmy koselekcji

Koselekcja (co-selection) to zjawisko zaobserwowane wśród mikroorganizmów, polegające na jednoczesnej selekcji genetycznych determinant oporności na antybiotyki, w obecności genów warunkujących oporność na metale ciężkie czy biocydy [4, 96, 81]. Mechanizm koselekcji polega na występowaniu różnych genów oporności w obrębie tego samego ruchomego elementu genetycznego, lub na występowaniu genetycznych determinant oporności warunkujących jednoczesną oporność na antybiotyki oraz metale ciężkie czy biocydy [4, 23]. MGE są przekazywane innym komórkom bakterii na drodze horyzontalnego transferu genów (HGT, horizontal gene transfer) z wykorzystaniem procesów takich jak koniugacja, transformacja czy transdukcja [8, 61]. To, czy nowa informacja genetyczna zostanie wyrażona a tym samym utrzymana w komórce bakteryjnej, zależy od obecności presji selekcyjnej w środowisku życia bakterii [48]. Mechanizmy oporności bakterii na metale ciężkie są znane. Zostały podzielone na pięć rodzajów [42]. Pierwszy mechanizm polega na niespecyficznym wiązaniu metalu przez różne metabolity bakteryjne jak na przykład egzopolisacharydy, występujące na powierzchni komórki i niedopuszczeniu ich do wnikięcia do wnętrza komórki. Drugi mechanizm opiera się na wprowadzaniu zmian w strukturze ściany i błony komórkowej bakterii w obecności metali ciężkich, co również uniemożliwia ich wnikięcie do wnętrza komórki. Trzeci mechanizm polega na usuwaniu metalu z wnętrza komórki dzięki aktywnym pompom, a cały system nazwano systemem Efflux (efflux system). Uczestniczą tu ATP-zależne ATP-azy typu P oraz białkowe transportery działające na zasadzie wymiany jonów na drodze gradientu chemiosmotycznego [42]. U licznych

mikroorganizmów występują również mechanizmy oparte na enzymatycznej detoksyfikacji jonów metali. Ostatni znany u bakterii mechanizm oporności na jony metali ciężkich polega na wewnątrzkomórkowym wiązaniu jonu przy udziale niskocząsteczkowych peptydów, takich jak na przykład metalotioneiny [7, 73]. Mechanizmy oporności bakterii na antybiotyki, również są dobrze znane. Należą do nich: enzymatyczna inaktywacja antybiotyku, strukturalne zmiany miejsca działania antybiotyku, zmniejszenie przepuszczalności bakteryjnych osłon komórkowych i niedopuszczenie antybiotyku do wnikięcia wewnątrz komórki, aktywne usuwanie antybiotyku z komórki bakteryjnej oraz ominięcie zablokowanego szlaku metabolicznego [69, 71].

Na początku XXI wieku zaczęto opisywać bakterie, u których stwierdzano oporność zarówno na antybiotyki, jak i metal ciężki. Jeden z pierwszych przykładów koselekcji opisano w 2003 roku [28]. Wyizolowano wówczas bakterie, u których geny oporności na rtęć, spektynomycynę i streptomycynę, były zlokalizowane na wspólnym elemencie genetycznym. Z badanych bakterii wyizolowano transpozony Tn21 i Tn21-like niosące geny oporności. Bakterie pochodziły zarówno ze środowiska szpitalnego jak i naturalnego, były reprezentowane przez Gram-dodatnie i Gram-ujemne bakterie patogene i niepatogene [28, 4]. Dalsze badania pozwoliły na wstępną charakterystykę mechanizmów koselekcji spotykanych u bakterii zasiedlających różne środowiska. Wyróżniono trzy główne mechanizmy koselekcji: oporność krzyżową, współoporność oraz współregulację.

2.1. Mechanizm oporności krzyżowej

Mechanizm oporności krzyżowej (cross-resistance) występuje wówczas, gdy geny warunkujące oporność na jeden antybiotyk, jednocześnie warunkują oporność na inny antybiotyk lub metal ciężki [4]. Mechanizm taki zaobserwowano na przykładzie *Listeria monocytogenes*. U bakterii tego gatunku gen *mdrL* koduje pompę MdrL (Multidrug efflux transporter of *Listeria*) odpowiadającą za oporność na metale, takie jak cynk, kobalt i chrom, biocydy, takie jak czwartorzędowe związki amoniowe i bromek etydyny oraz antybiotyki, takie jak erytromycyna, josamycyna i klindamycyna [63]. W innych badaniach zlokalizowano system DsbA-DsbB (Disulfide Bond formation system) występujący u *Burkholderia cepacia*. Badania fenotypowe wykazały, że DsbA-DsbB uczestniczy w systemie efluksyjnym eksportu m.in. metali ciężkich. Mutanty bez funkcjonalnego układu DsbA-DsbB były bardziej wrażliwe na działanie wielu antybiotyków i metali, w tym β-laktamów, kanamycyny, erytromycyny, nowobiocyny, ofloksacyny, laurylosiarczanu sodu (SDS), kadmu oraz cynku [39]. Z kolei Conroy i wsp. [16] zbadali system

GesABC występujący u bakterii z rodzaju *Salmonella*. Wykazano, że system jest odpowiedzialny nie tylko za wypompowywanie związków złota z komórki ale również odpowiada za ochronę bakterii przed fluorochinolonami, chloramfenikolem i biocydami.

2.2. Współoporność

Współoporność (co-resistance) definiowana jest jako występowanie dwóch lub większej liczby genów położonych na tym samym MGE, nadających bakterii oporność na co najmniej dwa różne czynniki stresogenne [14]. Zjawisko współoporności pozwala na rozprzestrzenianie się genów pomiędzy bakteriami. W ostatnich latach pojawiły się liczne prace opisujące występowanie zjawiska współoporności u bakterii, a geny nadające fenotyp oporności zlokalizowano na MGE. Zjawisko współoporności bardzo często opisywane jest w przypadku integronów klasy 1, niosących zarówno geny oporności na antybiotyki, jak i gen oporności na czwartorzędowe sole amoniowe [12, 23, 30]. Plazmidy niosące jednocześnie różne geny oporności również są często izolowane. W 2010 roku Osman i wsp. [74] pozyskali bakterie z naturalnych zbiorników wodnych, które wykazały oporność na antybiotyki oraz metale ciężkie, takie jak chrom i kobalt. Geny odpowiedzialne za fenotyp oporności zlokalizowano na dwóch plazmidach o wielkości 11 kb i 5 kb. Plazmidy zsekwencjonowano i zlokalizowano na nich transportery jonów metali ciężkich. Z kolei w roku 2016 portugalscy naukowcy pozyskali szczepy *Salmonella* zawierające plazmidy IncX4/IncHI2 niosące geny oporności na kolistynę oraz na miedź [10]. W tym samym roku zsekwencjonowano plazmid IncH12 *Klebsiella pneumoniae* H11 i zlokalizowano w nim geny odpowiedzialne za oporność na metale ciężkie: cynk, kadm, kobalt, miedź, nikiel, ołów, rtęć, tellur; biocydy oraz antybiotyki: chloramfenikol, erytromycynę, kanamycynę, β-laktamy, sulfonamidy i streptomycynę [108]. W celu potwierdzenia obecności różnych genów warunkujących oporność bakterii, na tym samym plazmidzie, badacze często wykorzystują technikę leczenia z plazmidu badanego szczepu (plasmid curing). Na przykład, Das i wsp. [19] pozyskali szczepy *E. coli* oraz *P. aeruginosa* odporne na szereg antybiotyków i metali ciężkich. Z badanych szczepów wyizolowali plazmidy. Po inkubacji bakterii w warunkach stresowych w obecności SDS szczepy utraciły fenotyp oporności, co potwierdziło obecność genów oporności na plazmidzie. W przypadku szczepu *E. coli* potwierdzono plazmidową lokalizację genów warunkujących oporność na chloramfenikol, trimetoprym, kadm i rtęć. Natomiast dla szczepów *P. aeruginosa* potwierdzono występowanie na plazmidzie genów warunkujących oporność na ampicylinę, chloramfenikol, trimetoprym, cefpodoksym, cefoksytynę, kadm i rtęć [20].

2.3. Współregulacja

Współregulacja (co-regulation/co-expression) występuje u bakterii wtedy, gdy ekspresja genów kodujących oporność na antybiotyk ulega zmianie po ekspozycji bakterii na metal ciężki. Mechanizm tej oporności polega na skoordynowanej odpowiedzi na stres, poprzez powiązanie transkrypcyjne lub translacyjne obu oporności [4]. W 2007 roku opisano dwukomponentowy system regulacyjny kodowany przez *cscRS* wykryty u szczepów *P. aeruginosa*. Badania wykazały, że w obecności cynku dochodzi do transkrypcji operonu *czcCBA*, który koduje pompę typu RND, co zapewnia oporność na cynk, kadm i kobalt, a jednocześnie zmniejsza ekspresję poriny OprD, przez którą imipenem wnika do bakterii [9]. Z kolei w 2009 roku opisano zjawisko współregulacji u *E. coli*. Wykazano, iż obecność miedzi oraz chromu wpływa na białko regulacyjne SoxS aktywując dodatkowo system Efflux AcrAB, co z kolei powoduje dodatkową tolerancję bakterii na antybiotyki takie jak chloramfenikol, tetracyklina, nowobiocyna, nafcylina i oksacylina [37].

3. Czynniki promujące rozprzestrzenianie się zjawiska koselekcji

Głównym środowiskiem występowania bakterii wielolekoopornych (MDR, Multi-Drug Resistant) są szpitale, co jest następstwem stosowania w lecznictwie antybiotyków oraz soli metali ciężkich. Obecność bakterii opornych na antybiotyki i metale ciężkie notowana jest również na obszarach użytkowanych rolniczo. Związane jest to ze stosowaniem antybiotyków i soli metali ciężkich jako czynników promujących wzrost roślin i zwierząt hodowlanych [13, 41, 55].

Gleby rolne są często nawożone osadami ściekowymi, w składzie których wykryto czynniki promujące rozprzestrzenianie się determinant oporności. Malik i wsp. [53] badał próbki takich gleb pobranych w Północnych Indiach. Wyizolował szczepy bakterii z rodzaju *Pseudomonas*, które oprócz szerokiego spektrum oporności na metale ciężkie, wykazały również niewrażliwość na ampicylinę, erytromycynę i sulfadiazynę (Tab. I). W wielu krajach do nawadniania pól stosuje się ścieki oczyszczone, które są źródłem zarówno bakterii opornych na antybiotyki (ARB, Antibiotic Resistant Bacteria), w tym patogennych, jak i genów oporności na antybiotyki (ARG, Antibiotic Resistance Genes). Badania różnego rodzaju ścieków (ścieki surowe, bioreaktor biologiczny, ścieki oczyszczone) przeprowadzone w Polsce wykazały niecałkowitą eliminację ARB oraz ARG w procesie oczyszczania biologicznego ścieków oraz obecność w ściekach oczyszczonych wielu bakterii

MDR, w tym patogenów wykazujących oporność na β -laktamy [77, 78, 80]. Badania prowadzone w innych krajach również potwierdzają obecność bakterii MDR w ściekach oczyszczonych [54, 56, 86, 89].

Gospodarstwa rolne są rezerwuarem bakterii opornych na antybiotyki i metale ciężkie. Stosowanie antybiotyków w hodowli zwierząt sprzyja pojawianiu się oporności w środowiskach rolniczych [11, 82, 84, 85]. Obornik stał się rezerwuarem bakterii MDR i związków antybiotycznych, a jego zastosowanie w nawożeniu gleb uprawnych znacząco zwiększyło liczebność ARG i promuje utrzymywanie się populacji bakterii MDR w glebie [3]. Lokalizacja genów oporności na MGE, do których należą m.in. plazmidy i elementy transpozycyjne, sprzyja rozprzestrzenianiu się genów oporności niezależnie od pierwotnego gospodarza [29, 83].

Od ponad dziesięciu lat stosowanie antybiotyków jako dodatków do pasz dla zwierząt hodowlanych zostało znacznie ograniczone, a w niektórych sektorach zupełnie zakazane [88]. Jednakże stosowanie innych związków o podobnym działaniu nie zostało objęte surowymi ograniczeniami. Wśród nich znajdują się sole metali ciężkich, głównie cynku, miedzi oraz srebra.

Stosowanie soli metali ciężkich w rolnictwie jest zjawiskiem powszechnym. Dodawane do pasz, wykazują działanie bakteriobójcze, grzybobójcze i wzmacniają oporność zwierząt. Tlenek cynku ZnO był niegdyś stosowany profilaktycznie w hodowli prosiąt jako alternatywa dla antybiotyków i w celu uzyskania szybkiego przyrostu masy mięśniowej oraz prawidłowego rozwoju układu nerwowego [70]. Dodatkowo, cynk wykazywał działanie przeciwbiegunkowe. W następstwie wieloletniego, regularnego stosowania cynku soli cynku w wysokich dawkach w paszach dla zwierząt coraz częściej w gospodarstwach zaczęły pojawiać się zakażenia powodowane przez bakterie odporne na komercyjnie stosowane antybiotyki. Badania ostatnich kilku lat wyjaśniły to zjawisko, związane z koselekcją genów oporności na antybiotyki u bakterii towarzyszących zwierzętom hodowlanym [1, 13, 55].

Od około 2004 roku zaczęto regulować poziom cynku i innych metali ciężkich w paszach dla zwierząt, a mieszanki paszowe podlegają cyklicznym kontrolom [70]. Siarczan miedzi (CuSO_4) dzięki właściwościom bakteriobójczym i grzybobójczym również był stosowany na szeroką skalę w hodowli zwierząt [95]. Obecnie, stosowany jest głównie do kąpieli racic w mleczarniach oraz jako czynnik promujący wzrost w hodowlach trzody chlewnej i drobiu. W klatkowej hodowli kur jest dodawany do paszy w celu obniżenia zawartości cholesterolu w jajach [95, 109]. Z kolei srebro koloidalne jest wykorzystywane jako środek dezynfekcyjny o działaniu przeciwbakteryjnym i przeciwwgrzybiczym przede wszystkim w uprawie roślin [46].

4. Występowanie zjawiska koselekcji w środowiskach pozaklinicznych

4.1. Obszary użytkowane rolniczo

Liczne badania potwierdzają, iż stosowanie soli metali ciężkich w hodowli zwierząt sprzyja pojawianiu się szczepów bakterii opornych na antybiotyki. Przykłady badań potwierdzających obecność bakterii MDR w gospodarstwach rolnych przedstawiono w Tabeli I. Na początku XXI wieku ukazała się praca Hasman i wsp. [38], którzy badali mikrobiotę zwierząt hodowlanych. Pozyskane szczepy MDR wyizolowano wówczas m.in. z trzody chlewnej. Bakterie zaklasyfikowano do gatunku *E. faecium*. Wykazywały one oporność na miedź oraz niewrażliwość na erytromycynę i wankomycynę. Co więcej, badacze potwierdzili eksperymentalnie obecność wszystkich determinant oporności na tym samym plazmidzie koniugacyjnym. Zaproponowano, iż obecność bakterii opornych na miedź była następstwem stosowanych w chlewni dodatków do paszy zawierających siarczany miedzi [38].

Oprócz zwierząt hodowlanych, kolejnym powszechnym rezerwuarem bakterii MDR okazały się nawozy zwierzęce. Do gleb użytkowanych rolniczo nawożo-

nych nawozami zwierzęcymi, licznie przedostają się pozostałości metali ciężkich oraz antybiotyków, co negatywnie wpływa na jakość i bezpieczeństwo żywności. W ostatnich latach prowadzone są badania dotyczące charakterystyki szczepów środowiskowych wyizolowanych z takich gleb. W Turcji, w miejscowości Kirşehir, prowadzono badania gleby ogrodowej nawożonej obornikiem [27] (Tab. I). Pozyskano wówczas bakterie zaklasyfikowane do gatunków: *B. subtilis*, *B. cereus*, *E. coli* oraz *P. aeruginosa*. Wszystkie szczepy wykazały oporność na sole metali ciężkich, takich jak ołów, kobalt, cynk i miedź. Ponadto, większość szczepów była niewrażliwa na antybiotyki – aztreonam, klindamycynę oraz wankomycynę. Co więcej, szczepy zidentyfikowane jako *P. aeruginosa* wykazały oporność na amikacynę, ceftazydym i cyprofloksacynę, natomiast szczepy *E. coli* były odporne na ceftazydym i cefuroksym.

Podobne zjawisko zaobserwowano w akwakulturze. Bakteriami MDR powszechnie izolowanymi z ryb są patogenne szczepy z rodzaju *Aeromonas* [78, 79]. Bakterie z tego rodzaju zostały między innymi wyizolowane z siedmiu różnych hodowli pstrąga tęczowego w Australii [1]. Pozyskane szczepy były odporne na metale ciężkie oraz badane antybiotyki (Tab. I). Wszystkie szczepy były odporne na amoksycylinę i cefalotin,

Tabela I
Profil oporności bakterii izolowanych z obszarów użytkowanych rolniczo

Rodzaj/gatunek bakterii	Źródło izolacji bakterii	Oporność bakterii na antybiotyki	Oporność bakterii na metale ciężkie	Piśmiennictwo
<i>Aeromonas</i> sp.	Hodowla pstrąga tęczowego (Australia)	amoksycylina, cefalotin, ceftiofur, florfenikol, streptomycyna, tetracyklina, sulfametoksazol, tykarcylina	chrom, cynk, kadm, kobalt, mangan, miedź, ołów	[1]
<i>A. aquariorum</i> , <i>A. hydrophila</i> , <i>A. veronii</i> , <i>A. caviae</i> , <i>A. jandami</i>	Hodowla węgorza, hodowla karpia (Korea)	amikacin, amoksycylina, kwas klawulanowy, ampicylina, cefpodoksym, ceftiofur, chloramfenikol, enrofloksacyna, imipenem, gentamycyna, piperacylina, marbofloksacyn, tobramycyna, nitrofurantoina, trimetoprim, sulfametoksazol tetracyklina	kadm	[107]
<i>A. salmonicida</i>	Hodowla łososia atlantyckiego (Kanada)	florfenikol, spektynomycyna, streptomycyna, sulfonamidy, tetracyklina	rtęć	[66]
<i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i>	Gleba ogrodowa (Turcja)	aztreonam, ceftazydym, cefuroksym, klindamycyna, wankomycyna	cynk, kobalt, miedź, ołów	[27]
<i>Enterococcus faecium</i>	Hodowla trzody chlewnej (Dania)	erytromycyna, wankomycyna	miedź	[38]
<i>E. coli</i>	Gleba ogrodowa (Turcja)	aztreonam, ceftazydym, cefuroksym, klindamycyna, wankomycyna	cynk, kobalt, miedź, ołów	[27]
<i>P. aeruginosa</i>	Gleba ogrodowa (Turcja)	amikacyna, aztreonam, ceftazydym, cefuroksym, cyprofloksacyna, klindamycyna, wankomycyna	cynk, kobalt, miedź, ołów	[27]
<i>Pseudomonas</i> sp.	Hodowla pstrąga tęczowego (Australia)	amoksycylina, cefalotin, ceftiofur, chloramfenikol, florfenikol, streptomycyna, nitrofurantoina, trimetoprim	chrom, cynk, kadm, mangan, miedź, ołów	[1]
<i>Pseudomonas</i> sp.	Gleba uprawna (Północne Indie)	ampicylina, erytromycyna, sulfadiazyna	chrom, cynk, miedź, nikiel, ołów, rtęć	[53]

większość szczepów na tykarcylinę, tetracyklinę oraz streptomycynę, podczas gdy tylko niektóre szczepy na ceftiofur, florfenikol i sulfametoksazol. We wzmiankowanych badaniach wyizolowano też bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, u których również powszechnie występowała oporność na amoksycylinę, cefalotynę, ceftiofur, chloramfenikol, florfenikol, streptomycynę, nitrofurantoinę oraz trimetoprym. Podobne badania prowadził McIntosh i wsp. [66], który z hodowli łosia atlantyckiego w Kanadzie wyizolował szczepy *A. salmonicida* odporne na florfenikol, tetracyklinę, sulfonamidy, spektynomycynę i streptomycynę oraz na rtęć (Tab. I). Obecność determinant warunkujących taki fenotyp bakterii zlokalizowano na plazmidach nazwanych pRAS3 o wielkości ok. 11 800 pz. W 2014 roku Yi i wsp. [107] również wyizolowali szczepy bakterii rodzaju *Aeromonas* wykazujące oporność na szereg antybiotyków, w tym amoksycylinę z kwasem klawulanowym, a jednocześnie oporność na kadm. Badacze sugerowali występowanie koselekcji genów antybiotykooporności i oporności na metal, a kadm uznano za czynnik promujący to zjawisko. Wśród badanych ryb, z których izolowano szczepy, znalazły się m.in. karpie i węgorze. Pozyskano następujące gatunki: *A. veronii*, *A. aquarium*, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. jandami* i *A. allosaccharophila* (Tab. I). Szczepy tych bakterii wykazały brak wrażliwości na szereg antybiotyków, w tym ampicylinę (99% szczepów), piperacylinę (84%), tetracyklinę (83%), enrofloksacynę (80%), amoksycylinę z kwasem klawulanowym (59%), sulfametoksazol z trimetoprimem (54%), ceftiofur (54%), imipenem (44%), marbofloksacylinę (43%), nitrofurantoinę (40%), chloramfenikol (34%), cefpodoksym (26%), tobramycynę (24%), gentamycynę (15%), amikacin (4%). Wśród bakterii wyizolowanych z karpia i węgorza, najpowszechniej występowały szczepy niewrażliwe na amoksycylinę z kwasem klawulanowym oraz chloramfenikol.

4.2. Tereny nieużytkowane rolniczo

W środowisku naturalnym, na terenach nie użytkowanych przez człowieka, również występują mikroorganizmy odporne na antybiotyki oraz metale ciężkie. Przykładem takiego miejsca są położone powyżej 4000 m n.p.m. podmokłe tereny Andów. Panują tam ekstremalne warunki, takie jak silne promieniowanie UV, wysoka zawartość metali ciężkich (głównie arsenu) oraz wysokie zasolenie. W roku 2008 z próbek gleb pobranych w Andach pozyskano kolekcję szczepów wykazujących silną antybiotykooporność oraz niewrażliwość na promieniowanie UV-B [22]. Wśród nich zidentyfikowano *S. saprophyticus* i *Micrococcus* sp. Większość szczepów wykazała oporność na arsen (III) w stężeniu 10 mM. Ponadto, stwierdzono oporność bakterii na antybiotyki: azytromycynę, erytromycynę,

klarytromycynę, roksytromycynę, streptomycynę, chloramfenikol, gentamycynę, kanamycynę, tetracyklinę i ampicylinę oraz wysokie minimalne stężenie hamujące wzrost bakterii (2 µg/ml) w przypadku makrolidów. Wyniki przeprowadzonych badań wskazały, że w ekstremalnych środowiskach antybiotykooporność jest również powszechna pomimo braku presji selekcyjnej związanej z obecnością antybiotyków. Kolejnym przykładem terenów nieużytkowanych rolniczo, z których wyizolowano bakterie MDR, są torfowiska w USA. W roku 2009 grupa naukowców badała próbki gleb (o przekroju 2 m) pochodzących z dwóch torfowisk w Hrabstwie Kennebec w stanie Maine, USA [98]. Z różnych głębokości warstwy korowej wyizolowano bakterie i badano je pod kątem oporności na antybiotyki i rtęć oraz obecności genu *merA*, który odpowiada za występowanie reduktazy rtęciowej, redukującej toksyczne jony Hg^{2+} do postaci pierwiastkowej Hg^0 . Mechanizm ten jest najczęstszym bakteryjnym systemem oporności na rtęć. Gen *merA* lokalizowany jest w obrębie operonu *mer*, który często występuje na MGE, takich jak transpozony i plazmidy, dzięki czemu jest łatwo przenoszony między różnymi gatunkami bakterii [98]. Co więcej, jak już wcześniej wykazano, razem z operonem *mer* przenoszone są też geny oporności na antybiotyki [99]. Wśród izolatów pozyskanych z torfowisk najczęściej występowały bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, *Rahnella* i *Paenibacillus*. Obecność genu *merA* stwierdzono u 73% izolatów ze stanowiska pierwszego i 67% izolatów z drugiego torfowiska. Oprócz oporności na rtęć u wielu izolatów stwierdzono również tolerancję na antybiotyki β-laktamowe, aminoglikozydy i cefemy. Z kolei w roku 2014 prowadzone były badania gleb pochodzących z miasta Juja w Kenii [65]. Z gleb wyizolowano bakterie i charakteryzowano je pod kątem wrażliwości na antybiotyki i metale ciężkie. Wszystkie pozyskane izolaty wykazały oporność na augmentin i cefuroksym, natomiast większość izolatów była oporna na ampicylinę oraz kotrimoksazol. Większość izolatów była również niewrażliwa na co najmniej trzy antybiotyki. Co więcej, bakterie wykazały oporność na metale ciężkie, takie jak cynk, kadm i rtęć. Wśród zidentyfikowanych szczepów, znalazły się gatunki *E. coli*, *P. aeruginosa* i *S. aureus*.

Pewna grupa naukowców postawiła pytanie, czy antybiotykooporność była również zjawiskiem powszechnym we wcześniejszych latach, kiedy antybiotyki nie były stosowane na skalę masową. Knapp i wsp. [47] badali występowanie genów niosących oporność na antybiotyki w glebach zarchiwizowanych w Instytucie Jamesa Huttona w Aberdeen w Szkocji. Pierwsza seria gleb składała się z 46 losowo wybranych próbek zbieranych w Szkocji od 1940 roku do wczesnych lat 70. Druga seria gleb składała się z próbek zebranych w 2008 roku, z działek eksperymentalnych w Hartwood,

North Lanarkshire i Auchincruive w South Ayrshire. Na działki te, w latach 1994–98, rozprowadzano osady ściekowe zawierające miedź w ilości do 200 mg/kg. Wyniki badań wykazały obecność we wszystkich badanych próbach genów kodujących oporność na antybiotyki, takie jak erytromycyna, karbapenemy i tetracyklina oraz na metale ciężkie, takie jak chrom, miedź i nikiel. Co więcej, wykazano wspólne występowanie następujących determinant oporności: tetracykliny, erytromycyny i miedzi; tetracykliny, karbapenemów i chromu oraz tetracykliny i niklu. Podczas badań próbek gleb pobranych w 2008 roku zanieczyszczonych osadami ściekowymi, wykryto większą częstość występowania genów antybiotykooporności, w porównaniu z glebami pobieranymi w latach 1940–1970. Badacze sugerują, iż zjawisko to może być związane ze wzrostem konsumpcji antybiotyków obserwowanym od końca XX wieku, co w następstwie doprowadziło do wzrostu ilości determinant warunkujących wielolekooporność w osadach ściekowych rozprowadzanych na badanym terenie [47].

4.3. Naturalne zbiorniki wodne

Presja selekcyjna wywierana przez zanieczyszczenia wód powierzchniowych, w tym jonami metali ciężkich czy antybiotykami, sprzyja HGT i przekazywaniu genów oporności, również bakteriom patogennym. Stanowi to duże zagrożenie dla zdrowia publicznego [43]. O koselekcji genów oporności w wodach rzecznych donosi wiele źródeł. Na przykład, z wód powierzchniowych rzeki Mololoa w Tepic w Meksyku wyizolowano szczepy *E. faecalis* odporne na metale ciężkie i antybiotyki [68]. Wszystkie izolaty wykazywały oporność na rtęć. W przypadku pozostałych metali 86% szczepów wykazało oporność na chrom, a 42% na kadm. Ogólny model wrażliwości na antybiotyki był następujący: cyprofloksacyna (100,0% szczepów opornych), kanamycyna (84,2%), wankomycyna (15,7%), gentamycyna (13,15%) i ampicylina (7,8%) [68]. Obecność bakterii MDR wykryto również w rzece Jamuna (Indie) [53]. Z wody pozyskano szczepy rodzaju *Pseudomonas* odporne na cały szereg metali ciężkich oraz niewrażliwe na polimyksynę B oraz tetracyklinę. Badacze potwierdzili obecność genów warunkujących wielolekooporność na plazmidach koniugacyjnych.

W 2014 roku pobrano próbki wody z rzeki Kızılırmak-Kırıkkale w Turcji, aby zbadać współwystępowanie bakteryjnej oporności na metale ciężkie i antybiotyki [43]. Profile oporności określono stosując 26 antybiotyków i 17 metali ciężkich. Spośród 290 szczepów, 24 wykazywało oporność na metale ciężkie i antybiotyki. Oporność na ołów, cynę, nikiel, bar, glin, stront, srebro i lit wahała się między 50 a 92%. Ponad 50% izolatów wykazywało oporność na cefalosporyny, chinolony, sulfonamidy i aminoglikozydy. W tym samym

roku zbadano również próbki wody z Błękitnego Nilu na terenie Etiopii [45]. Metalooporne izolaty należały do rodzajów *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Neisseria*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*. Minimalne stężenie metali ciężkich (kadm, chrom, nikiel, cynk, ołów, rtęć i miedź) hamujące wzrost szczepów wynosiło od 200 do 2300 µg/ml. Izolaty były odporne na wiele antybiotyków, takich jak: chloramfenikol, cefoksytyna, kotrimoksazol, erytromycyna, cyprofloksacyna, gentamycyna, kwas naldyksowy, tetracyklina i wankomycyna. Obserwowano statystycznie istotną korelację między opornością na metal i opornością na antybiotyk wśród szczepów bakteryjnych [45].

Bardzo bogatym rezerwuarem szczepów bakterii MDR okazały się również wody morskie. W roku 2010 tureccy naukowcy zbadali wodę pobraną z Zatoki Iskenderun (Morze Śródziemne, Turcja) [64]. Pozykali szczepy bakterii rodzaju *Aeromonas* i *Pseudomonas*, które wykazały oporność na antybiotyki i metale ciężkie. Wysoki odsetek izolatów *Aeromonas* wykazywał brak wrażliwości na cefazolin i sulfametoksazol z trimetoprimem. Wśród izolatów *Pseudomonas* często występowała oporność na nitrofurantoinę (86,2% izolatów), cefazolin (84,8% izolatów) i cefuroksym (71,7% izolatów). Dodatkowo, większość izolatów wykazywała tolerancję na różne stężenia metali ciężkich, a minimalne stężenia hamujące wahały się od 25 do powyżej 3200 µg/ml. *Aeromonas* sp. i *Pseudomonas* sp. wykazały również wysoką oporność na miedź, odpowiednio 98,3% i 75,4% oraz niską oporność na ołów, odpowiednio 1,7% i 7,2%. W 2012 roku Matyar [63] badał także izolaty pobrane ze wschodniego wybrzeża Morza Śródziemnego. Zbadano wrażliwość 255 Gram-ujemnych izolatów bakteryjnych na 16 różnych antybiotyków i pięć metali ciężkich. Najczęstszymi gatunkami izolowanymi ze wszystkich próbek były *Citrobacter koseri* (9,0%), *E. coli* (8,2%) i *Pantoea agglomerans* (8,2%). Wyniki wykazały wysoką częstość występowania oporności na ampicylinę (74,0%), streptomycynę (70,0%) i cefazolinę (48,3%). Badane szczepy wykazały również tolerancję na metale ciężkie, takie jak chrom (3,0%), kadm (78,0%), mangan (3,5%), miedź (68,9%) oraz ołów (1,9%) [64].

4.4. Endosfera roślinna

Mikroorganizmy zasiedlające wewnętrzne tkanki oraz przestrzenie międzykomórkowe roślin, nie wywołujące oznak patogenezы, nazwano endofitami [36]. Endofity izolowane są powszechnie z roślin zielnych [31–33, 87]. Pierwsze prace dotyczące izolacji mikroorganizmów endofitycznych niosących oporność na metale ciężkie zaczęły pojawiać się około roku 2004. Wtedy to swoje badania opublikował Idris i wsp. [44],

który wyizolował bakterie endofityczne z wnętrza rośliny będącej hiperakumulatorem niklu – *Thlaspi goesingense* Halácsy. Badania prowadzono na terenach wschodniej Austrii, gdzie ogólna zawartość niklu w kilogramie gleby wynosiła 2,5 mg. W jednym gramie nadziemnych części roślinnych oznaczono od $2,2 \times 10^3$ do $5,6 \times 10^2$ jtk bakterii opornych na nikiel. Badacze zaklasyfikowali izolaty do klasy *Alfaproteobacteria* oraz do bakterii Gram-dodatnich. 42% izolatów wykazało wysoki stopień podobieństwa do gatunku *Methylobacterium mesophilicum*, a 37% do *Sphingomonas* sp. Pozostałe izolaty wykazały podobieństwo do rodzajów: *Rhodococcus*, *Curtobacterium* i *Plantibacter*. El-Deeb i wsp. [25, 26] wyizolowali endofityczne bakterie zaklasyfikowane do rodzaju *Enterobacter* z rośliny wodnej *Eichhornia crassipes* występującej powszechnie w Egipcie. Badane szczepy bakterii wykazały oporność na metale ciężkie (cynk, kadm i ołów) oraz były zdolne do wzrostu w obecności ampicyliny (100 µg/ml), kanamycyny (100 µg/ml) oraz tetracykliny (20 µg/ml). Co ciekawe, z uzyskanych bakterii udało się wyizolować plazmidy i w wyniku dalszych badań potwierdzono, że plazmid o wielkości 98 kb determinował oporność bakterii na cynk, kadm oraz ampicylinę i kanamycynę. Z kolei w roku 2008 opublikowano badania dotyczące izolacji bakterii endofitycznych z roślin rzepaku (*Brassica napus*) rosnących na przedmieściach Nanjing w Chinach [91]. Na terenach, z których pobierano rośliny, oznaczono najwyższą zawartość ołowiu (216,5 mg/kg) oraz cynku (204,5 mg/kg). Z roślin rzepaku pozyskano bakterie odporne m.in. na ołów, wśród których dominowały szczepy oznaczone jako *Microbacterium* sp. oraz *P. fluorescens*. Dalsza charakterystyka wykazała, że bakterie mogą promować wzrost roślin, ponieważ produkują hormony roślinne, prowadzą do rozpuszczenia ołowiu, produkują siderofory oraz produkują deaminazę kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego. Co więcej, wykazano, że bakterie nie są wrażliwe na badane antybiotyki, takie jak ampicylina, kanamycyna, spektynomycyna oraz streptomycyna. Szczepy endofityczne rosły w obecności takich czynników stresowych, jak: ampicylina (100 µg/ml), kanamycyna (20 µg/ml) i spektynomycyna (20 µg/ml). Dodatkowo, szczep *P. fluorescens* rósł w obecności streptomycyny (20 µg/ml). Kolejna praca w której eksperymentalnie potwierdzono brak wrażliwości endofitów na antybiotyki ukazała się w 2015 roku [52]. Badaniom poddano roślinę będącą hiperakumulatorem cynku i kadmu, *Sedum plumbizincicola*. Wśród wyizolowanych bakterii zidentyfikowano *Achromobacter* sp., *Bacillus* sp., *B. pumilus* oraz *Stenotrophomonas* sp. Endofity wykazały oporność na cynk, kadm i ołów oraz brak wrażliwości na antybiotyki.

W latach 2009–2018 opublikowano kolejne prace badawcze dotyczące izolacji bakterii endofitycznych

z endosfery roślin rosnących na terenach skażonych metalami ciężkimi (Tab. II). Wśród przebadanych metalofitów znalazły się takie gatunki jak: olsza twarda (*Alnus firma*), smagliczka (*Alyssum serpyllifolium*), komelina pospolita (*Commelina communis*), elszolcja (*Elsholtzia splendens*), tytoń szlachetny (*Nicotiana tabaccum* L.), rdest (*Polygonum pubescens*), orliczka (*Pteris vittata*), psianka czarna (*Solanum nigrum* L.) oraz kukurydza zwyczajna (*Zea mays*). Z roślin izolowano najczęściej bakterie klasyfikowane jako *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Microbacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Rahnella* sp., *Serratia* sp., *Stenotrophomonas* sp. (Tab. II) [25, 26, 40, 44, 51, 52, 62, 91, 92, 94, 97, 109].

5. Współwystępowanie genów oporności w różnych genomach środowiskowych

Technika analizy DNA izolowanego bezpośrednio z badanego środowiska, rozwój metod sekwencjonowania nowej generacji (NGS, Next Generation Sequencing) oraz rozwój narzędzi bioinformatycznych służących do analizy danych umożliwił poznanie niezbadanych dotąd środowisk. Badania metagenomiczne dowiodły występowania genów oporności na antybiotyki i metale ciężkie lub biocydy m.in. w takich środowiskach jak naturalne zbiorniki wodne oraz ścieki [5, 15, 17, 18, 24, 35, 102–106]. Ponadto, stosując zaawansowane narzędzia bioinformatyczne, potwierdzono współwystępowanie genów ARG oraz MRG (metal resistance genes) w różnych genomach środowiskowych [103, 104].

Zespół naukowców pod kierunkiem Yuyi Yang opublikował niedawno wyniki analizy metagenomicznej jezior i wód morskich [105, 106]. Badacze pracowali na 122 metagenomach pochodzących z jezior (92 genomy) oraz wód morskich (30 genomów). Dane pozyskano z bazy SRA (Sequence Read Archive). Pozyskane sekwencje następnie analizowano w bazach danych SARG (Structured Antibiotic Resistance Database) oraz BacMet (Antibacterial Biocide & Metal Resistance Genes Database) [75, 76]. Celem badań była analiza współwystępowania ARG i MRG w morzach i jeziorach oraz określenie wpływu stratyfikacji termicznej wody w jeziorach i położenia geograficznego jezior na liczbę i skład ARG i MRG. Co więcej, badano rozmieszczenie ARG i MRG w morzach w strefie przybrzeżnej, w strefie wód głębokich i w wodach Antarktydy. Badane genomy pochodziły z następujących regionów: Antarktyki, Brazylii, Finlandii, Kanady, Malawi, Rosji, Rwandy, Szwecji i USA. W próbach pochodzących ze wszystkich badanych środowisk dominowały sekwencje genów oporności wielolekowej oraz genów oporności na bacytracynę (warianty genu *bacA*). W przy-

Tabela II
Profil oporności bakterii endofitycznych

Rodzaj/gatunek bakterii endofitycznej	Źródło izolacji bakterii	Oporność bakterii na antybiotyki	Oporność bakterii na metale ciężkie	Piśmiennictwo
<i>Achromobacter</i> sp.	<i>Sedum plumbizincicola</i>	nb	cynk, kadm, ołów	[52]
<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Elsholtzia splendens</i>	nb	miedź	[94]
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Alnus firma Sedum plumbizincicola</i>	nb	cynk, kadm, ołów	[52, 92]
<i>B. pumilus</i>	<i>Sedum plumbizincicola</i>	nb	cynk, kadm, ołów	[52]
<i>Curtobacterium</i> sp.	<i>Thlaspi goesingense</i> Halácsy	nb	nikiel	[44]
<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Eichhornia crassipes</i>	ampicylina, kanamycyna, tetracyklina	cynk, kadm, ołów	[25, 26]
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	<i>Thlaspi goesingense</i> Halácsy	nb	nikiel	[44]
<i>Microbacterium</i> sp.	<i>Brassica napus</i>	ampicylina, kanamycyna, spektynomycyna	cynk, kadm, miedź, nikiel, ołów	[91]
<i>Plantibacter</i> sp.	<i>Thlaspi goesingense</i> Halácsy	nb	nikiel	[44]
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Alyssum serpyllifolium</i>	nb	nikiel	[52]
<i>P. fluorescens</i>	<i>Brassica napus</i>	ampicylina, kanamycyna, spektynomycyna, streptomycyna	cynk, kadm, ołów	[91]
<i>Rahnella</i> sp.	<i>Polygonum pubescens</i> <i>Zea mays</i>	nb	cynk, kadm, ołów	[40]
<i>Rhodococcus</i> sp.	<i>Thlaspi goesingense</i> Halácsy	nb	nikiel	[44]
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Pteris vittata</i>	nb	wanad	[97]
<i>Sphingomonas</i> sp.	<i>Thlaspi goesingense</i> Halácsy	nb	nikiel	[44]
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	<i>Sedum plumbizincicola</i>	ampicylina, chloramfenikol, kanamycyna, streptomycyna, tetracyklina	cynk, kadm, ołów	[52]

nb – nie badano

padku MRG, dominowały geny oporności na arsen, rtęć oraz miedź. W genomach pochodzących z jezior wykryto większą liczbę ARG w porównaniu z genomami pochodzącymi z mórz. Analizy wykazały, iż przybrzeżna woda morska wykazuje większą bioróżnorodność oraz liczbę ARG i MRG w porównaniu z wodą głębokich oceanów, czy antarktyczną wodą morską. Z kolei stratyfikacja termiczna nie wpłynęła na liczbę ARG. Jednakże w epilimnionie zaobserwowano większą różnorodność ARG oraz więcej MRG niż w głębszych strefach jezior. Wykazano również, iż położenie geograficzne ma istotny wpływ na różnorodność genów oporności, natomiast nie wpływa na ich ilość. Analiza korelacji Spearmana pozwoliła oszacować prawdopodobieństwo współwystępowania genów ARG i MRG w badanych genomach środowiskowych. W przypadku jezior wyodrębniono 14 grup genów wspólnie występujących, natomiast dla wody morskiej wyodrębniono 2 grupy. W obrębie 14 grup wyznaczono m.in. wspólnie występujące warianty genu *bla*_{TEM} (oporność na β-laktamy), warianty genu *mer* (oporność na rtęć), geny *cusR* (oporność na miedź) i *silR* (oporność na srebro) oraz współwystępowanie genów warunkujących wielolekooporność i oporność na metale ciężkie. Z kolei w przypadku analizy genomów morskich, współwystępowanie wykryto m.in. w przypadku wariantów genów nadających oporność na bacytracynę, chloramfenikol,

polimyksynę, sulfonamidy i tetracyklinę [105, 106].

Po roku 2013 pojawiły się liczne prace potwierdzające występowanie ARG oraz MRG w ściekach [17, 34, 49, 67]. Co więcej, zidentyfikowano w ściekach ruchome elementy genetyczne, które mogą promować rozprzestrzenianie determinant oporności wśród bakterii [67].

W 2013 roku w Hongkongu prowadzono badania na terenie dwóch oczyszczalni ścieków bytowo-gospodarczych, w których dziennie oczyszczanych jest 230 000 m³ ścieków – oczyszczalnia Shatin oraz 93 000 m³ ścieków – oczyszczalnia Shek Wu Hui [49]. Z pobranych prób izolowano DNA plazmidowe i wykonano sekwencjonowanie z wykorzystaniem sekwencjonatora HiSeq2000 (Illumina). Uzyskane odczyty sekwencjonowania filtrowano i analizowano *in silico* z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych oraz ogólnie dostępnych baz danych, takich jak ARDB (Antibiotic Resistance Genes Database), BacMet [50, 76]. Badacze uzyskali 6 metagenomów plazmidowych, w których zlokalizowali 48 989 odczytów pasujących do ARG oraz 16 435 odczytów MRG. Wykryto 18 typów ARG, z czego najbardziej powszechnym typem były geny oporności na tetracyklinę (29% odczytów), następnie geny oporności na chinolony (17% odczytów), β-laktamy (12% odczytów), aminoglikozydy (10% odczytów) i makrolidy-linkozamidy-streptograminy

(10% odczytów). W przypadkach MRG, najpowszechniej zidentyfikowanymi typami genów były geny oporności na cynk (22% odczytów) i miedź (20% odczytów), a rzadziej występującymi geny oporności na kobalt (11% odczytów) oraz arsen (11% odczytów).

6. Podsumowanie

Właściwości antybiotyków oraz metali ciężkich spowodowały włączenie ich do różnych obszarów działalności ludzkiej, takich jak medycyna, weterynaria, czy rolnictwo. Następstwem wieloletniego stosowania na szeroką skalę tych związków był wzrost ich stężenia w środowisku i tym samym, wywieranie stałej presji selekcyjnej wobec poszczególnych mikroorganizmów wchodzących w skład mikrobiomów występujących w danym środowisku. Dane literaturowe wskazują, że warunki stresowe panujące na terenach zanieczyszczonych, mogą promować rekombinacje genetyczne i HGT, co sprzyja powstawaniu nowych mechanizmów oporności i rozprzestrzenianiu się ARG [57, 59]. Plazmidy mogą zawierać także geny, zapewniające zdolność do przeżycia w obecności związków toksycznych takich jak np. substancje ropopochodne, detergenty, metale ciężkie i pestycydy, co ze względu na rosnące wciąż zanieczyszczenie środowiska faworyzuje przeżycie bakterii niosących takie plazmidy [57, 58, 60, 61, 83]. Dowiedziono, że zanieczyszczenie metalami ciężkim sprzyja selekcji szczepów opornych [4, 57]. Wykazano również, że oporność krzyżowa na metale ciężkie i antybiotyki związana z koselekcją genów czyli obecnością na plazmidzie genów oporności na antybiotyki i metale, powoduje utrzymanie się oporności na antybiotyki, nawet w przypadku ich nieobecności w środowisku skażonym metalami [57]. Jak się okazało zjawisko to niesie ze sobą zagrożenia dla zdrowia a nawet życia ludzkiego. Powszechne stosowanie antybiotyków oraz soli metali ciężkich w medycynie spowodowało pojawienie się szczepów bakterii MDR, co jest obecnie jednym z największych problemów zdrowotnych na świecie. Z kolei stosowanie antybiotyków i soli metali ciężkich w rolnictwie spowodowało pojawienie się i włączenie bakterii MDR do łańcucha pokarmowego. Występowanie szczepów MDR w różnych środowiskach pozaklinicznych to problem z jakim aktualnie się spotykamy. Tereny zanieczyszczone metalami ciężkimi oraz przede wszystkim rośliny zasiedlające takie tereny, tzw. metalofity, to nowe źródło izolacji szczepów bakterii opornych na antybiotyki i metale ciężkie. Je również należy rozpatrywać jako potencjalne zagrożenie dla człowieka ponieważ mogą stanowić źródło szczepów MDR. Metalofity wykorzystywane w procesach fitoekstrakcji powinny być traktowane jako materiał toksyczny. Powinny zatem zostać poddane

sucheniu i spaleniu w specjalnych miejscach przeznaczonych na utylizację odpadów toksycznych. Jedynie takie postępowanie nie dopuści do wygenerowania przez człowieka kolejnego niekontrolowanego źródła antybiotykooporności. Co więcej, odkrycie endofitów metalofilnych zwróciło uwagę na ich ogromny potencjał aplikacyjny i możliwość wykorzystania do intensyfikacji procesów fitoekstrakcji. Rozpatrywana jest możliwość przenoszenia genów oporności na metale ciężkie pozyskiwanych z endofitów metalofilnych do roślin-hiperakumulatorów. W przypadku wdrożenie na skalę światową takich rozwiązań i nieodpowiedniego sposobu utylizacji materiału roślinnego, może dojść do wzbogacenia środowiska w kolejną pulę genów determinujących antybiotykooporność.

O problemie bakteryjnej oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe (AMR, antimicrobial resistance) dyskutowała Organizacja Narodów Zjednoczonych ONZ, która w październiku 2016 roku zatwierdziła uchwałę dotyczącą konieczności zredukowania spożycia antybiotyków i ograniczenia czynników sprzyjających rozprzestrzenianiu się AMR. Zwalczanie antybiotykooporności to jedno z głównych założeń tzw. strategii „One Health” (One Health approach). Strategia One Health zaleca do monitorowania środowiska i prowadzenia wspólnych badań przez specjalistów z wielu dziedzin, takich jak zdrowie publiczne, weterynaria czy ochrona środowiska. Przykładem programów międzynarodowych, w ramach których prowadzone są badania dotyczące antybiotykooporności są: program JPIAMR (Joint Programming Initiative on Microbial Resistance) i tu np. INART (Intervention of antimicrobial resistance transfer into the food chain), czy BiodivERSA (Biodiversity and its influence on animal, human and plant health). Wspólnym celem ma być projektowanie i wdrażanie programów informacyjnych, badawczych oraz ustawodawstwo służące poprawie zdrowia publicznego. Jako priorytetowe działania, obok zwalczanie antybiotykooporności ustalono wzrost bezpieczeństwa żywności oraz kontrolę chorób odzwierzęcych.

Piśmiennictwo

1. Akinbowale O.L., Peng H., Grant P., Barton M.D.: Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **30**, 177–182 (2007)
2. Alanis A.J.: Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch. Med. Res.* **36**, 697–705 (2005)
3. Aminov R.I.: The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ. Microbiol.* **11**, 2970–2988 (2009)
4. Baker-Austin C., Wright M., Stepanauskas R., McArthur J.: Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.* **14**, 176–182 (2006)
5. Bengtsson-Palme J., Boulund F., Fick J., Kristiansson E., Larsson D.G.: Shotgun metagenomics reveals a wide array of antibiotic

- resistance genes and mobile elements in a polluted lake in India. *Front. Microbiol.* **5**, 1–15 (2014)
6. Bernier S.P., Surette M.G.: Concentration-dependent activity of antibiotics in natural environments. *Front. Microbiol.* **4**, 1–14 (2013)
 7. Bruins M.R., Kapil S., Oehme F.W.: Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **45**, 198–207 (1999)
 8. Burmeister A.R.: Horizontal gene transfer. *Evolution, medicine, and public health*, **1**, 193–194 (2015)
 9. Caille O., Rossier C., Perron K.: A copper-activated two component system interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **189**, 4561–4568 (2007)
 10. Campos J., Cristiano L., Peixe L., Antunes P.: MCR-1 in multi-drug-resistant and copper-tolerant clinically relevant *Salmonella* 1, 4,[5], 12:i:- and S. Rissen clones in Portugal, 2011 to 2015. *Eurosurveillance*, **21**, 1–5 (2016)
 11. Cantas L., Shah S.Q.A., Cavaco L.M., Mania C., Walsh F., Popowska M., Garelick H., Bürgmann H., Sørum H.: A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. *Front. Microbiol.* **4**, 1–14 (2013)
 12. Carattoli A.: Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet. Res.* **32**, 243–259 (2001)
 13. Chang Q., Wang W., Regev-Yochay G., Lipsitch M., Hanage W.P.: Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? *Evol. Appl.* **8**, 240–247 (2015)
 14. Chapman J.S.: Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *Int. Biodeter. Biodegr.* **51**, 271–276 (2003)
 15. Chauhan N. S., Nain S., Sharma R.: Identification of arsenic resistance genes from marine sediment metagenome. *Indian. J. Microbiol.* **57**, 299–306 (2017)
 16. Conroy O., Kim E.H., McEvoy M.M., Rensing C.: Differing ability to transport nonmetal substrates by two RND-type metal exporters. *FEMS Microbiol. Lett.* **308**, 115–122 (2010)
 17. Czekalski N., Díez E. G., Bürgmann H.: Wastewater as a point source of antibiotic-resistance genes in the sediment of a freshwater lake. *ISME J.* **8**, 1381–1390 (2014)
 18. Czekalski N., Sigdel R., Birtel J., Matthews B., Bürgmann H.: Does human activity impact the natural antibiotic resistance background? Abundance of antibiotic resistance genes in 21 Swiss lakes. *Environ. Int.* **81**, 45–55. (2015)
 19. Cytryn E., Markiewicz Z., Popowska M.: Antibiotics and antibiotics resistance genes dissemination in soils. (w) Antibiotics and antibiotics resistance genes in soils. Soil Biology, red. Hashmi M., Strezov V., Varma A. (red) tom 51, Springer, Cham, 2017
 20. Das S. N., Mandal S., Mandal M.: Plasmid mediated antibiotic and heavy metal co-resistance in bacterial isolates from mahandanda river water (Malda, India). *Transl. Med. (Sunnyvale)*. **6**, 2161–1025 (2016)
 21. D'costa V. M., McGrann K.M., Hughes D. W., Wright G.D.: Sampling the antibiotic resistome. *Science*, **311**, 374–377 (2006)
 22. Dib J., Motok J., Zenoff V. F., Ordoñez O., Farias M. E.: Occurrence of resistance to antibiotics, UV-B, and arsenic in bacteria isolated from extreme environments in high-altitude (above 4400 m) Andean wetlands. *Curr. Microbiol.* **56**, 510–517 (2008)
 23. Di Cesare A., Eckert E., Corno G.: Co-selection of antibiotic and heavy metal resistance in freshwater bacteria. *J. Limnol.* **75**, 59–66 (2016)
 24. Edwardson C. F., Hollibaugh J. T.: Metatranscriptomic analysis of prokaryotic communities active in sulfur and arsenic cycling in Mono Lake, California, USA. *ISME J.* **11**, 2195–2208 (2017)
 25. El-Deeb B.A., El-Sharouny H.M., Fahmy N.: Plasmids incidence, antibiotic and heavy metal resistance patterns of endophytic bacteria isolated from aquatic plant, *Eichhornia crassipes*. *J. Bot.* **33**, 151–171 (2006)
 26. El-Deeb B.: Plasmid mediated tolerance and removal of heavy metals by *Enterobacter* sp. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* **5**, 47–53 (2009)
 27. Erdem B., Dayangaç A., Şahin İ.: The presence of metals and antibiotics resistant bacteria in arable manure soils. *Acta Phys. Pol. A*, **132**, 570–571 (2017)
 28. Essa A., Julian D., Kidd S., Brown N., Hobman J.: Mercury resistance determinants related to Tn21, Tn1696, and Tn5053 in enterobacteria from the preantibiotic era. *Antimicrob. Agents Ch.* **47**, 1115–1119 (2003)
 29. Frost L.S., Leplae R., Summers A.O., Toussaint A.: Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 722–732 (2005)
 30. Gaze W. H., Zhang L., Abdouslam N.A., Hawkey P.M., Calvo-Bado L., Royle, J., Wellington E. M.: Impacts of anthropogenic activity on the ecology of class 1 integrons and integron-associated genes in the environment. *ISME J.* **5**, 1253 (2011)
 31. Goryluk A., Rekosz-Burlaga H., Błaszczuk M.: Isolation and characterization of bacterial endophytes of *Chelidonium majus* L. *Pol. J. Microbiol.* **58**, 355–361 (2009)
 32. Goryluk-Salmonowicz A., Piorek M., Rekosz-Burlaga H., Studnicki M., Błaszczuk M.: Endophytic detection in selected european herbal plants. *Pol. J. Microbiol.* **65**, 369–375 (2016)
 33. Goryluk-Salmonowicz A., Orzeszko-Rywka A., Piórek M., Rekosz-Burlaga H., Otlowska A., Gozdowski D., Błaszczuk M.: Plant growth promoting bacterial endophytes isolated from Polish herbal plants. *Acta Sci. Pol-Hortoru.* **17**, 101–110 (2018)
 34. Guo J., Li J., Chen H., Bond P. L., Yuan Z.: Metagenomic analysis reveals wastewater treatment plants as hotspots of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements. *Water Res.* **123**, 468–478 (2017)
 35. Hao S., Yang P., Han M., Xu J., Yu S., Chen C., Ning K.: Data-mining of antibiotic resistance genes provides insight into the community structure of ocean microbiome. *BioRxiv*, DOI:10.1101/246033 (2018)
 36. Hardoim P.R., van Overbeek L.S., van Elsas J.D.: Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.* **16**, 463–471 (2008)
 37. Harrison J.J., Tremaroli V., Stan M.A., Chan C.S., Vacchi-Suzzi C., Heyne B.J., Parsek M.R., Ceri H., Turner R.J.: Chromosomal anti-oxidant genes have metal ion-specific roles as determinants of bacterial metal tolerance. *Environ. Microbiol.* **11**, 2491–2509 (2009)
 38. Hasman H., Aarestrup F.M.: TcrB, a gene conferring transferable copper resistance in *Enterococcus faecium*: occurrence, transferability, and linkage to macrolide and glycopeptide resistance. *Antimicrob. Agents Ch.* **46**, 1410–1416 (2002)
 39. Hayashi S., Abe M., Kimoto M., Furukawa S., Nakazawa T.: The DsbA-DsbB disulfide bond formation system of *Burkholderia cepacia* is involved in the production of protease and alkaline phosphatase, motility, metal resistance, and multidrug resistance. *Microbiol. Immunol.* **44**, 41–50 (2000)
 40. He H., Ye Z., Yang D., Yan J., Xiao L., Zhong T., Yuan M., Cai X., Fang Z., Jing Y.: Characterization of endophytic *Rahnella* sp. JN6 from *Polygonum pubescens* and its potential in promoting growth and Cd, Pb, Zn uptake by *Brassica napus*. *Chemosphere*, **90**, 1960–1965 (2013)
 41. Hobman J.L., Crossman L.C.: Bacterial antimicrobial metal ion resistance. *J. Med. Microbiol.* **64**, 471–497 (2015)
 42. Issazadeh K., Jahanpour N., Pourghorbanali F., Raeisi G., Faekhondeh J.: Heavy metals resistance by bacterial strains. *Ann. Biol. Res.* **4**, 60–63 (2013)

43. Içgen B., Yılmaz F.: Co-occurrence of antibiotic and heavy metal resistance in Kızılırmak river isolates. *B. Environ. Contam. Tox.* **93**, 735–743 (2014)
44. Idris R., Trifonova R., Puschenreiter M., Wenzel W.W., Sessitsch A.: Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Appl. Environ. Microb.* **70**, 2667–2677 (2004)
45. Kalayu G., Ahemad M.: Incidence of heavy metal and antibiotic resistance in bacterial isolates from Blue Nile river water in Ethiopian region. *Int. J. Environ. Stud.* **71**, 546–569 (2014)
46. Karimi A., Sadeghi G., Vaziry A.: The effect of copper in excess of the requirement during the starter period on subsequent performance of broiler chicks. *J. Appl. Poultry Res.* **20**, 203–209 (2011)
47. Knapp C.W., McCluskey S.M., Singh B.K., Colin D.C., Hudson G., Graham W.D.: Antibiotic resistance gene abundances correlate with metal and geochemical conditions in archived Scottish soils. *PLoS One*, **6**, 1–6 (2011)
48. Levy S.B., Marshall B.: Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* **10**, S122 (2004)
49. Li A. D., Li L. G., Zhang T.: Exploring antibiotic resistance genes and metal resistance genes in plasmid metagenomes from wastewater treatment plants. *Front. Microbiol.* DOI: 10.3389/fmicb.2015.01025 (2015)
50. Liu B., Pop M.: ARDB – antibiotic resistance genes database. *Nucleic Acids Res.* **37**, D443–D447 (2009)
51. Luo S.L., Chen L., Chen J.L., Xiao X., Xu T.Y., Wan, Y., Rao C., Liu C., Liu Y., Lai C., Zeng G.: Analysis and characterization of cultivable heavy metal-resistant bacterial endophytes isolated from Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their potential use for phytoremediation. *Chemosphere*, **85**, 1130–1138 (2011)
52. Ma Y., Oliveira R.S., Nai F., Rajkumar M., Luo Y., Rocha I., Freitas H.: The hyperaccumulator *Sedum plumbizincicola* harbors metal-resistant endophytic bacteria that improve its phytoextraction capacity in multi-metal contaminated soil. *J. Environ. Manage.* **156**, 62–69 (2015)
53. Malik A., Aleem A.: Incidence of metal and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from the river water, agricultural soil irrigated with wastewater and groundwater. *Environ. Monit. Assess.* **178**, 293–308 (2011)
54. Manaia C.M., Rocha J., Scaccia N., Marano R., Radu E., Biancullo F., Cerqueira F., Fortunato G., Iakovi des I.C., Zammit I., Kampouris I., Vaz-Moreira I., Nunes O.C.: Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: Tackling the black box. *Environ. Int.* **115**, 312–324 (2018)
55. Manyi-Loh C., Mamphweli S., Meyer E., Okoh A.: Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: potential public health implications. *Molecules*, **23**, 795 (2018)
56. Marano R., Cytryn E.: The mobile resistome in wastewater treatment facilities and downstream environments. (w) Antimicrobial resistance in wastewater treatment processes, red. Keen PL I Fugere R. John Wiley I Sons, 2017, s. 129–155
57. Martínez J.L.: Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science*, **321**, 365–367 (2008)
58. Martínez J.L.: The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *P. Roy. Soc. B-Biol. Sci.* **276**, 2521–2530 (2009)
59. Martínez J.L., Baquero F.: Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space. *Upsala J. Med. Sci.* **119**, 68–77 (2014)
60. Martínez J.L., Coque T.M., Baquero F.: What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 116–123 (2015)
61. Martínez J.L.: Ecology and evolution of chromosomal gene transfer between environmental microorganisms and pathogens. *Microbiol. Spectr.*, **6**, 110–124 (2018)
62. Mastretta C., Taghavi S., Van Der Lelie D., Mengoni A., Galardi F., Gonnelli, C., Vangronsveld, J.: Endophytic bacteria from seeds of *Nicotiana tabacum* can reduce cadmium phytotoxicity. *Int. J. Phytoremediat.* **11**, 251–267 (2009)
63. Mata M., Baquero F., Perez-Diaz J.: A multidrug efflux transporter in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* **187**, 185–188 (2000)
64. Matyar F., Akkan T., Uçak Y., Eraslan B.: *Aeromonas* and *Pseudomonas*: antibiotic and heavy metal resistance species from Iskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea). *Environ. Monit. Assess.* **167**, 309–320 (2010)
65. Mbudambula N.L., Kinyua D.M.: Antibiotic resistance of metal tolerant bacteria isolated from soil in Jula, Kenya. *Sci. Confer. Proc.* (2014)
66. McIntosh D., Cunningham M., Baijing J., Fekete F., Parry E., Clark S., Zalinger Z., Glig I., Danner R., Johnson K., Beattie M. Transferable, multiple antibiotic and mercury resistance in Atlantic Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* is associated with carriage of an IncA/C plasmid similar to the *Salmonella enterica* plasmid pSN254. *J. Antimicrob. Chemoth.* **61**, 1221–1228 (2008)
67. Michael I., Rizzo L., Mc Ardell C. S., Manaia C. M., Merlin C., Schwartz T., Fatta-Kassinos D.: Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: a review. *Water research*, **47**, 957–995 (2013)
68. Mondragón V.A., Llamas-Pérez D.F., González-Guzmán G.E., Márquez-González A.R., Padilla-Noriega R., de Jesús Durán-Avelar M., Franco B.: Identification of *Enterococcus faecalis* bacteria resistant to heavy metals and antibiotics in surface waters of the Mololoa River in Tepic, Nayarit, Mexico. *Environ. Monit. Assess.* **183**, 329–340 (2011)
69. Munita J.M., Arias C.A.: Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol. Spectr.* **4**, 1–37 (2016)
70. Nielsen F.H.: History of zinc in agriculture. *Adv. Nutr.* **3**, 783–789 (2012)
71. Nikonorow E., Baraniak A., Gniadkowski M.: Oporność bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* na antybiotyki β -laktamowe wynikająca z wytwarzania β -laktamaz. *Post. Mikrobiol.* **52**, 261–271 (2013)
72. Ociepa-Kubicka A., Ociepa E.: Toksyczne oddziaływanie metali ciężkich na rośliny, zwierzęta i ludzi. *Inżynieria i ochrona środowiska*, **15**, 169–180 (2012)
73. Oleńska E., Małek W.: Mechanizmy oporności bakterii na metale ciężkie. *Post. Mikrobiol.* **4**, 363–371 (2013)
74. Osman O., Tanguichi H., Ikeda K., Park P., Tanabe-Hosoi S., Nagata S.: Copper-resistant halophilic bacterium isolated from the polluted Maruit Lake, Egypt. *J. Appl. Microbiol.* **108**, 1459–1470 (2010)
75. Pal C., Bengtsson-Palme J., Rensing C., Kristiansson E., Larsson D.J.: BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database. *Nucleic Acids Res.* **42**, D737–D743 (2014)
76. Pal C., Bengtsson-Palme J., Kristiansson E., Larsson D.: Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC Genomics*, **16**, 1–14 (2015)
77. Piotrowska M., Popowska M.: The prevalence of antibiotic resistance genes among *Aeromonas* species in aquatic environments. *Ann. Microbiol.* **64**, 921–934 (2014)
78. Piotrowska M., Przygodzińska D., Matyjewicz K., Popowska M.: Occurrence and variety of β -lactamase genes among *Aeromonas* spp. isolated from urban wastewater treatment plant. *Front. Microbiol.* **8**, 1–12 (2017)

79. Piotrowska M., Rzczycka M., Ostrowski R., Popowska M.: Diversity of antibiotic resistance among bacteria isolated from sediments and water of carp farms located in a Polish nature reserve. *Pol. J. Environ. Stud.* **26**, 239–252 (2017)
80. Piotrowska M., Kowalska S., Popowska M.: Diversity of β -lactam resistance genes in gram-negative rods isolated from a municipal wastewater treatment plant. *Ann. Microbiol.* 1–11 (2019)
81. Poole K.: Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *J. Appl. Microbiol.* **92**, 55S–64S (2002)
82. Popowska M.: Antybiotykooporność w środowisku naturalnym – przyczyny i konsekwencje. *Kosmos*, **66**, 81–91 (2017)
83. Popowska M., Krawczyk-Balska A.: Broad-host-range IncP-1 plasmids and their resistance potential. *Front. Microbiol.* **4**, 1–8 (2013)
84. Popowska M., Miernik A., Rzczycka M., Łopaciuk A.: The impact of environmental contamination with antibiotics on levels of resistance in soil bacteria. *J. Environ. Qual.* **39**, 1679–1687 (2010)
85. Popowska M., Rzczycka M., Miernik A., Krawczyk-Balska A., Walsh F., Duffy B.: Influence of soil use on prevalence of tetracycline, streptomycin, and erythromycin resistance and associated resistance genes. *Antimicrob. Agents Ch.* **56**, 1434–1443 (2012)
86. Pruden A., Larsson D.G., Amézquita A., Collignon P., Brandt K.K., Graham D.W., Lazorchak J.M., Suzuki S., Silley P., Snape J.R., Topp E., Zhang T., Zhu Y.G.: Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. *Environ. Health Perspect.* **121**, 878–885 (2013)
87. Rekosz-Burlaga H., Borys M., Goryluk-Salmonowicz A.: Cultivable microorganisms inhabiting the aerial parts of *Hypericum perforatum*. *Acta Sci. Pol-Hortoru.* **13**, 117–129 (2014)
88. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) 1831/2003 z dnia 22 września 2003 r. w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt.
89. Schlüter A., Szczepanowski R., Pühler A., Top E.M.: Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**, 449–477 (2007)
90. Seiler C., Berendonk T. U.: Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front. Microbiol.* **3**, 399 (2012)
91. Sheng X.F., Xia J.J., Jiang C.Y., He L.Y., Qian M.: Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environ. Pollut.* **156**, 1164–1170 (2008)
92. Shin M.N., Shim J., You Y., Myung H., Bang K.S., Cho M., Kamala-Kanna S., Oh B.T.: Characterization of lead resistant endophytic *Bacillus* sp. MN3-4 and its potential for promoting lead accumulation in metal hyperaccumulator *Alnus firma*. *J. Hazard. Mater.* **199**, 314–320 (2012)
93. Stepanauskas R., Glenn T., Jagoe C., Tuckfield R., Lindell A., McArthur J.: Elevated microbial tolerance to metals and antibiotics in metal-contaminated industrial environments. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 3671–3678 (2005)
94. Sun L.N., Zhang Y.F., He L.Y., Chen Z.J., Wang Q.Y., Qian M., Sheng X.F.: Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland. *Bioresource Technol.* **101**, 501–509 (2010)
95. Thomsen P.T.: Efficacy of copper sulfate hoof baths against digital dermatitis- where is the evidence? *J. Dairy Sci.* **98**, 2539–2544 (2015)
96. Wales A., Davies R.: Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its relevance to foodborne pathogens. *Antibiotics*, **4**, 567–604 (2015)
97. Wang L., Lin H., Dong Y., He Y., Liu C.: Isolation of vanadium-resistance endophytic bacterium PRE01 from *Pteris vittata* in stone coal smelting district and characterization for potential use in phytoremediation. *J. Hazard. Mater.* **341**, 1–9 (2018)
98. Wardwell L.H., Jude B.A., Moody J.P., Olcerst A.I., Gyure R.A., Nelson R.E., Fekete F.A.: Co-selection of mercury and antibiotic resistance in sphagnum core samples dating back 2000 years. *Geomicrobiol. J.* **26**, 238–247 (2009)
99. Wireman J., Liebert C.A., Smith T., Summers A.O.: Association of mercury resistance with antibiotic resistance in the gram-negative fecal bacteria of primates, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4494–4503 (1997)
100. World Health Organization: Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization (2014)
101. Wright G. D.: The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 175–186 (2007)
102. Yang Y., Liu W., Xu C., Wei B., Wang J.: Antibiotic resistance genes in lakes from middle and lower reaches of the Yangtze River, China: effect of land use and sediment characteristics. *Chemosphere*, **178**, 19–25 (2017a)
103. Yang Y., Xu C., Cao X., Lin H., Wang J.: Antibiotic resistance genes in surface water of eutrophic urban lakes are related to heavy metals, antibiotics, lake morphology and anthropic impact. *Ecotoxicology*, **26**, 831–840 (2017b)
104. Yang Y., Song W., Lin H., Wang W., Du L., Xing W.: Antibiotics and antibiotic resistance genes in global lakes: A review and meta-analysis. *Environ. Int.* **116**, 60–73 (2018)
105. Yang Y., Liu G., Song W., Ye C., Lin H., Li Z., Liu W.: Plastics in the marine environment are reservoirs for antibiotic and metal resistance genes. *Environ. Int.* **123**, 79–86 (2019)
106. Yang Y., Li Z., Song W., Du L., Ye C., Zhao B., Cao X.: Metagenomic insights into the abundance and composition of resistance genes in aquatic environments: Influence of stratification and geography. *Environ. Int.* **127**, 371–380 (2019)
107. Yi S.W., Kim D. C., You M. J., Kim B. S., Kim W. I., Yi S. W., Shin, G.W.: Antibiotic and heavy-metal resistance in motile *Aeromonas* strains isolated from fish. *Afr. J. Microbiol. Res.* **8**, 1793–1797 (2014)
108. Zhai Y., He Z., Kang Y., Yu H., Wang J., Du P., Zhang Z., Hu S., Gao Z.: Complete nucleotide sequence of pH11, an IncHI2 plasmid conferring multi-antibiotic resistance and multi-heavy metal resistance genes in a clinical *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Plasmid*, **86**, 26–31 (2016)
109. Zhang F., Li Y., Yang M., Li W.: Content of heavy metals in animal feeds and manures from farms of different scales in northeast China. *Int. J. Environ. Res. Pub.* **9**, 2658–2668 (2012)

WIRUSY ŚRODOWISK EKSTREMALNYCH

Mikołaj Wołacewicz¹, Dominika Bębnowska², Rafał Hrynkiewicz²,
Paulina Niedźwiedzka-Rystwej^{3*}

¹ Student kierunku Genetyka i Biologia Eksperymentalna, Koło Naukowe Mikrobiologów, Uniwersytet Szczeciński

² Student kierunku Mikrobiologia, Koło Naukowe Mikrobiologów, Uniwersytet Szczeciński

³ Instytut Biologii, Uniwersytet Szczeciński

Wpłynęło w maju, zaakceptowano w sierpniu 2019 r.

Streszczenie: Wirusy ekstremofilne zasiedlają nawet najbardziej nietypowe środowiska, takie jak szyby hydrotermalne zarówno podwodne jak i naziemne, pustynie, tereny subpolarne, osady dennie oraz środowiska o wysokim stopniu zasolenia. Są to głównie wirusy, zakażające bakterie (należące do rodzin *Myoviridae* oraz *Siphoviridae*) i archeony (zaklasyfikowane do rodzin *Lipothrixviridae*, *Rudiviridae*, *Yueviridae*, *Ampullaviridae*, *Globuloviridae*, *Sphaerolipoviridae*, *Bicaudaviridae*, *Fuselloviridae*, *Guttaviridae*, *Clavaviridae* oraz *Turriviridae*), z których część nie została w pełni sklasyfikowana. Ekstremowirusy posiadają materiał genetyczny głównie w postaci dsDNA, zarówno kolistego jak i liniowego, którego średnia długość waha się pomiędzy 14 do 80 kbp i jest optymalna, ponieważ nie ulega rozkładowi przez wysoką lub niską temperaturę, roztwory soli czy podwyższone ciśnienie i koduje wszystkie cechy niezbędne do funkcjonowania w ekstremalnych warunkach. Potwierdza to także o wiele wyższą oporność DNA na czynniki zewnętrzne w porównaniu z delikatnym RNA. Dalsze badania nad wirusami ekstremofilnymi mogą doprowadzić do pełnego zsekwencjonowania ich genomów, poznania genów warunkujących cechy oporności na niekorzystne warunki środowiskowe oraz przybliżyć poznanie pełnej historii ewolucji organizmów na Ziemi.

1. Wprowadzenie. 2. Wirusy ekstremalnie wysokich temperatur. 2.1. Wirusy z gorących źródeł naziemnych. 2.2. Wirusy z podwodnych szybów hydrotermalnych. 3. Wirusy terenów pustynnych. 4. Wirusy terenów subpolarnych. 5. Wirusy osadów dennych. 6. Wirusy terenów o wysokim stopniu zasolenia. 6.1. Wirusy w jeziorach słodkowodnych. 6.2. Wirusy w jeziorach alkalicznych. 7. Podsumowanie

VIRUSES OF EXTREME ENVIRONMENTS

Abstract: Extremophilic viruses inhabit even the most extreme environments, such as underwater and terrestrial hydrothermal vents, deserts, subpolar areas, deep subsurface sediments, hypersaline environments, and alkaline lakes. These are mainly viruses that infect bacteria (belonging to the *Myoviridae* and *Siphoviridae* families) and archaea (classified to the families *Lipothrixviridae*, *Rudiviridae*, *Yueviridae*, *Ampullaviridae*, *Globuloviridae*, *Sphaerolipoviridae*, *Bicaudaviridae*, *Fuselloviridae*, *Guttaviridae*, *Clavaviridae*, and *Turriviridae*), some of which have not been fully classified. Extremoviruses have genetic material mainly in the form of dsDNA, both circular and linear, whose average length varies between 14 and 80 kbp and is optimal because it is not degraded by high or low temperature, salt solutions or elevated pressure, and encodes all features necessary to function in extreme conditions. This also confirms the much higher resistance of DNA to external factors compared to delicate RNA. Further studies on extremophilic viruses can lead to full sequencing of their genomes, recognition of genes determining resistance traits to unfavorable environmental conditions, and a closer understanding of the full history of the evolution of organisms on Earth.

1. Introduction. 2. Viruses of extremely high temperatures. 2.1. Viruses of hot terrestrial springs. 2.2. Viruses of deep-sea hydrothermal vents. 3. Viruses of deserts. 4. Viruses of subpolar areas. 5. Viruses of subsurface sediments. 6. Viruses of hypersaline areas. 6.1. Viruses of freshwater lakes. 6.2 Viruses of alkaline lakes. 7. Conclusions

Słowa kluczowe: Archeony, dsDNA, ekstremofile, wirusy ekstremofilne

Key words: Archaea, dsDNA, extremophile, extremoviruses

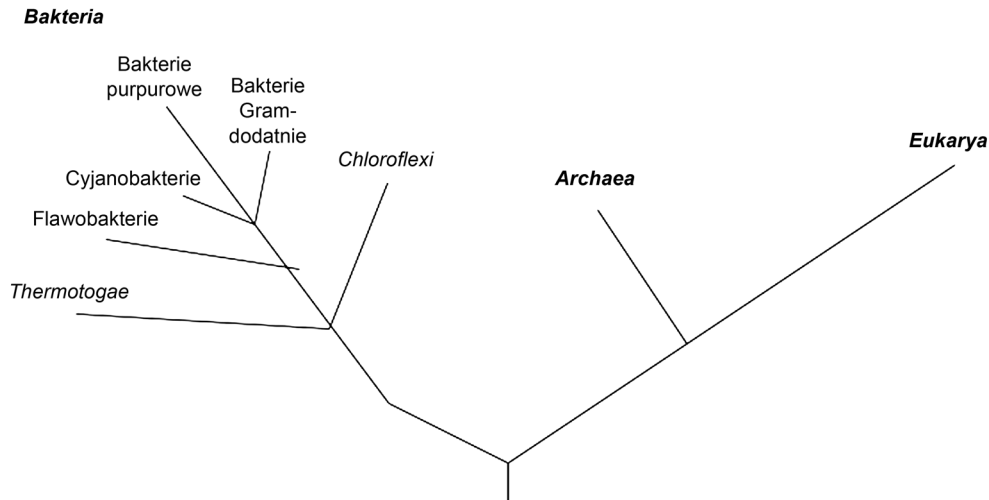
1. Wprowadzenie

Do ekstremofili zalicza się organizmy sklasyfikowane do trzech różnych domen: *Archaea*, *Eubacteria* oraz *Eukarya* (Ryc. 1). Są to organizmy, których właściwości fizykochemiczne umożliwiają życie oraz rozwój w warunkach granicznych dla występowania organizmów na Ziemi. Wykazano [21], że limit tolerancji ekstremofili na różne warunki środowiskowe, takie jak temperatura, pH, zasolenie, susza, ciśnienie hydrosta-

tyczne, promieniowanie oraz niedobór tlenu, znacznie przekracza zdolności przeżycia innych osobników. Organizmy te pozostają w szczególnym zainteresowaniu naukowców, służąc jako modele w badaniu i zrozumieniu budowy biochemicznej i molekularnej niezbędnej do przeżycia w takich warunkach [8].

Powszechnie wiadomo, że organizmom ze wspomnianych trzech domen, zawsze towarzyszą wirusy, stąd nie jest zaskakującym, że znajdują się one także w środowiskach ekstremalnych, będąc gospodarzami

* Autor korespondencyjny: dr hab. Paulina Niedźwiedzka-Rystwej, prof. US, Instytut Biologii, Uniwersytet Szczeciński, Felczaka 3c, 71-412 Szczecin; tel. 91 444 15 93; e-mail: paulina.niedzwiedzka-rystwej@usz.edu.pl



Ryc. 1. Drzewo filogenetyczne trzech domen: *Bacteria*, *Archaea*, *Eukarya*

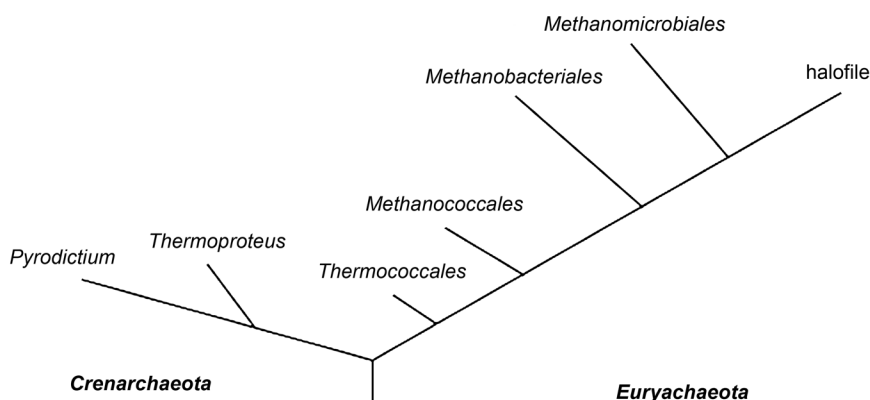
przedstawiciele zarówno domeny *Eubacteria* jak i *Archea* [26, 49].

Archaea są obecne na planecie od ponad 3,5 mld lat [49]. Dzieli się je na 2 grupy: *Crenarchaeota* oraz *Euryarchaeota*. Do pierwszej zalicza się rodzaje takie jak: *Pyrodictium* oraz *Thermoproteus*. Ponadto, wśród *Euryarchaeota* wyróżnić możemy następujące rzędy: *Thermococcales*, *Methanococcales*, *Methanobacteriales* oraz *Methanomicrobiales*. Dodatkowo do tego typu zalicza się również bliżej niesprecyzowane halofile (Ryc. 2).

Ich ewolucja cały czas postępuje i pomimo, iż występują także w środowiskach umiarkowanych, to nadal są uważane głównie za ekstremofile zasiedlające terytoria, których warunki fizyczne znacznie przekraczają limity przeżywalności innych organizmów [41]. Są to strefy obejmujące gejzery, bogate w siarkę źródła gorącego kwasu, dna mórz i oceanów oraz podwodne kominy hydrotermalne, wody o wysokim stopniu zasolenia, jeziora alkaliczne, a także ekosystemy ściśle beztlenowe [41]. Zasiedlenie tak nieprzystępnych miejsc jest możliwe dzięki ich niezwykłym właściwościom, specyficznej budowie oraz odporności na czynniki środowiskowe. Mikroorganizmy te są zdolne do życia

zarówno w temperaturach przewyższających 100°C, jak i tych poniżej 0°C. Wytrzymują również bardzo wysokie wartości ciśnienia hydrostatycznego na głębokościach nawet 1000 metrów pod poziomem morza, w ściśle beztlenowych warunkach. Udowodniono, że funkcjonują one także w warunkach ograniczonego dostępu do wody, takich jak pustynie; acydofile i alkalofile zasiedlają tereny, których pH osiąga wartości odpowiednio poniżej 2 lub ponad 10, w tym także środowiska wodne [17, 32]. Ze względu na złożoność warunków środowiskowych, w których organizmy te występują, można rozpatrywać je najczęściej w kontekście poliekstremofili, tj. jednoczesnej oporności na kilka niesprzyjających czynników [21].

Jak wiele innych organizmów żyjących na Ziemi, ekstremofile są gospodarzami wielu wirusów. Wirusy cechuje brak autonomiczności, czyli niezbędność koezystowania z żywicielem umożliwiającym im replikację. Z tego powodu nie są one rozpatrywane jako elementy żywe przez bardzo długi czas. Istnieją jednak dowody pozwalające twierdzić, że wirusy nie powinny być traktowane jedynie jako cząsteczki zakaźne, lecz także jako jeden z głównych składników biosfery. Suge-



Ryc. 2. Drzewo filogenetyczne *Archaea*, na podstawie Woese i wsp. [49]

ruje się, że ze względu na plastyczność genomu oraz adaptacje biochemiczne umożliwiające im życie w ekstremalnych warunkach odegrały kluczową rolę we wczesnej fazie ewolucji życia komórkowego na Ziemi [41].

Pomimo że wirusy są obecne wszędzie tam, gdzie odkrywana jest żywa materia organiczna oraz są czynnikiem spajającym trzy domeny życia, to stopień ich obecności i różnorodności nadal nie został do końca poznany. Aktualna wiedza o ilości wirusów pozwala twierdzić, że zasiedlają one wszystkie formy życia w obrębie naszej planety i stanowią rozległy rezerwuuar bioróżnorodności [5, 9, 12, 25, 40, 44, 48, 50].

2. Wirusy ekstremalnie wysokich temperatur

Biorąc pod uwagę trzy domeny to właśnie przedstawiciele *Archaea* są najliczniejszą grupą, którą można zaobserwować w warunkach ekstremalnie wysokich temperatur. Wśród bakterii będących gospodarzami dla wirusów spotkać można przedstawicieli termofili, natomiast wśród archeonów występują również tzw. hiperekstremofile [14]. Materiały zebrane w gorących źródłach termalnych zarówno naziemnych, jak i podziemnych pozwoliły zaobserwować ogromny rezerwuuar różnorodnych form morfologicznych oraz genomowych wirusów.

2.1. Wirusy z gorących źródeł naziemnych

Pierwsze badania i obserwacje form żyjących w gorących źródłach przeprowadził Wolfram Zillig w roku 1980 [21]. Materiał zebrany w Japonii, Włoszech, Nowej Zelandii, Islandii, Rosji i Stanach Zjednoczonych doprowadził do znacznego poszerzenia wiedzy o formach i różnorodności wirusów, a także posłużył do odkrycia nowych [31, 37, 38]. Stwierdzono [31], że szerokie spektrum hipertermofilowych wirusów wyizolowanych ze źródeł kwasowych oraz neutralnych z temperatur $>80^{\circ}\text{C}$, infekuje wielu ekstremalnie termofilowych przedstawicieli gromady *Crenarchaeaota*, w tym przedstawicieli z rodzajów *Sulfolobus*, *Thermoproteus*, *Acidianus* oraz *Pyrobaculum*. Na podstawie wyjątkowej budowy i właściwości genomowych wyodrębnione wirusy hipertermofilne zostały sklasyfikowane w 7 nowych rodzin, wśród których wyróżniamy: *Fuselloviridae*, *Lipothrixviridae*, *Rudiviridae*, *Guttaviridae*, *Globuloviridae*, *Bicaudaviridae* oraz *Ampullaviridae* (Tab. I). Wirusy zakażające archeony z gromady *Crenarchaeaota* nie wykazują wyraźnego podobieństwa morfologicznego oraz genomowego zarówno do wirusów bakteryjnych, jak i eukariotycznych [31].

Wszystkie wyizolowane dotychczas hipertermofilne wirusy zawierają liniowy lub kolisty dwuniciowy DNA, zbudowany z 15 do 75 kbp [32]. Większość tych geno-

mów została zsekwencjonowana, co w konsekwencji umożliwiło wykazanie zaskakującego zróżnicowania na poziomie genetycznym. Ustalono zaledwie kilka sekwencji komplementarnych z tymi występującymi u wirusów eukariotycznych i prokariotycznych [32]. Jedynie dla niewielu produktów białkowych kodowanych przez te sekwencje zidentyfikowano funkcje. Istnieją dowody na to, że białko płaszczowe 37-kDa wirusa STIV (*Sulfolobus turreted icosahedral virus*) z rodziny *Turriviridae* (Tab. I), może wytwarzać struktury trzecio- i czwartorzędowe podobne do białek kapsydowych wirusów zwierzęcych i bakteryjnych. Sugeruje to, że przed podziałem form życia na trzy domeny, istniał jeden wspólny przodek wszystkich wirusów [19, 39]. Brak podobieństwa morfologicznego i genetycznego w bazach danych pozwala twierdzić, że wszystkie nowo odkryte wirusy wykształciły specyficzne dla siebie mechanizmy biochemiczne umożliwiające im życie w ekstremalnych warunkach temperaturowych [32].

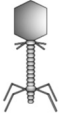
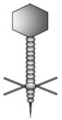











Wszystkie hipertermofilne wirusy, poza TTV1 (*Thermoproteus tenax virus 1*) z rodziny *Lipothrixviridae* oraz ATV (*Acidianus two-tailed virus*) z rodziny *Bicaudaviridae* (Tab. I), mogą przeżyć w organizmie żywiciela również w warunkach fizjologicznych. Postawiono hipotezę, że taka strategia przetrwania była dla wirusów korzystna i pomogła im uniknąć bezpośredniej ekspozycji na ciężkie warunki [30]. Wirusy te mogą osiągać liczebność milionów cząstek na milimetr kwadratowy [21]. Dodatkowo poprzez zbadanie ich oporności na obniżenie temperatury w naturalnych ekosystemach, wykazano [5], że ponad 75% wirusów, które zostały zebrane z gorących źródeł, nie uległo uszkodzeniu podczas inkubacji na lodzie, a nadto namnażały się, gdzie czas wymiany pokoleń wynosił 1–2 dni.

2.2. Wirusy z podwodnych kominów hydrotermalnych

Zlokalizowane głęboko pod wodą kominy hydrotermalne charakteryzują się najtrudniejszymi warunkami do życia na Ziemi. Temperatury w tych miejscach sięgają nawet 400°C , a płyny hydrotermalne mają odczyn kwasowy oraz zawierają związki chemiczne, takie jak metan, metale ciężkie oraz siarkowodór [13, 34]. W badaniach dotyczących podwodnych kominów hydrotermalnych zebrano próbki z odległych od siebie miejsc i stwierdzono nieoczekiwanie dużą liczbę ($1,45 \times 10^5 - 9,9 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$) oraz różnorodność wirusów. Fakt ten wskazuje na namnażanie się wirusów wewnątrz tych kominów, a co za tym idzie – eliminację za ich sprawą populacji drobnoustrojów [27].

Jednymi z zaobserwowanych wirusów w tym środowisku są niesklasyfikowane PAV1 (*Pyrococcus abyssi virus 1*) oraz TPV1 (*Thermococcus puerrii virus 1*) (Tab. I). PAV1 ma wymiary wynoszące $120 \times 80 \text{ nm}$ i jest zakończony krótkim włóknistym ogonem. Infekuje on

Tabela I
Wirusy dsDNA infekujące bakterie i archeony środowisk ekstremalnych

Rząd	Rodzina	Rodzaj	Typowy gatunek	Ob. osłonki
Caudovirales	 Myoviridae	<i>Myohalovirus</i>	<i>Halobacterium virus - phiH</i>	-
		Rodzaj niesklasyfikowany	<i>HF1</i>	
			<i>HF2</i>	
		<i>phiCh1</i>		
	 Siphoviridae	<i>Psimunavirus</i>	<i>Methanobacteriumvirus - psiM1</i>	
Ligamenvirales	 Lipothrixviridae	<i>Alphalipothrixvirus</i>	<i>Thermoproteus tenaxvirus 1 - TTV1</i>	+
		<i>Betalipothrixvirus</i>	<i>Sulfolobus islandicus filamentous virus - SIFV</i>	
			<i>Acidianus filamentous virus 3 - SIFV3</i>	
			<i>Acidianus filamentous virus 6 - SIFV6</i>	
			<i>Acidianus filamentous virus 7 - SIFV7</i>	
			<i>Acidianus filamentous virus 8 - SIFV8</i>	
		<i>Acidianus filamentousvirus 9 - SIFV9</i>		
	<i>Deltalipothrixvirus</i>	<i>Acidianus filamentousvirus 2 - SIFV2</i>		
	<i>Gammalipothrixvirus</i>	<i>Acidianus filamentousvirus 1 - SIFV1</i>		
	 Rudiviridae	<i>Rudivirus</i>	<i>Sulfolobus islandicus rod-shaped virus 1 - SIRV1</i>	-
<i>Sulfolobus islandicus rod-shaped virus 2 - SIRV2</i>				
<i>Acidianus rod-shaped virus 1</i>				
Yueviridae		<i>Salterprovirus</i>	<i>Haloarculahispanicavirus 1 - His 1 virus</i>	+
		<i>Haloarculahispanicavirus 2 - His 2 virus</i>		
Ampullaviridae		<i>Ampullavirus</i>	<i>Acidianus bottle-shaped virus - ABV</i>	
Globuloviridae		<i>Globulovirus</i>	<i>Pyrobaculum sphericalvirus - PSV</i>	+
			<i>Thermoproteus tenax spherical virus 1 - TTSV1</i>	
Sphaerolipoviridae		<i>Alphasphaerolipovirus</i>	<i>HaloarculahispanicaSH1 virus - SH1</i>	-
		<i>Betashaerolipovirus</i>	<i>Natrinemavirus - SNJ1</i>	
Bicaudaviridae		<i>Bicaudavirus</i>	<i>Acidianus two-tailed virus - ATV</i>	-
Fuselloviridae		<i>Alphafusellovirus</i>	<i>Sulfolobus spindle-shaped virus 1 - SSV1</i>	+
			<i>Sulfolobus spindle-shaped virus 2 - SSV2</i>	
			<i>Sulfolobus spindle-shaped virus 4 - SSV4</i>	
			<i>Sulfolobus spindle-shaped virus 5 - SSV5</i>	
			<i>Sulfolobus spindle-shaped virus 7 - SSV7</i>	
			<i>Sulfolobus spindle-shaped virus 8 - SSV8</i>	
			<i>Sulfolobus spindle-shaped virus 9 - SSV9</i>	
		<i>Betafusellovirus</i>	<i>Sulfolobus spindle-shaped virus 6 - SSV6</i>	
	<i>Acidianus spindle-shaped virus 1</i>			
Rodzina niesklasyfikowana		Rodzaj niesklasyfikowany	<i>Pyrococcusabyssi virus 1 - PAV1</i>	
			<i>Thermococcus prieurii virus 1 - TPV1</i>	
Guttaviridae		<i>Alphaguttavirus</i>	<i>Sulfolobus newzealandicus droplet-shaped virus - SNDV</i>	+
		<i>Betaguttavirus</i>	<i>Aeropyrumpernix ovoid virus 1 - APOV1</i>	
Clavaviridae		<i>Clavavirus</i>	<i>Aeropyrum pernix bacilliform virus 1 - APBV1</i>	-
Turriviridae		<i>Alphaturrivirus</i>	<i>Sulfolobus turreted icosahedral virus 1 - STIV</i>	?

hipertermofilny typ *Euryarcheota* z rodziny *Thermococcales* – *Pyrococcus abyssi*. Genom PAV1 składa się z dwuniciowego kołowego DNA o długości 18 kbp, który jest obecny w dużej liczbie kopii w cytoplazmie gospodarza. Porównanie jego genomu z innymi wirusami archeonów, bakterii oraz eukariontów nie wykazało znaczących podobieństw [14, 22]. Niezmiernie interesujący jest fakt, że wszystkie do tej pory wyizolowane wirusy o kształcie cytrynowatym infekują archeony zamieszkujące tereny silnie zasolone (*Salterprovirus*) oraz naziemne gorące źródła (*Fuselloviridae*) [22, 36].

3. Wirusy terenów pustynnych

Życie na pustyniach również jest mocno utrudnione, nie tylko dla organizmów wielokomórkowych, ale także dla bakterii i archeonów. Niedobór wody nie jest jedyną przeszkodą, która utrudnia w tych rejonach rozwój życia. Obszary te przyjmują bowiem ogromne ilości promieniowania UV. Problematiczne jest także to, że dobowe wahania temperatur sięgają tam nawet 30–40°C. Mimo to wiele gatunków prokariotów, jak i eukariontów przystosowało się do przetrwania w tych ekstremalnych warunkach. Organizmy te zostały odkryte na wielu gorących pustyniach, m.in. na Pustyni Atakama w Chile [1, 9]. Przeprowadzono badania na powierzchniowych warstwach piasku na Pustyni Sahara na terenach Maroko i Tunezji, w których odkryto bakteriofagi z rodziny *Myoviridae*, *Siphoviridae* oraz *Podoviridae*. Wyizolowane cząsteczki dwuniciowego DNA poddano elektroforezie żelowej w polu pulsacyjnym, w efekcie czego w próbach wykryto co najmniej 4 potencjalnie nienaruszone genomy wirusowe o długości od 45 do 270 kbp [10, 35].

4. Wirusy terenów subpolarnych

Życie mikrobiologiczne jest także obecne w środowiskach ekstremalnie zimnych, do których zaliczyć można lodowce, polarne wieczne zmarzliny czy Suche Doliny McMurdo (McMurdo Dry Valleys, Dry Valleys of Antarctica), które tworzą najzimniejszą i najbardziej suchą pustynię na Ziemi [43]. Na Antarktydzie zarówno drobnoustroje prokariotyczne, jak i mikro-eukarioty rozwijają się w lodzie morskim czy w lodowatej wodzie [47]. Dostępne są badania wykazujące obecność wirusów w tym środowisku, a także związek między namnażaniem wirusów i bakterii w Arktycznym i Antarktycznym lodzie morskim oraz w wiecznie oblodzonych jeziorach w Dolinie Taylora (Taylor Valley) na Antarktydzie. Ilość wirusów odkrytych w Arktycznym lodzie morskim jest zaskakująco wysoka, a także od 10 do 100 razy większa od ich koncentracji

w toni wodnej [47]. Różnica ta związana jest z wysoką obfitością bakterii w lodzie w porównaniu do ich ilości w wodzie. Ponadto stosunek ilości wirusów do bakterii był najwyższym odnotowanym w środowiskach naturalnych i dostarczył informacji o wpływie wirusów na dynamikę rozwoju kultur bakterii [24].

Z próbek pobranych z lodu morskiego w północno-zachodniej części archipelagu Svalbard, wyizolowano i scharakteryzowano 3 wirusy, dla których gospodarzami są bakterie krioofilne, najbliższe spokrewnione z *Shewanella frigidimarina* (rodzina – *Schwanellaceae*), *Flavobacterium hibernum* (rodzina – *Flavobacteriaceae*) oraz *Colwellia psycherythrae* (rodzina – *Colwelliaceae*). Zauważono, że odkryte 3 gatunki fagów wykazywały jeszcze większą tolerancję na niską temperaturę, niż ich gospodarze. Co więcej, ich rozwój był ograniczony maksymalną tolerancją na zimno gospodarzy. Ponadto, obserwacja pod mikroskopem elektronowym owych wirusów pozwoliła na scharakteryzowanie ich genomu jako dwuniciowego DNA i wykazano podobieństwo do dsDNA wirusów z rodzin *Siphoviridae* oraz *Myoviridae* (Tab. I) [4].

Analiza próbek lodu z morza Rossa wykazała podobną koncentrację wirusów do tej, którą określono w Arktycznym lodzie morskim [15, 16]. Obserwacje pod TEM (Transmission Electron Microscope) wykazały, że cząsteczki znajdujące się w badanym materiale były stosunkowo duże i złożone w większości z form o symetrii ikosaedralnej i najprawdopodobniej zakażały mikro-eukarioty [15, 16].

W wiecznie pokrytych lodem jeziorach Antarktycznych, które są najbardziej zdominowanymi przez mikroorganizmy ekosystemami, zagęszczenie wirusów było niższe [47], a mimo to ich liczba była wyższa, niż na innych obszarach słodko- i słonowodnych. Zaobserwowano, że populacje te wykazywały wysoką aktywność. Stwierdzono także, że większość z odkrytych wirusów miała materiał genetyczny w postaci dsDNA i symetrię ikosaedralną, i były one podobne do wirusów powszechnie występujących w warunkach umiarkowanych infekujących fotosyntezujące i niefotosyntezujące wiciowce [18].

5. Wirusy osadów dennych

Ze względu na ograniczone możliwości badania, głęboka podpowierzchniowa biosfera jest najmniej zbadanym i poznanym siedliskiem na Ziemi. Przypuszcza się jednak, że ogromna mikrobiologiczna biomasa zgromadzona na tych obszarach wpływa znacząco na cykle biogeochemiczne na planecie [6]. Program ODP (Ocean Drilling Programme) ujawnił, że beztlenowe tereny podwodne (> 1000 m p.p.m.), gdzie panuje wysokie ciśnienie hydrostatyczne, warunki niemalże całkowicie

beztlenowe oraz bardzo niska zawartość materii organicznej, zasiedlone są przez chemolitotrofy. Stwierdzono, że ilość bakterii na głębokościach ok. 1000 m p.p.m. przekracza 10^5 komórek w 1 cm^3 [28, 29]. Natomiast obecność wirusów w odmętach wodnych została zbadana po wykonaniu odwiertów na głębokości 105,1 i 118,2 m p.p.m. w pobliżu zachodniego wybrzeża Kanady [3]. Dzięki temu ujawniono w tym obszarze istnienie dużej liczby wirusów, a ponadto zaobserwowano, że zagęszczenie cząsteczek wirusowych zdawało się iść w parze z liczebnością populacji drobnoustrojów.

Wykazano, że z powodu braku na tak dużej głębokości zagrożeń dla bakterii w postaci organizmów eukariotycznych, jedynym źródłem śmiertelności komórek bakteryjnych są bakteriofagi. Z tego powodu, biorąc pod uwagę wysoką korelację w liczebności drobnoustrojów i wirusów, można stwierdzić, że te drugie wywierają szczególnie wpływ na podwodne procesy biogeochemiczne [3].

6. Wirusy terenów wysokim stopniu zasolenia

Woda jest nadrzędnym czynnikiem warunkującym możliwości wzrostu, rozwoju i zachodzenia wszelkich procesów metabolicznych w komórkach. Wysoka koncentracja jonów w wodzie wpływa na jej potencjał osmotyczny, przez co na terenach o wysokim stopniu zasolenia płynna woda nie jest w pełni dostępna dla mikroorganizmów. Tereny te są powszechne w gorących i suchych obszarach na całym świecie i różnią się od siebie składem jonowym. Pomimo trudnych warunków tam panujących, wody o wysokim stopniu zasolenia mogą być doskonałym ekosystemem dla wielu gatunków halofili (archeonów, zielonych alg, cyjanobakterii oraz innych mikroorganizmów). Organizmy te doskonale radzą sobie ze stresem osmotycznym, a nawet wytrzymują w nasyconych roztworach NaCl [23]. Zarejestrowano także obecność wirusów Morzu Martwym, gdzie występuje wysokie stężenie soli wapnia i magnezu [26].

6.1. Wirusy w jeziorach słonowodnych

Wody słone stanowią ważny rezerwuuar wirusów, które wykazują ogromne zróżnicowanie pod kątem genetycznym. Podczas badania Morza Martwego, w którym stężenie magnezu przekracza 50%, odkryto zaskakująco dużą koncentrację wirusów osiągającą nawet 10^7 cząsteczek w 1 ml [26]. Wielkości ich genomów wahają się od 10 kbp do 533 kbp [42]. Analiza elektroforetyczna w polu pulsacyjnym wykazała, że struktury populacji wirusów zmieniają się w zależności od zasolenia wody, począwszy od słonej wody morskiej (40‰) do nasyconej solanki chlorku sodu (370‰). W gradiencie zasolenia od 40‰ do 220‰ wielkości genomów wirusowych zawierały się

w przedziale od 32 do 340 kbp. Przy zasoleniu wyższym niż 220‰ zakres ten wahał się od 10 do 189 kbp. Podczas badań zauważono również zmiany w populacjach organizmów prokariotycznych w zależności od stopnia zasolenia środowiska. Może to oznaczać, że struktura społeczności wirusów jest w dużym stopniu uzależniona od rozwoju kultur bakterii [42].

Bezpośrednie obserwacje pod mikroskopem elektronowym pozwoliły zaobserwować zróżnicowanie populacji wirusów, wśród których dominowały wirusy z rodziny *Fuselloviridae* [26]. Wszystkie wirusy wyizolowane z tego typu siedlisk zakażają archeony, a większość z nich ma morfologię głowa-ogon, przypominającą bakteriofagi należące do 3 głównych rodzin: *Myoviridae*, *Siphoviridae* oraz *Podoviridae*, co podkreśla tym samym niezwykle podobieństwo wirusów archeonów i bakterii.

Scharakteryzowano także 3 wirusy, które wykazywały morfotypy bliżej spokrewnione z hipertermofilowymi archeowirusami. Odkryte wirusy to His1 oraz His2 należące do rodziny *Yueviridae* oraz SH1 z rodziny *Sphaerolipoviridae* (Tab. I). Takie różnice w bezpośrednich obserwacjach w warunkach *in vitro* sugerują, że opisane wirusy z tego środowiska nie odzwierciedlają rzeczywistej różnorodności morfologicznej *in situ*. Może to być spowodowane faktem, że komórki gospodarzy łatwo izolowane i hodowane w laboratoriach, nie są dominującymi gatunkami występującymi naturalnie w środowiskach o wysokim zasoleniu [7].

Wszystkie opisane dotychczas wirusy posiadają genomy zbudowane z liniowego dsDNA. Poprzez przeprowadzenie sekwencjonowania materiału genetycznego wykazano istnienie jedynie niewielkich podobieństw (mniej niż 10%) z sekwencjami pochodzącymi od bakterii, bakteriofagów i wirusów eukariotycznych. Zjawisko to może być wynikiem zastosowanej metody izolacji uwarunkowanej tym konkretnym ekosystemem [7]. Jak wykazano na przykładzie wirusów ϕ Ch1 oraz ϕ H z rodziny *Myoviridae* (Tab. I), istnieją silne związki genetyczne między różnymi halowirusami. Wymienione wirusy mają do 97% identyczności nukleotydów, podczas gdy ich gospodarze wyizolowani z odrębnych i odległych geograficznie miejsc zdecydowanie różnią się od siebie [20, 45]. Halowirusy HF1 oraz HF2 należące do rodziny *Myoviridae* (Tab. I) mają genomy, których podobieństwo w pierwszych 60% sekwencji wynosi do 99%. Pozostała część genomu wykazuje rozbieżność (87% identyczności) spowodowaną zmianami bazowymi i zdarzeniami wstawiania lub usuwania nukleotydów. Ta znacząca wariacja w podobieństwie sekwencji może być spowodowana niedawnymi rekombinacjami między tymi dwoma wirusami lub innym halowirusem, podobnym do HF. Zjawisko rekombinacji genetycznej zdaje się być powszechne wśród wirusów wód o wysokim stopniu zasolenia [1, 46].

6.2. Wirusy w jeziorach alkalicznych

Jeziora sodowe wykazują podobieństwo składu chemicznego do wód słonowodnych, jednak różnią się one wysokim poziomem minerałów węglanowych w skałach je otaczających, które utrzymują pH w jeziorach alkalicznych na poziomie 10–12. Ponadto jony Ca^{2+} oraz Mg^{2+} są praktycznie nieobecne, ponieważ wytrącają się jako osad przy wysokim pH i stężeniu węglanów [23].

W przeszłości odnotowano w tych ekstremalnych środowiskach obecność licznych populacji bakteryjnych, a także zaobserwowano ich zmiany sezonowe. Należy jednak wspomnieć, że przed 2004 r. nie pojawiły się wzmianki o występowaniu na tych terenach wirusów, natomiast pierwsze badania ich populacji przeprowadzono w jeziorze Mono [17]. Jest to wysoko alkaliczne (pH ~ 10) słonowodne jezioro znajdujące się w USA w stanie Kalifornia, na wschód od Parku Narodowego Yosemite. W tym konkretnym środowisku określona ilość wirusów przekracza ich liczbę występującą we wszystkich zbadanych dotychczas naturalnych ekosystemach wodnych. Elektroforeza w polu pulsacyjnym wykazała długość genomów wirusowych dsDNA zawartych w zakresie od 14 do 400 kpz, przy czym większość z badanych wirusów posiadała genom o długości 30–60 kpz [17]. Jak dotychczas, jedynie jeden z tej populacji wirusowej, lityczny fag Mono1 z rodziny *Siphoviridae* (Tab. I), został wyizolowany i częściowo scharakteryzowany. Odkryto, że szczep ten infekuje bakterię blisko spokrewnioną z *Idiomarina baltica*, wyizolowaną z wód powierzchniowych środkowego Bałtyku. Użycie genomu dsDNA wirusa Mono1 jako sondy w procesie hybrydyzacji, wykazało również sezonowe zmiany w występowaniu tego wirusa [21].

7. Podsumowanie

Przez lata stan wiedzy na temat wirusów zasiedlających ekstremalne środowiska był znikomy. Powody takiego stanu rzeczy były różne, a zdecydowanie istotną kwestią okazała się być niedostępność i nieprzystępność samych środowisk. Jednak ostatnio wraz z rozwojem technologicznym wiedza o ekstremofilach stale się poszerza.

Wszystkie wirusy odkryte i wyizolowane ze środowisk ekstremalnych posiadają materiał genetyczny w formie dwuniciowej spirali DNA o średnim stopniu złożoności i długości. Można więc wnioskować, że występowanie materiału genetycznego w takiej formie jest konieczne do przeżycia wirusów w tak surowych warunkach. Nie ulega wątpliwości, że dsDNA jest najstabilniejszą i najbardziej odporną na działanie czynników zewnętrznych formą kwasu nukleinowego. Również długość genomu wydaje się być idealnie

dostosowana do tego, żeby móc unikać zniszczenia. Tłumaczy to również dlaczego nie wyizolowano dotąd żadnego RNA wirusa, bowiem kluczowy pozostaje fakt, że zarówno jedno- jak i dwuniciowy RNA jest strukturą bardzo delikatną. Należy wspomnieć, że jedynie niecałe 15% sekwencji wyodrębnionych wśród ekstremofilnych wirusów odpowiada tym wcześniej znanym. Ilość poznanych białek wytwarzanych przez ekstremofile jest niewielka, co oznacza, że potencjalnie istnieją setki peptydów o nieznanym dotychczas funkcjach, a część z nich może być również analogami białek już znanych. Potwierdza to tezę, że wirusy stanowią jeden z największych rezerwuarów różnorodności genetycznej na naszej planecie, co może wpływać na to, w jakim środowisku rozwijają się konkretne typy fagów. Niestety, obecny stan wiedzy nie odpowiada na pytania, jak te organizmy powstały, jaki jest kierunek ich ewolucji oraz jak wygląda dynamika ich populacji. Do tego niezbędne będą dalsze odkrycia oraz badania prowadzone na wirusach siedlisk ekstremalnych.

Mając na uwadze znaną historię ewolucji Ziemi można przypuszczać, że ekstremofile były jednymi z pierwszych form życia komórkowego. Dlatego badanie tych organizmów jest niezwykle ważne i może rzucić nowe światło na ewolucję zarówno komórkowych form życia, jak i na historię ewolucji cząsteczek „nieożywionych”, takich jak kwasy nukleinowe. Dlatego, biorąc pod uwagę hipotezę [11], według której wirusy odgrywają kluczową rolę zarówno w ewolucji RNA do DNA, jak i genezie trzech obecnie znanych domen życia, badania nad wirusami wydają się być nie tylko ciekawe, ale również niezbędne do poznania i zrozumienia narodzin życia na Ziemi, czy analizy pierwotnych procesów biologicznych. Równie istotnym znaczeniem tych rozważań może okazać się ich kluczowy udział w opisanie procesu ewolucji samych wirusów.

Piśmiennictwo

1. Bath C., Cukalac T., Porter K., Dyall-Smith M.L.: His1 and His2 are distantly related, spindle-shaped haloviruses belonging to the novel virus group, Salterprovirus. *Virology*, **350**, 228–239 (2006)
2. Berliner A.J., Mochizuki T., Stedman K.M.: Astrovirology: viruses at large in the universe. *Astrobiology*, **18**, 207–223 (2018)
3. Bird D.F., Juniper S.K., Ricciardi-Rigault M., Martineu P., Prairie Y.T., Calvert S.E.: Subsurface viruses and bacteria in Holocene/Late Pleistocene sediments of Saanich Inlet, BC: ODP Holes 1033B and 1034B, Leg 169S. *Mar. Geol.* **174**, 227–239 (2001)
4. Borriss M., Helmke E., Hanschke R., Schweder T.: Isolation and characterization of marine psychrophilic phage-host systems from Arctic sea ice. *Extremophiles*, **7**, 377–384 (2003)
5. Breitbart M., Wegley L., Leeds S., Schoenfeld T., Rohwer F.: Phage community dynamics in hot springs. *Appl. Environ. Microb.* **70**, 1633–1640 (2004)
6. Danovaro R., Dell'Anno A., Trucco A., Serresi M., Vanucci S.: Determination of Virus Abundance in Marine Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1384–1387 (2001)

7. Dyal-Smith M., Tang S.L., Bath C.: Haloarchaeal viruses: how diverse are they? *Res. Microbiol.* **154**, 309–313 (2003)
8. Efenberger M., Brzezińska-Błaszczuk E., Wódz K.: Archeony – drobnoustroje ciągle nieznanne. *Post. Hig. Med. Dosw.* **68**, 1452–1463 (2014)
9. Evans R.D., Johansen J.R.: Microbiotic crusts and ecosystem processes. *Crit. Rev. Plant Sci.* **18**, 182–225 (1999)
10. Fancello L., Trape S., Robert C., Boyer M., Popgeorgiev N., Raoult D., Desnues C.: Viruses in the desert: a metagenomic survey of viral communities in four perennial ponds of the Mauritanian Sahara. *ISME J.* **7**, 359–369 (2013)
11. Forterre P.: Three RNA cells for ribosomal lineages and three DNA viruses to replicate their genomes: a hypothesis for the origin of cellular domain. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 3669–3674 (2006)
12. Fuhrman J.A.: Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, **399**, 541–548 (1999)
13. Geslin C., Le Romancer M., Gaillard M., Erauso G., Prieur D.: Observation of virus-like particles in high temperature enrichment cultures from deep-sea hydrothermal vents. *Res. Microbiol.* **154**, 303–307 (2003)
14. Geslin C., Le Romancer M., Erauso G., Gaillard M., Perrot G., Prieur D.: PAV1, the first virus-like particle isolated from a hyperthermophilic euryarchaeote, “*Pyrococcus abyssi*”. *J. Bacteriol.* **185**, 3888–3894 (2003)
15. Gowing M.M.: Large viruses and infected microeukaryotes in Ross Sea summer pack ice habitats. *Mar. Biol.* **142**, 1029–1040 (2003)
16. Gowing M.M., Garrison D.L., Gibson A.H., Krupp J.M., Jeffries M.O., Fritsen C.H.: Bacterial and viral abundance in Ross Sea summer pack ice communities. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **279**, 3–12 (2004)
17. Jiang S., Steward G., Jellison R., Chu W., Choi S.: Abundance, distribution and diversity of viruses in alkaline hypersaline Mono Lake, California. *Microb. Ecol.* **47**, 9–17 (2004)
18. Kepner R.L., Wharton R.A. Jr., Suttle C.A.: Viruses in Antarctic lakes. *Limnol. Oceanogr.* **43**, 1754–1761 (1998)
19. Khayat R., Tang L., Larson E.T., Lawrence C.M., Young M., Johnson J.E.: Structure of an archaeal virus capsid protein reveals a common ancestry to eukaryotic and bacterial viruses. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 1894–18949 (2005)
20. Klein R., Baranyi U., Rössler N., Greineder B., Scholz H., Witte A.: Natrialba magadii virus ϕ Ch1: first complete nucleotide sequence and functional organization of a virus infecting a haloalkalophilic archaeon. *Mol. Microbiol.* **45**: 851–886 (2002)
21. Le Romancer M., Gaillard M., Geslin C., Prieur D.: Viruses in extreme environments. *Rev. Environ. Sci. Bio.* **6**, 17–31 (2007)
22. Leulliot N., Quevillon-Cheruel S., Graille M., Geslin C., Flament D., Romancer M., van Tilbeurgh H.: Crystal Structure of PAV1-137: A Protein from the Virus PAV1 That Infects *Pyrococcus abyssi*. *Archaea*, DOI: 10.1155/2013/568053 (2013)
23. Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J.: *Extremely halophilic Archaea (w) Brock biology of microorganisms Tenth edition*, red. Carlson G., Snavely S.L., Wechsler D.A., Schiaparelli K. Prentice Hall, USA, 2003, s. 448–452
24. Maranger R., Bird D.F., Juniper S.K.: Viral and bacterial dynamics in Arctic sea ice during the spring algal bloom near Resolute, N.W.T., Canada. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **111**, 121–127 (1994)
25. Niedźwiedzka P., Deptuła W.: Drobnoustroje żyjące w nietypowych warunkach. *Wszechświat*, **108**, 225–227 (2007)
26. Oren A., Bratbak G., Heldal M.: Occurrence of virus-like particles in the Dead Sea. *Extremophiles*, **1**, 143–149 (1997)
27. Ortmann A.C., Suttle C.A.: High abundances of viruses in deep-sea hydrothermal vent system indicate viral mediated microbial mortality. *Deep-sea Res. Pt I*, **52**, 1515–1527 (2005)
28. Parkes R.J., Cragg B.A., Bale S.J., Getliff J.M., Goodman K., Rochelle P.A., Fry J.C., Weightman A.J., Harvey S.M.: Deep bacterial biosphere in Pacific ocean sediments. *Nature*, **371**, 410–413 (1994)
29. Parkes R.J., Cragg B.A., Wellsbury.: Recent studies on bacterial populations and processes in subseafloor sediments: a review. *Hydrogeol. J.* **8**, 11–28 (2000)
30. Prangishvili D., Garrett R.A.: Exceptionally diverse morphotypes and genomes of crenarchaeal hyperthermophilic viruses. *Biochem. Soc. T.* **32**, 204–208 (2004)
31. Prangishvili D., Garrett R.A.: Viruses of hyperthermophilic Crenarchaea. *Trends Microbiol.* **13**, 535–542 (2005)
32. Prangishvili D., Garrett R.A., Koonin E.V.: Evolutionary genomics of archaeal viruses: Unique viral genomes in the third domain of life. *Virus Res.* **117**, 52–67 (2006)
33. Prasad B.V., Schmid M.F.: Principles of virus structural organization. *Adv. Exp. Med. Biol.* **726**, 17–47 (2012)
34. Prieur D.: Microbiology of deep-sea hydrothermal vents. *Trends. Biotechnol.* **15**, 242–244 (1997)
35. Prigent M., Leroy M., Confalonieri F., Dutertre M., DuBow M.S.: A diversity of bacteriophage forms and genomes can be isolated from the surface sands of the Sahara Desert. *Extremophiles*, **9**, 289–296 (2005)
36. Quemina E.R.J., Pietilä M.K., Oksanen H.M., Forterre P., Rijpstra W.I.C., Schouten S., Bamford D.H., Prangishvili D., Krupovic M.: Sulfolobus Spindle-Shaped Virus 1 Contains Glycosylated Capsid Proteins, a Cellular Chromatin Protein, and Host-Derived Lipids. *J. Virol.* **89**, 11681–11691 (2015)
37. Rachel R., Bettstetter M., Hedlund B.P., Häring M., Kessler A., Stetter K.O., Prangishvili P.: Remarkable morphological diversity of viruses and virus-like particles in hot terrestrial environments. *Arch. Virol.* **147**, 2419–2429 (2002)
38. Rice G., Stedman K., Snyder J., Wiedenheft B., Willits D., Brumfield S., McDermott T., Young M.: Viruses from extreme thermal environments. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 13341–13345 (2001)
39. Rice G., Tang L., Stedman K., Roberto F., Spuhler J., Gillitzer E., Johnson J.E., Douglas T., Young M.: The structure of a thermophilic archaeal virus shows a double-stranded viral capsid type that spans all domains of life. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 7716–7720 (2004)
40. Rohwer F.: Global phage diversity. *Cell*, **113**, 141 (2003)
41. Rothschild L.J., Mancinelli R.L.: Life in extreme environments. *Nature*, **409**, 1092–1101 (2001)
42. Sandaa R.A., Skjoldal E.F., Bratbak G.: Virioplankton community structure along a salinity gradient in a solar saltern. *Extremophiles*, **7**, 347–351 (2003)
43. Staley J.T., Gosink J.J.: Poles apart: biodiversity and biogeography of sea ice bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**, 189–215 (1999)
44. Suttle C.A.: Viruses in the sea. *Nature*, **437**, 356–361 (2005)
45. Tang S.L., Nuttall S., Ngui K., Fisher C., Lopez P., Dyal-Smith M.: HF2: a double-stranded DNA tailed haloarchaeal virus with a mosaic genome. *Mol. Microbiol.* **44**, 283–296 (2002)
46. Tang S-L., Nuttall S., Dyal-Smith M.: Haloviruses HF1 and HF2: evidence for a recent and large recombination event. *J. Bacteriol.* **186**, 2810–2817 (2004)
47. Thomas D.N., Dieckmann G.S.: Antarctic sea ice-a habitat for extremophiles. *Science*, **295**, 641–644 (2002)
48. Weinbauer M.G.: Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**, 127–18 (2004)
49. Woese C.R., Kandler O., Wheelis M.L.: Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4576–4579 (1990)
50. Wommack K.E., Colwell R.R.: Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. R.* **64**, 69–114 (2000)

DROŹDŹE KILLEROWE I ICH ZASTOSOWANIE

Urszula Błaszczyk*

Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydział Technologii Żywności,
Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie

Wpłynęło w lipcu, zaakceptowano w październiku 2019 r.

Streszczenie: Fenotyp killerowy, związany z produkcją oraz wydzielaniem toksyn killerowych, jest szeroko rozpowszechniony wśród drożdży i w warunkach konkurencyjnych daje przewagę szczepom drożdży killerowych w stosunku do innych, wrażliwych na te toksyny mikroorganizmów zasiedlających tę samą niszę ekologiczną. Toksyny killerowe to białka, zwykle glikoproteiny, działające bójczo w stosunku do drożdży wrażliwych. Każda toksyna killerowa ma unikatowe właściwości, które różnią się w zależności od produkującego ją szczepu drożdży. Różnice te dotyczą lokalizacji genów, które kodują toksyny, masy cząsteczkowej, jak również mechanizmów działania. Niektóre szczepy drożdży killerowych charakteryzują się szerokim zakresem aktywności antagonistycznej, hamują rozwój szeregu szczepów drożdży, a także grzybów strzępkowych, i od lat badane są pod kątem ich potencjału biotechnologicznego. Drożdże killerowe i ich toksyny mogą znaleźć potencjalne zastosowanie w wielu dziedzinach: w produkcji żywności i napojów, szczególnie podczas fermentacji wina i jego dojrzewania, w biologicznej ochronie roślin, w biotypowaniu drożdży i jako nowe środki przeciugrzybicze.

1. Wprowadzenie. 2. Biosynteza i budowa toksyn killerowych. 3. Właściwości białek killerowych. 4. Mechanizm działania toksyn killerowych. 5. Zastosowanie drożdży killerowych i ich toksyn. 5.1. Wykorzystanie w winiarstwie. 5.2. Potencjalne zastosowanie w medycynie. 5.3. Zwalczanie chorób grzybowych roślin. 5.4. Transgeniczne rośliny wytwarzające toksyny killerowe. 5.5. Zastosowanie drożdży killerowych w środowisku morskim. 6. Podsumowanie

KILLER YEASTS AND THEIR APPLICATION

Abstract: A killer phenotype, associated with the production and secretion of killer toxins, is widespread among yeasts and in competitive conditions gives an advantage to killer yeast strains in relation to other, sensitive microorganisms colonizing the same ecological niche. Killer toxins are proteins, usually glycoproteins, that are able to kill strains of susceptible yeasts. Each killer toxin has unique properties that vary depending on the strain of yeast that produces it. These differences concern the location of genes that encode toxins, molecular weight, as well as mechanisms of action. Some strains of killer yeast are characterized by a wide range of antagonistic activity, inhibit the development of a number of yeast strains, as well as molds, and have been studied for many years in terms of their biotechnological potential. Killer yeast and its toxins can find potential application in many fields: in the production of food and beverages, especially during wine fermentation and maturation, in biological control of plant pathogens, in yeast biotyping and as new antifungal agents.

1. Introduction. 2. Biosynthesis and structure of killer toxins. 3. Properties of killer proteins. 4. The mechanism of action of killer toxins. 5. Use of killer yeasts and their toxins. 5.1. Application in viticulture. 5.2. Potential application in medicine. 5.3. Combating fungal diseases of plants. 5.4. Transgenic plants producing killer toxins. 5.5. Use of killer yeasts in the marine environment. 6. Summary

Słowa kluczowe: antagonizm, drożdże killerowe, toksyna killerowa

Key words: antagonism, killer yeasts, killer toxin

1. Wprowadzenie

Intensywne badania nad zjawiskiem antagonistycznego oddziaływania pomiędzy populacjami mikroorganizmów doprowadziły do opisanego szeregu substancji przeciwdrobnoustrojowych. W latach dwudziestych ubiegłego wieku odkryto pierwszy antybiotyk i pierwszą bakteriocynę, toksyny produkowane przez drożdże opisano prawie 40 lat później [80]. Fenotyp killerowy po raz pierwszy został scharakteryzowany przez Bevana i Makowera w 1963 roku w odniesieniu do szczepu drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, wyizolowa-

nego jako zanieczyszczenie mikrobiologiczne w browarze [9]. Intensywne badania nad zjawiskiem killerowym potwierdziły jego występowanie wśród drobnoustrojów pochodzących z różnych naturalnych siedlisk, w tym wśród szczepów drożdży wyizolowanych z winogron i innych owoców, szczepów winiarskich, ale i mikroorganizmów pochodzących z laboratoryjnych kolekcji kultur. Obecnie wiadomo, że fenotyp killerowy występuje wśród drożdży z rodzajów: *Pichia*, *Wickerhamomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Williopsis*, *Kluyveromyces*, *Mrakia*, *Zygosaccharomyces*, *Torulopsis*, *Metschnikowia*, *Cryptococcus*, *Candida*, co wskazuje na

* Autor korespondencyjny: dr Urszula Błaszczyk, Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydział Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków; tel. 12 662 47 90; e-mail: urszula.blaszczyk@urk.edu.pl

znaczną częstotliwość jego występowania [80, 46]. Zjawisko killerowe może stanowić model biologicznego współzawodnictwa w pewnym stopniu analogiczny do syntezy bakteriocyn przez bakterie.

Toksyny killerowe to cytotoksyczne białka, zwykle glikoproteiny, produkowane przez niektóre drożdże, działające bójczo w stosunku do komórek drożdży wrażliwych. Początkowo przeważał pogląd, że toksyny są aktywne jedynie wobec drożdży należących do tego samego co producent lub spokrewnionego gatunku. Obecnie wiadomo, że niektóre szczepy drożdży wydzielają białka killerowe, które zabijają również komórki drożdży, należące do innych rodzajów, a nawet wykazują aktywność killerową wobec grzybów strzępkowych.

Najlepiej opisane toksyny killerowe: K1, K2 i K28, produkowane przez szczepy należące do gatunku *S. cerevisiae*, wykazują dość wąskie spektrum działania, ograniczone do drożdży z rodzaju *Saccharomyces*, natomiast szeroki zakres aktywności killerowej również w stosunku do mikroorganizmów niespokrewnionych z producentem toksyny, obserwowano u drożdży z rodzajów: *Pichia*, *Wickerhamomyces*, *Williopsis* czy *Kluyveromyces* [17]. Dość szerokie spektrum aktywności bójczej przejawia również najpóźniej opisana toksyna killerowa *S. cerevisiae* – Klus, która działa letalnie nie tylko na drożdże *Saccharomyces*, ale także na *Candida albicans* i *Kluyveromyces lactis* [68].

Drożdże killerowe są odporne na własne toksyny, ale pozostają wrażliwe na toksyny wydzielane przez inne gatunki [80]. W zależności od zdolności do syntezy białek killerowych oraz wrażliwości na nie wyróżnia się trzy fenotypy: killerowy (K), wrażliwy (S) oraz neutralny (N) [55]. W literaturze można znaleźć także odniesienie do dwóch innych fenotypów: „superkillerowego”, związanego z nadprodukcją toksyny, oraz „samobójczego”, w którym obserwuje się uwrażliwienie na własne białko killerowe [98].

2. Biosynteza i budowa toksyn killerowych

Geny kodujące toksyny, których producentami są gatunki: *S. cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* oraz *Ustilago maydis*, zlokalizowane są w dwuniciowym RNA (dsRNA). Geny toksyn killerowych, wydzielanych przez gatunki: *K. lactis*, *Pichia acaciae*, *P. inositovora* oraz *Debaryomyces robertsiae*, znajdują się w liniowym, plazmidowym dsDNA. Natomiast informacja genetyczna dotycząca kodowania białek killerowych przez gatunki takie jak: *Pichia farinosa*, *P. membranifaciens*, *P. kluyveri*, *Wickerhamomyces anomalus* oraz *Williopsis saturnus* zapisana jest w genomie jądrowym [7, 8].

Najlepiej poznanymi i scharakteryzowanymi toksynami killerowymi są te produkowane przez drożdże *S. cerevisiae* (K1, K2, K28). W przypadku wspomnianego

gatunku drożdży, jak również *Z. bailii* i *U. maydis*, fenotyp killerowy jest determinowany obecnością w cytoplazmie cząstek VLP (Virus Like Particles), często określanymi jako cząstki wirusopodobne. Wirusy te straciły zdolność pozakomórkowej transmisji i ich rozprzestrzenianie zachodzi jedynie na skutek wegetatywnego lub płciowego rozmnażania się drożdży [80, 98]. Produkcja toksyn K1, K2, K28 oraz najpóźniej opisanej toksyny Klus jest związana z obecnością w cytoplazmie satelitarnego M-dsRNA (M1, M2, M28, Mlus), zamkniętego w cząstkach wirusopodobnych (VLP). M-dsRNA (1,5–1,9 kbp) odpowiedzialny jest za syntezę białek killerowych oraz za oporność komórki na własne toksyny [51]. Natomiast replikacja i funkcjonowanie zainfekowanych komórek zależne są od obecności innych wirusów, określanymi pomocniczymi L-A, które należą do rodziny *Totiviridae* [80, 81]. Wirusy pomocnicze są zdolne do samodzielnego powielania się w komórkach gospodarza, bez obecności satelitarnego M-dsRNA. Dojrzała cząstka wirusa L-A zawiera dsRNA o wielkości 4,6 kbp, który powiązany jest z aktywnością odwrotnej transkryptazy. Nić RNA o dodatniej polaryzacji (L-A(+) ssRNA), służąca jako mRNA dla syntezy białek wirusowych, zawiera dwie otwarte ramki odczytu (ORF), które nakładają się na siebie fragmentem o długości 130 nukleotydów. Pierwsza z nich koduje białko kapsydu – Gag (76 kDa), natomiast druga fuzyjne białko Gag-Pol (180 kDa), niezbędne do replikacji zarówno L-A-dsRNA, jak i M-dsRNA. W odróżnieniu od L-A, każdy z trzech genomów M-dsRNA zawiera pojedynczą ramkę odczytu kodującą preprotoksynę (pptox) – prekursor białka killerowego [7].

Najlepiej poznana preprotoksyna K1, kodowana przez M1-dsRNA, jest polipeptydem o masie cząsteczkowej 35 kDa, złożonym z 316 reszt aminokwasowych. Zbudowana jest z N-końcowej sekwencji liderowej, złożonej z 44 reszt aminokwasowych i zawierającej peptyd sygnałowy. W dalszej kolejności można wyróżnić sekwencję podjednostki α , zbudowaną z 103 reszt aminokwasowych (pozycje 45 do 147) oraz podjednostki β , złożonej z 83 reszt aminokwasowych (pozycje 234 do 316), które są oddzielone od siebie fragmentem γ (pozycje 148 do 233). Region γ zawiera trzy potencjalne miejsca N-glikozylacji [51]. Po wnikięciu preprotoksyny do retikulum endoplazmatycznego, dochodzi do rozszczepienia łańcucha polipeptydowego i usunięcia peptydu sygnałowego. Następuje glikozylacja fragmentu γ oraz powstają mostki disiarczkowe [65]. Protoksyna jest następnie transportowana do aparatu Golgiego i ulega przekształcaniu w dojrzałą toksynę K1. Wspomniana transformacja odbywa się poprzez hydrolizę co najmniej trzech wiązań peptydowych [51]. Endopeptydaza Kex2p kodowana przez gen *KEX2* jest odpowiedzialna za fragmentację protoksyny, oddzielenie regionu *pro*, poprzedzającego podjednostkę α

i usunięcie fragmentu γ . Karboksypeptydaza Kex1p, kodowana przez gen *KEX1*, hydrolizuje C-końcowy dipeptyd [51]. Opisane powyżej modyfikacje prowadzą do wydzielenia dojrzałej toksyny K1 – heterodimeru, połączonego trzema mostkami disiarczkowymi. Podjednostka α jest odpowiedzialna za cytotoksyczne działanie toksyny, natomiast podjednostce β przypisuje się istotną rolę podczas wiązania do ściany komórkowej drożdży wrażliwych [7].

W przypadku toksyny K2 prekursor białka ma masę cząsteczkową 38,7 kDa i jest złożony z 362 reszt aminokwasowych. Podczas procesu dojrzewania, peptyd sygnałowy zostaje usunięty, istotną rolę odgrywają również endopeptydaza Kex2p, hydrolizująca wiązania pomiędzy podjednostkami α i β . Najprawdopodobniej w preprotoksynie K2 nie jest obecna domena γ , a łańcuch α (170 reszt aminokwasowych) i β (140 reszt aminokwasowych) są nieco większe niż w toksynie K1. Podjednostka α jest N-glikozylowana w pozycjach 177 i 214 [51].

Prekursor toksyny killerowej K28 (preprotoksyna K28) ma masę cząsteczkową 37,6 kDa i jest polipeptydem zbudowanym z 345 aminokwasów. Zawiera N-końcową sekwencję sygnałową, niezbędną do transportu do retikulum endoplazmatycznego, która poprzedza sekwencje podjednostek α i β (w dojrzałej toksynie mają masy cząsteczkowe odpowiednio 10,5 oraz 11 kDa). Wspomniane podjednostki oddzielone są od siebie fragmentem γ , którego glikozylacja następuje w retikulum endoplazmatycznym. W aparacie Golgiego następuje usunięcie N-glikozylowanej sekwencji γ przez endopeptydazę Kex2p, natomiast karboksypeptydaza Kex1p usuwa C-końcowy dipeptyd, co prowadzi do wydzielenia heterodimerycznej, dojrzałej toksyny K28, zbudowanej z podjednostek α i β , połączonych jednym mostkiem disiarczkowym pomiędzy α -Cys⁵⁶ i β -Cys³⁴⁰ [80, 81].

Biosynteza toksyn killerowych w komórkach *K. lactis* stanowi przykład najlepiej opisanego systemu killerowego opartego na plazmidowym DNA. Fenotyp killerowy drożdży *K. lactis* związany jest z obecnością dwóch liniowych, cytoplazmatycznie dziedziczonych plazmidów DNA – pGKL1 (8,9 kpz) i pGKL2 (13,5 kpz). W mniejszym plazmidzie zlokalizowane są 4 otwarte ramki odczytu (ORF). ORF 2 (3,4 kpz) i ORF 4 (4,8 kpz) kodują prekursor podjednostek toksyny killerowej, ORF 3 (1,3 kpz) nadaje oporność komórce gospodarza, podczas gdy ORF 1 (1,3 kpz) koduje polimerazę DNA [51]. Natomiast większy z plazmidów (pGKL2) zawiera 10 genów i jest niezbędny do replikacji pGKL1. Toksyna killerowa *K. lactis*, zwana zymocyną, zbudowana jest z trzech podjednostek: α (99 kDa), β (30 kDa) i γ (27,5 kDa). ORF 2 koduje prekursor podjednostek α i β , o masie cząsteczkowej 128 kDa, zawierający N-końcowy peptyd sygnałowy. Prekursor kierowany jest do retikulum endoplazmatycznego, gdzie podlega glikozy-

lacji, a następnie jest transportowany do aparatu Golgiego i modyfikowany z udziałem peptydazy. N-końcowy peptyd sygnałowy podlega hydrolizie po stronie karboksylowej Arg²⁹. Oddzielnie kodowany jest prekursor podjednostki γ (ORF 4), zawierający N-końcowy peptyd sygnałowy, odcinany przez peptydazę podczas procesu dojrzewania toksyny [51].

Drożdże należące do gatunku *Williopsis mrakii* są przykładem mikroorganizmów, u których informacja genetyczna niezbędna do ujawnienia fenotypu killerowego zapisana jest w genomie jądrowym. Drożdże *W. mrakii* wytwarzają toksynę HM-1 (oznaczaną również jako HMK). Gen chromosomalny *hmk* koduje prekursor, zbudowany z 125 reszt aminokwasowych, zawierający 37-aminokwasową, N-końcową sekwencję sygnałową, hydrolizowaną przez endopeptydazę Kex2. Dojrzała toksyna jest nieglikozylowanym białkiem o masie cząsteczkowej 10,7 kDa, zbudowanym z 88 reszt aminokwasowych [49].

Mechanizm odporności drożdży na produkowane przez siebie białko killerowe jak dotąd został poznany jedynie dla szczepów drożdży *S. cerevisiae*, wytwarzających toksynę K28. Po internalizacji dojrzałej, aktywnej toksyny do cytozolu tworzy ona kompleks z nieprzetworzonym prekursorem K28, zanim zostanie skierowany do retikulum endoplazmatycznego. W obrębie kompleksu, podjednostka β dojrzałej toksyny oraz ta sama podjednostka jej prekursora podlegają poliubikwitynacji (procesowi przyłączenia cząsteczek ubikwityny w celu oznaczenia białka, które będzie podlegać proteolizie), po której następuje degradacja przez proteasom. Proteasomy to wielcząsteczkowe kompleksy enzymatyczne, odpowiedzialne za proteolityczną degradację niefunkcyjnych, nieprawidłowo zbudowanych lub uszkodzonych białek komórkowych.

Preprotoksyny K28, które pozostały w cytozolu niezwiązane i nie uległy ubikwitynacji, są kierowane do szlaku wydzielniczego w celu dalszej obróbki enzymatycznej, prowadzącej do powstania dojrzałych, biologicznie aktywnych toksyn [7].

3. Właściwości białek killerowych

Występowanie zjawiska killerowego wśród drożdży ma istotny związek z konkurencją szczepów o substancje odżywcze. Toksyny killerowe produkowane są przez rosnące komórki, a także wykazują największą aktywność wobec komórek w tej samej fazie rozwoju, gdy ilość dostępnych składników pokarmowych jest wystarczająca, a pH niskie. Uważa się, że owoce są szczególnie ważnym siedliskiem drożdży killerowych, ponieważ charakteryzują się one niskim pH i wysoką zawartością cukrów. Jedna czwarta szczepów drożdży izolowanych z owoców ma fenotyp killerowy [51].

Każda toksyna killerowa ma unikatowe właściwości, które różnią się w zależności od wytwarzającego ją rodzaju i gatunku drożdży. Różnice te dotyczą lokalizacji genów, które kodują toksyny, mechanizmów działania, jak również masy cząsteczkowej, która w przypadku białek killerowych mieści się w przedziale od kilku do ponad 100 kDa [55].

W większości, toksyny killerowe są stabilne i aktywne jedynie w niskim pH (4–4,6) i w niskich temperaturach. Takie warunki środowiska występują podczas fermentacji winiarskiej. Comitini i wsp. [20] badali zastosowanie dwóch toksyn – Kwkt z *Kluyveromyces wickerhamii* DBVPG 6077 oraz Pikt, wydzielanej przez *W. anomalus* DBVPG 3003, do hamowania wzrostu niepożądanych mikroorganizmów podczas dojrzewania i przechowywania wina. Analizowane toksyny wykazywały maksymalną aktywność przy pH równym 4,4, przy czym białko Pikt było nieco bardziej odporne na podwyższoną temperaturę niż Kwkt. Ograniczenie rozwoju drożdży *Dekkera bruxellensis* w winie po zastosowaniu toksyn Pikt i Kwkt, obserwowano przez okres 10 dni, co wskazuje na utrzymanie aktywności killerowej toksyn w tym przedziale czasowym [20].

Nawet toksyny killerowe produkowane przez drożdże izolowane ze środowiska morskiego działają najlepiej w środowisku kwaśnym. Aktywność bójcza oczyszczonej toksyny produkowanej przez *K. siamensis* HN12-1, przeciwko patogennym drożdżom *Metschnikowia bicuspidata* WCY, była najwyższa w pH 4 [12]. Podobny efekt stwierdzono w przypadku białka killerowego wytwarzanego przez *Mrakia frigida* 2E00797, gdzie antagonizm wobec *M. bicuspidata* WCY był najbardziej wyraźny przy pH 4,5 [35]. Zbliżone rezultaty otrzymano także drożdży killerowych *W. saturnus* WC91-2 izolowanych ze środowiska morskiego; optymalne warunki działania oczyszczonej toksyny przeciwko patogennym drożdżom *M. bicuspidata* WCY to pH 3–3,5 i temperatura 16°C [96].

Niektóre z toksyn killerowych o właściwościach wyjątkowych jak na tego typu białka, pozostają aktywne również w środowisku zasadowym. Jedną z najbardziej stabilnych toksyn killerowych – HM-1, produkowaną przez *W. mrakii* (*Hansenula mrakii*), zachowuje aktywność biologiczną ogrzewana przez 10 min w temperaturze 100°C i jest stabilna w zakresie pH 2–11 [49]. Wyjątkową stabilność HM-1 można wyjaśnić obecnością w jej strukturze 10 reszt cysteinowych, które tworzą mostki disiarczkowe [49]. Do grupy toksyn o wyjątkowych właściwościach zalicza się również białko killerowe wydzielane przez *W. saturnus*, stabilne w szerokim zakresie pH, wynoszącym 3–11 i aktywne po godzinnej inkubacji w temperaturze 80°C [55]. Znaczną stabilnością, wykraczającą poza typowy dla toksyn killerowych zakres pH, charakteryzuje się również białko killerowe produkowane przez *Tilletiopsis*

albescens, które zachowuje aktywność biologiczną przy pH 3,5–8 [55].

Poza kwestią kwasowości środowiska i temperatury, kolejnym istotnym czynnikiem wpływającym na aktywność niektórych toksyn jest obecność NaCl. Aktywność killerowa drożdży halofilnych i halotolerancyjnych może być warunkowana zasoleniem środowiska, w którym te drożdże bytują. U drożdży izolowanych z produktów o wysokim zasoleniu, aktywność killerowa zwykle wzrasta wraz ze zwiększeniem stężenia chlorku sodu w podłożu, a niekiedy obecność NaCl jest czynnikiem niezbędnym do ujawnienia się ich aktywności bójczej [98]. W badaniach szczepów drożdży killerowych, wyizolowanych z solanki po fermentacji oliwek, wykazano, że ich aktywność była wyższa w obecności soli, a spektrum bójczego działania wobec wrażliwych szczepów rosło wraz ze wzrostem stężenia soli [48]. Odnotowano, że dodatek NaCl zwiększał wrażliwość testowanych szczepów na działanie toksyn, nie stwierdzono jednak znaczącego wpływu soli na produkcję toksyn [48]. Fenotyp silnie stymulowany obecnością NaCl opisano także u halotolerancyjnych drożdży killerowych *Candida nodaensis* [26]. Autorzy wysunęli hipotezę, że NaCl zwiększa aktywność toksyny CnKT, produkowanej przez *C. nodaensis*, prawdopodobnie poprzez stabilizację jej struktury. Podobną zależność pomiędzy aktywnością killerową a obecnością NaCl obserwowano dla szczepu halotolerancyjnych drożdży *P. farinosa* KK1, które produkują toksynę SMK, wykazującą maksymalną aktywność przy stężeniu NaCl wynoszącym 2 M [87]. Toksyna ta, zbudowana z dwóch podjednostek (α i β), jest stabilna jedynie w środowisku kwaśnym. W środowisku o odczynie obojętnym i zasadowym łańcuch α ulega precypitacji, dochodzi do dysocjacji podjednostek, co skutkuje utratą aktywności killerowej [87]. Zależność aktywności killerowej od obecności NaCl jest także wyraźnie widoczna u drożdży killerowych izolowanych ze środowiska morskiego. Aktywność toksyny produkowanej przez szczep *M. frigida* 2E00797 wobec patogennych drożdży *M. bicuspidata* WCY była najwyższa w obecności NaCl w stężeniu 3% [35, 47]. Podobne rezultaty otrzymano w przypadku toksyny wytwarzanej przez szczep killerowy *W. saturnus* WC91-2, której aktywność wobec *M. bicuspidata* WCY była najwyższa w środowisku zawierającym 10% NaCl [96].

4. Mechanizm działania toksyn killerowych

Toksyny działają dwuetapowo, pierwszy etap obejmuje szybkie wiązanie białka killerowego z receptorem zlokalizowanym w ścianie komórkowej drożdży wrażliwych, nie wymaga nakładu energii i jest zależny od pH. Dla toksyn wytwarzanych przez *S. cerevisiae*

(K1, K2), *Hanseniaspora uvarum* oraz *P. membranifaciens* receptorem pierwszego rzędu jest β -1,6-D-glukan, dla toksyny K2, produkowanej przez *S. cerevisiae*, a także toksyny wydzielanej przez *Z. bailii* – 1,3-mannoproteina. Receptorem może być również chityna, która wiąże toksyny wytwarzane przez *P. acaciae* oraz *K. lactis* [72]. Drugi etap działania toksyn jest nieodwracalny i zależy od energii i, przebiega w różny sposób w zależności od rodzaju toksyny killerowej i jej stężenia.

W przypadku toksyny K1, dochodzi do jej translokacji do błony cytoplazmatycznej, a następnie interakcji z receptorem drugiego rzędu, którym jest glikoproteina Kre1p [11, 29]. Powstają kanały jonowe, błona komórkowa staje się przepuszczalna dla jonów i cząsteczek ATP, a to prowadzi do śmierci wrażliwej komórki. Badania Bartunek i wsp. [6] wykazały, że efekt cytotoksyczny wywołany działaniem toksyny K1 zależy od fazy cyklu komórkowego, w której znajdują się komórki drożdży wrażliwych. Największą opornością cechują się komórki w fazie M (podziału komórkowego), natomiast najbardziej wrażliwe są te w fazie S (syntezy DNA), cechujące się małymi pączkami [6]. W zbliżony sposób do toksyny K1, działa zygotocyna – toksyna wytwarzana przez osmotolerancyjne drożdże *Z. bailii*. Struktura i mechanizm biologicznej aktywności zygotocyny przypominają właściwości strukturalne i funkcjonalne peptydów przeciwdrobnoustrojowych wyższych eukariontów [97]. Białko killerowe łączy się z receptorem znajdującym się z błonie cytoplazmatycznej, co prowadzi do powstania kanałów oraz zwiększonej przepuszczalności metabolitów [97]. Podobną sekwencję zdarzeń opisano również dla toksyny produkowanej przez drożdże *P. kluyveri* [55, 61] oraz toksyny kFC-1, wytwarzanej przez drożdże *Filobasidium capsuligenum* [40].

Zbliżony mechanizm działania ma toksyna PMKT, wydzielana przez drożdże *P. membranifaciens* CYC 1106. Toksyna ta oddziałuje z błoną cytoplazmatyczną komórki wrażliwej poprzez interakcję z receptorem drugiego rzędu – białkiem Cwp2p [75], co prowadzi to do zaburzenia gradientu elektrochemicznego i homeostazy komórki wrażliwej. Powstają kanały, przez które wypływają jony takie jak: K^+ , Na^+ , protony oraz metabolity o niskiej masie cząsteczkowej (np. glicerol). Te zmiany pH i stężen jonów generują odpowiedź transkrypcyjną przez aktywację ścieżki HOG (High Osmolarity Glycerol), co w konsekwencji powoduje śmierć komórek wrażliwych [70, 71, 73].

Kolejnym często opisywanym mechanizmem działania toksyn killerowych jest blokowanie cyklu komórkowego. W ten sposób toksyna killerowa K28 wywiera efekt cytotoksyczny. Po związaniu się z receptorem drugiego rzędu, toksyna K28 podlega translokacji do retikulum endoplazmatycznego. Podjednostka β ulega ubikwitynacji, a następnie zostaje skierowana

do proteasomu i ulega degradacji, natomiast podjednostka α , przedostaje się do cytozolu, gdzie wysłany zostaje sygnał do jądra komórkowego komórki wrażliwej, w wyniku czego następuje zahamowanie syntezy DNA oraz zatrzymanie cyklu komórkowego we wczesnej fazie S [46, 55, 81].

Zbliżony mechanizm działania opisano również dla zymocyny, produkowanej przez drożdże *K. lactis*. Białko to zbudowane jest z trzech podjednostek. Podjednostka α ma aktywność chitynazy, funkcją kolejnej, hydrofobowej podjednostki β jest ułatwienie transportu podjednostki γ , która z kolei wywiera efekt cytotoksyczny na komórki docelowe. Polega on na rozszczepianiu transportującego RNA. Podjednostka γ hydroлізуje antykodon UUC tRNA, w wyniku czego następuje zahamowanie modyfikacji posttranslacyjnych oraz zatrzymanie cyklu komórkowego u drożdży wrażliwych w fazie G1 [38, 50, 55].

Klassen i Meinhardt [42] przeprowadzili badania dotyczące mechanizmu działania toksyny killerowej PaT, wytwarzanej przez *P. acaciae*, na drożdże wrażliwe należące do gatunku *S. cerevisiae*. Po około 4-godzinnej inkubacji obserwowano zmniejszoną żywotność komórek drożdży wrażliwych oraz zatrzymanie cyklu komórkowego we wczesnej fazie S. Kolejny, wyraźny spadek żywotności komórek wrażliwych nastąpił po około 10 h. Obserwowano znaczne zmiany morfologiczne komórek wrażliwych, w tym fragmentację DNA, prowadzące do apoptozy komórek drożdży *S. cerevisiae* [42]. Do zablokowania cyklu komórkowego w fazie syntezy DNA dochodzi również w przypadku aktywności toksyny PMKT2, wydzielanej przez *P. membranifaciens* CYC 1086 [70].

Kolejnym często opisywanym mechanizmem działania toksyn killerowych jest hydroliza β -1,3-D-glukanów. Izgü i Altinbay [36] wykazali, że toksyna (panamykocyna) produkowana przez *W. anomalus* (*Pichia anomala*), charakteryzuje się aktywnością egzozymy β -1,3-glukanazy. Mechanizm cytotoksycznego działania tego białka prawdopodobnie polega na hydrolizie β -1,3-D-glukanu – podstawowego składnika ściany komórkowej drożdży. Prowadzi to do wycieku cytoplazmy i śmierci komórki wrażliwej. Panamykocyna wykazuje aktywność bójczą szczególnie wobec tych drożdży, których ściany komórkowe charakteryzują się dużą zawartością β -1,3-D-glukanu, tj. *C. albicans*, *Torulaspora delbrueckii* oraz *Kluyveromyces marxianus* [36].

Podobny mechanizm działania, wiązany z aktywnością hydrolityczną wobec głównego składnika ściany komórkowej drożdży wrażliwych, opisali Guyard i wsp. [33] dla toksyny WmKT, produkowanej przez *W. saturnus* ser. *mraakii* MUCL 41968. Ponieważ sekwencja aminokwasowa toksyny WmKT wykazywała znaczne podobieństwo do sekwencji glukanaz, badano wpływ kastanosperminy (inhibitora glikozydaz) na aktywność

tej toksyny. Kastanospermina całkowicie hamowała aktywność toksyny WmKT. Przy zastosowaniu skaningowej mikroskopii elektronowej zobrazowano zmiany morfologiczne komórek wrażliwych po działaniu toksyny, świadczące o częściowej degradacji ściany komórkowej. Podobny efekt stwierdzono stosując zymoliazę – enzym hydrolizujący glukany [33].

Analogiczny sposób działania opisano dla toksyny killerowej KpKt, wydzielanej przez *Tetrapisispora phaffii* (*Kluyveromyces phaffii*). Toksyna ta działa na ścianę komórkową drożdży wrażliwych, powodując zmiany morfologii komórek. Zastosowanie kastanosperminy doprowadziło do zahamowania aktywności biologicznej toksyny KpKt. Na tej podstawie wysunięto hipotezę, że KpKt wykazuje aktywność hydrolityczną w stosunku do β -glukanów, znajdujących się w ścianie komórek docelowych. Koncepcję tę potwierdza brak wiązania i interakcji toksyny ze sferoplastami [21].

Selektywne blokowanie syntezy β -1,3-glukanu przypisuje się toksynie HM-1, produkowanej przez szczep drożdży *Williopsis saturnus* ser. *mrakii* IFO 0895. Inne polisacharydy wchodzące w skład ściany komórkowej, takie jak mannan i chityna, powstają w niezmiennym sposobie [88].”

Odmienny mechanizm działania zaproponowano dla toksyny KP4, produkowanej przez *U. maydis*. Wysunięto hipotezę, że ta toksyna hamuje wzrost i podział komórki poprzez blokowanie szlaków transdukcji sygnałów, regulowanych jonami wapnia [28, 46].

Mechanizm działania toksyn jest zależny nie tylko od rodzaju toksyny killerowej, ale i jej stężenia. Reiter i wsp. [67] udowodnili, że w przypadku trzech toksyn – K1, K28 i zygotyny, kodowanych przez geny zlokalizowane w cytoplazmatycznym dsRNA, białko killerowe w niskim i umiarkowanym stężeniu (< 1 pM) indukuje apoptozę komórki wrażliwej za pośrednictwem kaspazy drożdżowej Yca1p i reaktywnych form tlenu (ROS). Procesowi towarzyszy fragmentacja DNA, kondensacja chromatyny oraz translokacja fosfatydyloseryny na zewnątrz błony cytoplazmatycznej [82]. Białko killerowe w wysokim stężeniu (> 10 pM) powoduje nekrozę komórki wrażliwej na drodze typowej dla danej toksyny [82], poprzez przerwanie integralności błony komórkowej albo oddziaływanie z białkami komórki gospodarza zaangażowanymi w cykl komórkowy i/lub syntezę chromosomalnego DNA. Dwoistość mechanizmu działania, w tym programowaną śmierć komórki wrażliwej przy niskich stężeniach toksyny, obserwowano również dla białek killerowych PMKT i PMKT2 kodowanych chromosomalnie, bez obecności cząstek wirusopodobnych [8]. Wydaje się, że w naturalnym środowisku, toksyny killerowe występują w niskich stężeniach i właśnie indukcja apoptozy może odgrywać kluczową rolę w skutecznej eliminacji drożdży wrażliwych za pośrednictwem wydzielanych przez drożdże killerowe toksyn [67, 82].

5. Zastosowanie drożdży killerowych i ich toksyn

W tabeli 1 przedstawione zostały podstawowe informacje dotyczące wybranych szczepów drożdży killerowych, produkowanych przez nie toksyn oraz zakresu ich aktywności, a także przykłady ich potencjalnego zastosowania.

5.1. Wykorzystanie w winiarstwie

Jednym z obszarów przemysłu spożywczego, w którym drożdże killerowe i produkowane przez nie toksyny mogą znaleźć potencjalne zastosowanie jest przemysł fermentacyjny. Rozwój drożdży dzikich w moszczu gronowym oraz winie jest poważnym problemem dla producentów, gdyż może skutkować zaburzeniem procesu fermentacji. Drożdże killerowe są obiektem badań pod kątem zastosowania ich do ograniczenia rozwoju niepożądanych mikroorganizmów i poprawy cech jakościowych produktu.

Drożdże killerowe należące do gatunku *S. cerevisiae*, zastosowane jako kultury starterowe podczas fermentacji moszczów gronowych, mogą korzystnie wpłynąć na proces produkcji wina i jego jakość. Ograniczeniem stosowania toksyn K1, K2 i K28, produkowanych przez *S. cerevisiae*, jest wąskie spektrum aktywności antagonisticznej do wrażliwych szczepów *Saccharomyces* [17]. Jedynie szczepy drożdży *S. cerevisiae*, produkujące toksynę Klus, mogą także eliminować drożdże należące do innych gatunków niż producent toksyny, takie jak *C. albicans* oraz *K. lactis* [68]. Drożdże *Hanseniaspora/Kloeckera* dominują na powierzchni winogron oraz w świeżo wytłoczonym soku. Wzrost tych drożdży ogranicza się w niesterylnym środowisku, np. w moszczu gronowym, przez stosowanie ditlenku siarki. Jedną z alternatyw dla chemicznych środków może być użycie toksyn killerowych wykazujących aktywność wobec *Hanseniaspora/Kloeckera* [17]. Toksyną potencjalnie użyteczną w kontrolowaniu wzrostu *Hanseniaspora/Kloeckera* w świeżym moszczu i podczas pierwszego etapu fermentacji jest toksyna Kpkt, wytwarzana przez *T. phaffii* DBVPG 6076. Wyniki badań Ciani i Faticenti [17] wskazały, że efekt bójkowy lub mykostatyczny toksyny Kpkt względem niepożądanych drożdży uzależniony był od jej stężenia. Działanie toksyny Kpkt w moszczu gronowym było porównywalne do skuteczności działania SO_2 [17].

Poważnym problemem w winiarstwie są zanieczyszczenia drożdżami z rodzaju *Brettanomyces/Dekkera*, które przekształcają hydrokwasy do lotnych fenoli, takich jak: 4-etylofenol, 4-etylogwajakol i 4-etylokatechol. Prowadzi to do pojawienia się w winie niepożądanych aromatów (określanych jako „apteczne”, ziemiste, kojarzone ze stajnią, końską derką), zarówno pod koniec fermentacji, jak i podczas późniejszego dojrzewania.

Tabela I
Wybrane szczepy drożdży killerowych i ich potencjalne zastosowanie

Producent toksyny killerowej	Nazwa toksyny/ Masa cząsteczkowa	Zakres aktywności toksyny (pH, temp.)	Potencjalne zastosowanie	Piśmien- nictwo
<i>Candida nodaensis</i> PYCC 3198	CnKT	pH 3–7,5; < 40–50°C	konserwowanie żywności	[26]
<i>Candida pyralidae</i> IWB T Y1140 i IWB T Y1057	CpKT1 i CpKT2/ > 50 kDa	pH 3,5–4,5; 15–25°C	winiarstwo	[56, 57]
<i>Kluyveromyces lactis</i> IFO1267	zymocyna/ 157 kDa (α 97 kDa, β 31 kDa i γ 28 kDa)	pH 4,4–5,8; < 40°C	konserwowanie żywności	[8, 38]
<i>Kluyveromyces wickerhamii</i> DBVPG 6077	KwKt/ 72 kDa	pH 3,8–4,6; < 25°C	winiarstwo	[19, 20]
<i>Mrakia frigida</i> 2E00797	55,6 kDa	optymalne pH 4,5; < 25°C, 3% NaCl	zwalczanie chorób zwierząt morskich	[35, 47]
<i>Pichia kluyveri</i> DBVPG 5826	PkKp/ 54 kDa	środowisko kwaśne	winiarstwo	[44]
<i>Pichia kudriavzevii</i> RY55	39,8 kDa	środowisko kwaśne	środki terapeutyczne	[4]
<i>Pichia membranifaciens</i> CYC 1086	PMKT2/ 30 kDa	pH 2,5–4,8; < 20°C	winiarstwo	[8, 70, 76]
<i>Pichia membranifaciens</i> CYC 1106	PMKT/ 18 kDa	pH 3–4,8; < 20°C	winiarstwo, biologiczna ochrona roślin	[71, 72, 73, 74, 75, 77]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AWRI796	K2/ 21,5 kDa	optymalne pH 4,2–4,4; < 30°C	winiarstwo	[8]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS 8112	K28/ 21 kDa) (α 10,5 kDa i 11 kDa	optymalne pH 5	model biologiczny w badaniach endocytozy	[7]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Klus	Klus	pH 3,5–5,5; < 30°C	winiarstwo	[68]
<i>Tetrapisispora phaffii</i> DBVPG 6706	KpKt/ 33 kDa	pH 3–5; < 40°C	winiarstwo	[17, 20, 21, 22]
<i>Torulospora delbrueckii</i> NPCC 1033	TdKT/ 30 kDa	pH 4,2–4,8; < 40°C	winiarstwo	[91]
<i>Torulospora delbrueckii</i> Kbarr-1	Kbarr-1	środowisko kwaśne	winiarstwo	[66, 90]
<i>Ustilago maydis</i> P4	KP4/13,6 kDa	środowisko kwaśne	rośliny transgeniczne	[1, 59]
<i>Ustilago maydis</i> P6	KP6/ α 8,6 kDa i β 9,1 kDa	środowisko kwaśne	rośliny transgeniczne	[41]
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> DBVPG 3003	PiKt/ ~8 kDa	optymalne pH 4,4; 25–35°C	winiarstwo	[20]
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> ATCC 96603	PaKT	środowisko kwaśne	konstrukcja przeciwciał	[16, 52, 83]
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> NCYC 434	panamykocyna/ 49 kDa	pH 3–5,5; < 37°C	biologiczna ochrona roślin	[36, 37]
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> YF07b	47 kDa; 67 kDa	pH 3–5; < 40°C	zwalczanie chorób zwierząt morskich	[32, 93, 94, 95]
<i>Williopsis saturnus</i> DBVPG 4561	KT4561/ 62 kDa	pH 4,5–8; < 45°C	konserwowanie żywności, środki terapeutyczne	[13]
<i>Williopsis saturnus</i> WC91-2	11,6 kDa	pH 3–4; < 35°C; 8% NaCl	zwalczanie chorób zwierząt morskich	[96]
<i>Williopsis saturnus ser. mrakii</i> NCYC 2251	HM-1 (HMK)/ 10,7 kDa	pH 2–11; pozostaje aktywna po 10 min w 100°C	środki terapeutyczne, konserwowanie żywności	[49]
<i>Williopsis saturnus ser. mrakii</i> MUCL 41968	WmKT/ 85 kDa	optymalne pH 4,5; 26–28°C	środki terapeutyczne	[33]
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> DSM 12864	KT412 (zygocyna)/ 10 kDa	środowisko kwaśne	środki terapeutyczne	[97]

Drożdże z rodzaju *Brettanomyces/Dekkera* dobrze adaptują się do warunków panujących w środowisku, jakim jest wino, charakteryzującym się wysokim stężeniem etanolu, wysoką kwasowością, niskim stężeniem cukrów oraz dużą zawartością związków polifenolowych. Wciąż poszukiwane są skuteczne sposoby zapobiegania rozwojowi *Brettanomyces/Dekkera* (w szczegól-

ności *D. bruxellensis*) w winie. Zastosowanie związków chemicznych (kwasu benzoowego lub sorbowego), jak również metod fizycznych (np. filtracji) okazuje się niewystarczająco efektywne. Dodatek SO₂ niekorzystnie wpływa na organizm człowieka, dlatego Światowa Organizacja Zdrowia podkreśla konieczność ograniczenia stosowania tego środka przeciwdrobnoustrojowego

w produktach spożywczych [17, 20]. Jednym ze sposobów eliminowania zanieczyszczeń *Brettanomyces/Dekkera* może być użycie toksyny killerowej KwKt, produkowanej przez *K. wickerhamii* DBVPG 6077. Dodatek oczyszczonej toksyny w stężeniu 40 i 80 mg·l⁻¹ skutecznie przeciwdziałał wzrostowi niepożądanych drożdży. W winie nie stwierdzono etylofenoli, produkowanych przez *Brettanomyces/Dekkera*. Dodatek toksyny Kwkt może być skuteczną biologiczną metodą zwalczania drożdży *Brettanomyces/Dekkera* podczas fermentacji, dojrzewania i przechowywania wina [19].

Labrani i wsp. [44] wyizolowali białko killerowe Pkkp, wydzielane przez *P. kluyveri* DBVPG 5826, które wykazywało aktywność wobec wielu mikroorganizmów skażających żywność i napoje. Aktywność bójcza toksyny Pkkp względem *D. bruxellensis* była wielokrotnie wyższa niż powszechnie stosowanego w winiarstwie pirosiarczynu potasu. Nie odnotowano synergizmu działania Pkkp w połączeniu z pirosiarczynem potasu, sorbinianem potasu lub etanolem [44]. Skuteczność działania innego białka, toksyny PMK2, względem *D. bruxellensis* została udokumentowana w badaniach Santosa i wsp. [76]. Obiecujące wyniki otrzymano także w badaniach toksyn CpKT1 oraz CpKT2, wytwarzanych przez *Candida pyralidae*. Białka te wykazywały aktywność killerową wobec *D. bruxellensis* w warunkach fermentacji winiarskiej. Aktywność toksyn CpKT1 oraz CpKT2 nie malała w obecności etanolu i cukru (glukozy i fruktozy w stosunku 1:1), w zakresie stężeń typowych dla wina oraz moszczu gronowego. Ponadto toksyny te nie wpływały negatywnie na rozwój drożdży *S. cerevisiae* oraz bakterii kwasu mlekowego [57]. Antagonistyczne działanie tych toksyn wobec *D. bruxellensis* polega na uszkodzeniu ściany komórkowej wrażliwych drożdży [56].

Szczep killerowy *T. delbrueckii* NPCC 1033, produkujący toksynę TdKT, jest kolejnym przykładem drożdży działających antagonistycznie w stosunku do mikroorganizmów niepożądanych w winiarstwie. Szczep ten i syntetyzowana toksyna wykazują aktywność killerową wobec *D. bruxellensis* i *H. uvarum* oraz niektórych szczepów *M. guilliermondii* i *P. membranifaciens*, jednocześnie nie hamują rozwoju drożdży szlachetnych *S. cerevisiae*. Badania prowadzone przez Villalba i wsp. [91] dowiodły, że w obecności toksyny TdKT, po trzygodzinnej inkubacji dochodzi do nekrozy, a po dłuższej, trwającej 24 h, do apoptozy komórek wrażliwych [91]. Drożdże *T. delbrueckii* mogą być wprowadzane do fermentacji winiarskiej w celu poprawy niektórych specyficznych cech wina. W badaniach Velázquez i wsp. [90] do produkcji białych win stołowych użyto nowych szczepów killerowych *T. delbrueckii* Kbar [66], które wykazują aktywność antagonistyczną również wobec *S. cerevisiae*. Sekwencyjna inokulacja niejałowego moszczu, najpierw kulturą

T. delbrueckii, a następnie *S. cerevisiae*, nie zapewniła dominacji szczepów *T. delbrueckii* ani poprawy jakości wina. Tylko w przypadku moszczu, który inokulowano równocześnie *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae*, w proporcji 9:1, szczepy killerowe *T. delbrueckii* zdominowały środowisko fermentacyjne i uzyskano produkt o zawartości etanolu ponad 11%.

Nie stwierdzono istotnych różnic w końcowym wyniku oceny sensorycznej otrzymanych win. Jednak wina, gdzie szczepy *S. cerevisiae* dominowały były preferowane w porównaniu z winami, gdzie dominowały drożdże *T. delbrueckii*, ponieważ te pierwsze miały intensywniejsze aromaty świeżych owoców, podczas gdy te drugie charakteryzowały się mniej intensywnymi, ale również ocenianymi jako przyjemne aromatami suszonych owoców [90].

Toksyna PMKT, wytwarzana przez *P. membranifaciens* i aktywna jak większość białek killerowych w środowisku o niskim pH oraz w niskiej temperaturze, może znaleźć potencjalne zastosowanie w winiarstwie do zwalczania drożdży z rodzaju *Zygosaccharomyces*, które są odporne nie tylko na wysokie stężenia cukru, ale także na dodatek sorbinianu potasu. Drożdże *Zygosaccharomyces* stanowią zagrożenie szczególnie w produkcji win słodkich, gdzie powodują wtórną fermentację. Z przeprowadzonych badań przez Alonso i wsp. [2] wynika, że toksyna PMKT działa synergistycznie z pirosiarczynem potasu, umożliwiając skuteczne hamowanie rozwoju drożdży *Zygosaccharomyces* [2].

Badano również wpływ obecności drożdży *W. anomalus* CBS 1982 i *W. anomalus* CBS 5759 na skład chemiczny i cechy sensoryczne win jabłkowych. Niepasteryzowane i pasteryzowane moszcze jabłkowe inokulowano kulturą mieszaną tych drożdży i *S. cerevisiae*. Dodatek szczepów killerowych do niepasteryzowanych moszczów znacząco zmienił kinetykę fermentacji i korzystnie wpłynął na skład chemiczny win jabłkowych. W pasteryzowanych moszczach jabłkowych obecność szczepów killerowych skutkowała wzrostem wydajności fermentacji oraz zwiększeniem poziomu polifenoli. Zastosowanie szczepów *W. anomalus* wraz z drożdżami *S. cerevisiae* w formie kultury mieszanej poprawiło skład chemiczny i cechy sensoryczne win jabłkowych [78]. Otrzymane wina charakteryzowały się wyżej ocenianą barwą, łagodniejszym smakiem i przyjemniejszym aromatem.

Sprawdzono również czy dodatek białek killerowych nie zaburzy fermentacji, prowadzonej przez *S. cerevisiae* i nie wpłynie niekorzystnie na skład chemiczny wina. W tym celu badano wpływ preparatów częściowo oczyszczonych toksyn typu K8, K4 i K7 (wydzielanych przez szczepy drożdży *W. anomalus* CBS 1981, *W. anomalus* CBS 5759 oraz *P. membranifaciens* CBS 7373) na przebieg procesu fermentacji i skład chemiczny win jabłkowych. Dodatek toksyn do moszczów jabłkowych,

uprzednio inokulowanych kulturami starterowymi drożdży *Saccharomyces*, nie zmienił w znaczący sposób kinetyki fermentacji, w większości otrzymane wina jabłkowe charakteryzowały się nieco wyższą zawartością alkoholu etylowego. Dodatek toksyn w niewielkim stopniu wpłynął na profil związków lotnych [10].

5.2. Potencjalne zastosowanie w medycynie

W próbach praktycznego zastosowania toksyn killerowych należy brać pod uwagę, że ich działanie w znacznym stopniu ograniczone jest do środowiska o stosunkowo niskim pH oraz niskiej temperaturze. Udowodniono, że wiele toksyn, m.in. HM-1, PaKT, zygocyna, w badaniach *in vitro* wykazuje aktywność przeciwmikrobiologiczną względem patogennych drożdży, takich jak *C. albicans* oraz *Cryptococcus neoformans* [8, 51, 92, 97]. Toksyny te mogłyby być użyteczne w zwalczaniu infekcji wywołanych przez chorobotwórcze grzyby, jednak ich zastosowanie jest ograniczone ze względu na niestabilność w fizjologicznym pH i temperaturze panującej w organizmie ludzkim [8]. Jedynie niektóre toksyny killerowe, np. wytwarzane przez *Williopsis*, charakteryzujące się znaczną jak na tego typu białka stabilnością, mogą być wykorzystane do celów terapeutycznych [13]. Próby użycia preparatów zawierających stabilne toksyny na zainfekowaną skórę, powierzchnię błon śluzowych lub jako dodatek do rozтворów buforowych wydają się być obiecujące [8].

Drożdże z rodzaju *Candida* licznie występują w mikrobiomie jelita człowieka, ale również zasiedlają jamę ustną i płuca [53]. Rodzaj *Candida* obejmuje około 150 gatunków, ale tylko 9 z nich uznaje się za patogenne dla człowieka [69]. Banjara i wsp. [5] przeprowadzili badania nad redukcją liczby patogennych drożdży *Candida* przez zastosowanie drożdży killerowych *D. hansenii*. 42 szczepy *D. hansenii*, wyizolowane z 22 próbek różnych rodzajów serów dojrzewających, oceniono pod kątem aktywności wobec drożdży *Candida* sp. Dwaścieścia trzy szczepy wykazywały aktywność killerową w stosunku do *C. albicans* i *C. tropicalis* w środowisku o pH < 6,5 i w temperaturze ≤ 35°C. Preparat nieoczyszczonej toksyny, wytwarzanej przez szczep *D. hansenii* Dh-237, redukował wzrost *C. albicans* w temperaturze 35°C przez okres 24 h. Natomiast szczep killerowy zawarty w próbce sera Romano zachowywał aktywność killerową, zarówno przeciwko *C. albicans*, jak i *C. tropicalis*, przez okres 10 dni w temperaturze 37°C. Na podstawie tych obserwacji autorzy pracy wysnuli przypuszczenie, że szczepy killerowe *D. hansenii* zawarte w serze mogą wpływać na populację drożdży *Candida* w jelitach [5].

Obiecujące wyniki uzyskano w przypadku szczepu drożdży *W. anomalus* Wa1F1 wyizolowanego z muchy piaszkowej *Phlebotomus perniciosus*. Toksyna killerowa

produkowana przez ten szczep została oczyszczona i scharakteryzowana, a jej aktywność przeciwdrobnoustrojowa była testowana *in vitro* przeciwko zarówno wrażliwym, jak i opornym na flukonazol, izolatom klinicznym i szczepom laboratoryjnym *C. albicans* i *C. glabrata* oraz ich mutantom. W temperaturze 25°C toksyna nie wykazywała aktywności killerowej wobec referencyjnego szczepu *C. albicans* SC5314, wrażliwych na flukonazol izolatów klinicznych (*C. albicans* DSY347 i DSY544) oraz mutantu DSY775 opornego na flukonazol, pochodzącego od szczepu *C. albicans* DSY544. Toksyna była aktywna w stosunku do mutantu DSY289 opornego na flukonazol, wywodzącego się od szczepu *C. albicans* SY347, a także wobec wszystkich użytych w badaniu, wrażliwych i opornych na flukonazol, izolatów klinicznych *C. glabrata* i ich mutantów [30].

Jedne z badań prowadzonych w ostatnich latach wskazują, że toksyny killerowe również mogą znaleźć zastosowanie w walce z malarią. Malaria jest chorobą tropikalną, wywołowaną przez pierwotniaki z rodzaju *Plasmodium* i przenoszona przez samice komarów z rodzaju *Anopheles*. Programy zwalczania malarii obejmują leczenie farmakologiczne, które jednak może powodować skutki uboczne, nie zawsze jest skuteczne, a także kosztowne. Przy braku skutecznych szczepionek, stosuje się środki owadobójcze w celu zmniejszenia liczebności populacji owadów stanowiących wektory przenoszące pierwotniaki. Cappelli i wsp. [15] wykazali, że szczep *W. anomalus* WaF17.12 znajdujący w gonadach oraz w jelitach samic komarów *Anopheles stephensi* produkuje toksynę killerową WaKT. Toksyna ta działa antagonistycznie wobec zarodźca *Plasmodium berghei* w warunkach *in vitro*. Obserwowano zahamowanie wzrostu pierwotniaków poddanych działaniu toksyny WaKT sięgające nawet 90% [15, 89].

Nieliczne badania sugerują, że toksyny killerowe mogą również wykazywać działanie przeciwbakteryjne. Szczepem drożdży, któremu przypisuje się taki potencjał jest *Pichia kudriavzevii* RY55. Bajaj i wsp. [4] odnotowali, że produkuje on toksynę killerową, która wykazuje aktywność bójczą w stosunku do bakterii: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Pseudomonas alcaligenes*. Według autorów, toksyna produkowana przez *P. kudriavzevii* RY55 może zostać użyta podczas opracowywania nowych środków przeciwbakteryjnych, także do konserwowania żywności oraz jako składnik kultur starterowych dla przemysłu fermentacyjnego [4]. W innych badaniach wykazano natomiast, że wyizolowany z owoców cytrusowych szczep killerowy *Kazachstania exigua* 120 hamuje rozwój bakterii *P. aeruginosa*, *E. coli* i *Klebsiella pneumoniae* [60].

Hu i wsp. [34] wskazują, że drożdże killerowe mogą również hamować rozwój komórek nowotworowych w warunkach *in vitro*. Autorzy badali wpływ filtratów

pohodowlanych drożdży killerowych z rodzaju *Barnetozyma* oraz *Pseudozyma* na linię komórek nowotworowych HepG2. Stwierdzono, że filtry zawierają związki, które indukują apoptozę komórek nowotworowych, bez uszkodzenia komórek zdrowych [34]. Ponieważ w badaniu nie zostały użyte oczyszczone białka killerowe, nie można jednoznacznie stwierdzić, że za obserwowany efekt cytotoksyczny odpowiadają toksyny killerowe, a nie inne związki wchodzące w skład filtratów.

Nadal istnieje potrzeba opracowania nowych, profilaktycznych oraz terapeutycznych strategii przeciwzakaźnych. Przeciwciała naśladujące aktywność biologiczną toksyn (KTAbs), które w swej strukturze zawierają wewnętrzny obraz centrum aktywnego toksyny, hamują funkcje, które są krytyczne dla przeżycia mikroorganizmów, wywierając w ten sposób działanie przeciwmikrobiologiczne [52]. Toksyna killerowa PaKT, produkowana przez drożdże *W. anomalus* ATCC 96603, charakteryzuje się szerokim spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej i może także znaleźć zastosowanie w zwalczaniu pneumocystozy – choroby płuc, wywoływanej przez grzyby *Pneumocystis jiroveci* (*Pneumocystis carinii*). Choroba ta dotyka głównie pacjentów z obniżoną odpornością, np. zakażonych wirusem HIV, chorujących na białaczkę, chłoniaki, jak również leczonych immunosupresyjnie. Stwierdzono, że toksyna PaKT w badaniach *in vitro* skutecznie ogranicza rozwój *P. jiroveci*. Ponieważ ta toksyna killerowa nie może być stosowana bezpośrednio jako środek leczniczy, dlatego też opracowano podstawy nowej strategii terapeutycznej z zastosowaniem antyidiotypowych przeciwciał przypominających toksynę PaKT oraz naśladujących jej aktywność przeciwgrzybiczą [83, 84]. Konstruuąc przeciwciała opierano się na założeniu, że interakcja pomiędzy toksyną killerową (KT) a specyficznymi przeciwciałami zdolnymi do neutralizacji jej aktywności może odzwierciedlać oddziaływanie toksyny ze specyficznymi receptorami ściany komórki wrażliwej. Przeciwciało monoklonalne anti-PaKT (mAb KT4) wytworzone zostało metodą fuzji splenocytów myszy, które uprzednio immunizowano PaKT, z komórkami szpiczaka. Otrzymane przeciwciało mAb KT4 neutralizowało aktywność bójczą PaKT przeciwko referencyjnemu szczepowi *C. albicans* [52]. Kiedy mAb KT4 zastosowano do immunizacji królików przez szczepienie idiotypowe, uzyskano antyidiotypowe KAbs, które były w stanie konkurować z PaKT o wiązanie z mAb KT4 i, co istotne, hamować wzrost referencyjnego szczepu wrażliwego *C. albicans*, tym samym naśladując aktywność PaKT [52].

Skonstruowano poliklonalne, monoklonalne i rekombinowane przeciwciała antyidiotypowe naśladujące aktywność biologiczną toksyn, które w badaniach *in vitro* wykazały szerokie spektrum działania bójczego przeciwko *C. albicans* [63] oraz innym gatunkom

drożdży z rodzaju *Candida* [54], *P. jiroveci* [83, 84], *Aspergillus fumigatus* [16], jak również wobec bakterii patogennych, w tym *Mycobacterium tuberculosis* o oporności wielolekowej [23], opornych na antybiotyki Gram-dodatnich ziarniaków [24], paciorkowców izolowanych z jamy ustnej [25] oraz pierwotniaków: *Leishmania major*, *Leishmania infantum* [79] i *Acanthamoeba castellanii* [27].

Podjęto również próby zastosowania drożdży killerowych do szybkiej identyfikacji patogennych szczepów *Nocardia asteroides* [64]. W oparciu o 4 szczepy drożdży killerowych (*Candida maltosa* G7A, *D. hansenii* P41, *W. saturnus* DBVPG 3127 i *W. saturnus* DBVPG 3671) opracowano procedurę pozwalającą na odróżnienie *C. albicans* od innych gatunków z rodzaju *Candida* [14].

5.3. Zwalczanie chorób grzybowych roślin

Owoce i warzywa podczas wzrostu i przechowywania są narażone na choroby wywołane przez pleśń. Konsekwencją występowania chorób grzybowych jest zmniejszenie zbiorów i pogorszenie ich jakości. Straty owoców, np. jabłek, podczas przechowywania, wywołane przez grzyby fitopatogenne sięgają nawet 25% początkowej ilości [39]. Oprócz strat ekonomicznych, wzrost pleśni w artykułach spożywczych, może mieć niebezpieczne konsekwencje dla zdrowia ludzi w związku z produkcją mikotoksyn oraz wytwarzaniem konidiów, które mogą powodować alergie [18]. Aby zapobiec chorobom grzybowym stosuje się fungicydy, których zaletami są wysoka skuteczność i łatwość stosowania. Jednak zwalczanie pozbiorowych chorób grzybowych przez stosowanie środków chemicznych niesie wiele skutków. Pozostałości fungicydów mogą negatywnie wpływać na bezpieczeństwo zdrowotne konsumentów. Stosowanie fungicydów powoduje zanieczyszczenie środowiska i może prowadzić do wzrostu oporności fitopatogenów na czynniki chemiczne oraz redukcji liczebności pożytecznych organizmów. Nadal poszukuje się nowych rozwiązań, a biologiczne metody ochrony roślin cieszą się dużym zainteresowaniem. Biokontrola chorób roślin pochodzenia grzybowego może obejmować stosowanie drożdży antagonistycznych. Drożdże killerowe mają właściwości, które pozwalają uznać je za potencjalną, bezpieczną alternatywę dla środków chemicznych. W warunkach konkurencyjnych fenotyp killerowy daje przewagę szczepom drożdży killerowych w stosunku do innych, wrażliwych mikroorganizmów zasiedlających tę samą niszę ekologiczną [80]. Jednak produkcja toksyn killerowych jest tylko jednym ze sposobów antagonistycznego działania drożdży wobec patogenów grzybowych. Innymi są m.in. konkurencja o przestrzeń i składniki odżywcze (np. źródło węgla, azotu, kationy żelaza), wytwarzanie enzymów degradujących ściany komórkowe (np. chitynaz i glukanaż),

produkcja metabolitów lotnych, indukcja odporności gospodarza i tworzenie biofilmu [43, 58, 85].

Aloui i wsp. [3] badali możliwość zastosowania powłok otrzymanych z alginianu sodu lub mączki chleba świętojańskiego, zawierających drożdże killerowe *W. anomalus* BS 91, do kontroli wzrostu *Penicillium digitatum* na powierzchni owoców pomarańczy. Powłoki wzbogacone o drożdże killerowe *W. anomalus* hamowały rozwój pleśni *P. digitatum* na owocach o ponad 73% po 13 dniach ich przechowywania w temperaturze 25°C. Dodatkowo, bioaktywne powłoki ograniczały utratę wody i pozwalały na utrzymywanie jędrności owoców w czasie ich przechowywania. W innych badaniach Platania i wsp. [62] odnotowali, że szczep killerowy *W. anomalus* BS91 hamował wzrost *P. digitatum* na owocach pomarańczy do 10 dnia przechowywania. Poza produkcją toksyn killerowych szczepy drożdży należące do gatunku *W. anomalus* mogą wytwarzać β -glukanazy, które degradują ścianę komórkową i powodują lizę komórek grzybów [62]. W innej pracy odnotowano również, że panamykocyna, toksyna killerowa *W. anomalus* NCYC 434 o aktywności β -glukanazy, zastosowana na powierzchnię owoców cytryny, uprzednio mechanicznie uszkodzonych i skażonych pleśniami *P. digitatum* oraz *P. italicum*, redukowała psucie się owoców i wydłużała okres ich trwałości. Toksyna ta w stężeniu 16 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ całkowicie hamowała rozwój wspomnianych pleśni przez okres 7 dni [37]. Badania przeprowadzone przez Pereza i wsp. [60] wykazały, że mikroorganizmami, które skutecznie przeciwdziałają rozwojowi *P. digitatum* oraz *P. italicum* na powierzchni cytryn, poza drożdżami z rodzajów *Pichia* i *Wickerhamomyces*, są również *K. exigua* (*Saccharomyces exiguus*), uznawane jako organizmy GRAS [60].

Lima i wsp. [45] badali skuteczność antagonistycznego działania dwóch szczepów killerowych, *W. anomalus* 422 oraz *Meyerozyma guilliermondii* 443, wobec *Colletotrichum gloeosporioides*, fitopatogenu wywołującego antraknozę papai i innych owoców tropikalnych. Otrzymano obiecujące wyniki wskazujące, że szczepy *W. anomalus* i *M. guilliermondii* redukowały częstość występowania antraknozy na owocach odpowiednio o 24,62% i 20,68% podczas przechowywania przez 6 dni.

Santos i wsp. [77] wykazali, że stosowanie szczepu killerowego *P. membranifaciens* CYC 1106 skutecznie ograniczało rozwój pleśni *B. cinerea* CYC 20010. Drożdże killerowe, w ilości około 10^6 komórek w 1 ml, całkowicie zahamowały wzrost *B. cinerea* na uszkodzonych mechanicznie i uprzednio skażonych jabłkach. Ograniczenie rozwoju *B. cinerea* uzyskano także stosując oczyszczoną toksynę killerową PMKT, produkowaną przez *P. membranifaciens* CYC 1106. Mniejsze hamowanie wzrostu patogenu obserwowane po zastosowaniu oczyszczonej toksyny w porównaniu z aplikacją szczepu killerowego potwierdziło, że dodatkowe mechani-

zmy były zaangażowane w antagonistyczne działanie *P. membranifaciens* CYC 1106 [77]. Mechanizmami tymi mogą być współzawodnictwo o składniki odżywcze lub wydzielanie enzymów degradujących ścianę komórkową *B. cinerea* [77]. W innych badaniach oceniano wpływ drożdży killerowych *P. membranifaciens* i oczyszczonej toksyny PMKT na rozwój *B. cinerea* na skażonych liściach *Vitis vinifera* [74]. Również w tym przypadku obserwowano całkowite zahamowanie wzrostu fitopatogenu, gdy użyto aktywnych komórek *P. membranifaciens* CYC 1106, natomiast gdy stosowano oczyszczoną toksynę ograniczenie rozwoju *B. cinerea* wynosiło 80%. Obserwacja ta potwierdza występowanie dodatkowych, poza produkcją białek killerowych, mechanizmów antagonistycznej aktywności *P. membranifaciens*, takich jak produkcja enzymów hydrolicyzujących ścianę komórkową *B. cinerea* lub rywalizacja o składniki pokarmowe. Wyniki te wskazują, że drożdże killerowe *P. membranifaciens* i ich toksyny mogą być brane pod uwagę przy opracowaniu preparatów służących skutecznej kontroli rozwoju *B. cinerea*.

Badano również antagonistyczne oddziaływanie szczepów killerowych *Debaryomyces hansenii* KI2a, *D. hansenii* MI1a i *W. anomalus* BS91 wobec *Monilinia fructigena* i *M. fructicola*. Spośród testowanych drożdży najwyższą aktywnością przeciwwgrzybiczą *in vitro* cechowały się *D. hansenii* KI2a i *W. anomalus* BS91 poprzez produkcję toksyn killerowych, enzymów hydrolitycznych i lotnych związków organicznych (VOCs – Volatile Organic Compounds). Wspomniane szczepy skutecznie hamowały występowanie brązowej zgnilizny na owocach brzoskwiń i śliw uprzednio inokulowanych fitopatogenami *M. fructigena* i *M. fructicola* [31]. Antagonistyczne szczepy *D. hansenii* i *W. anomalus* mogą być użyteczne jako składniki aktywne podczas opracowania biofungicydów przeciwko grzybom z rodzaju *Monilinia*.

5.4. Transgeniczne rośliny wytwarzające toksyny killerowe

Jedną z prób rozwiązania problemu chorób grzybowych roślin jest transgeniczna ekspresja peptydów przeciwwgrzybiczych. Toksyny killerowe KP4 i KP6, produkowane przez gatunek *U. maydis*, okazały się skuteczne w uodpornieniu uprawy tytoniu oraz kukuurydzy na choroby grzybowe. Dzięki zastosowaniu inżynierii genetycznej geny kodujące toksyny KP4 i KP6 zostały przeniesione do komórek tytoniu za pomocą promotora konstytutywnego wirusa mozaiki kalafiora. Transgeniczna roślina wytwarzała znaczne ilości toksyny KP4, która miała tą samą masę cząsteczkową oraz wykazywała identyczną specyficzność działania, co toksyna KP4, produkowana przez *U. maydis*. Poziom ekspresji toksyny KP4 w transgenicznym tytoniu był co najmniej 500 razy wyższy niż KP6. Transgeniczne

rośliny wydzielające toksynę KP4 były odporne na grzyby patogenne, których antagonistą jest toksynotwórczy szczep *U. maydis* [41, 59]. Otrzymano również transgeniczną kukurydzę wytwarzającą aktywną toksynę KP4 w ilości wystarczającej do zahamowania rozwoju grzybów patogennych. Ponadto, nie stwierdzono negatywnego wpływu tej toksyny na wzrost roślin transgenicznych [1].

5.5. Zastosowanie drożdży killerowych w środowisku morskim

Podjmuje się również próby wykorzystania drożdży killerowych w środowisku wodnym. Choroby zwierząt morskich wywołane przez mikroorganizmy występujące w środowisku wodnym przynoszą znaczne straty ekonomiczne. Patogendem odpowiedzialnym za mleczne zabarwienie tkanek krabów portuników (*Portunus trituberculatus*) i ich znaczną śmiertelność jest *M. bicuspidata* WCY. Zastosowanie nystatyny, związku o działaniu przeciwgrzybiczym, skutecznie hamuje wzrost patogenu, jednak nawet w niskich stężeniach jest ona toksyczna dla krabów. Stosowanie kosztownego antybiotyku na otwartym morzu wydaje się również mało racjonalnym postępowaniem z ekonomicznego punktu widzenia [46, 94].

Organizmem antagonistycznym w stosunku do *M. bicuspidata* WCY jest szczep drożdży *W. anomalus* YF07b, wyizolowany z jelit zachw (*Ascidia*). Produkuje on dwa białka killerowe, jedno o masie cząsteczkowej 47 kDa [95], a drugie o masie 67 kDa [32], które są aktywne w obecności chlorku sodu. Szczep drożdży *Kluyveromyces siamensis* HN12-1 również wykazuje aktywność killerową wobec *M. bicuspidata* WCY, a optymalne warunki do produkcji toksyny HN12-1 to pH równe 4, temperatura 25°C oraz 0,5% chlorku sodu. Oczyszczona toksyna nie była aktywna wobec protoplastów drożdży patogennych, co sugeruje, że pierwszy etap działania białka najprawdopodobniej polega na oddziaływaniu z receptorami znajdującymi się w ścianie komórkowej drożdży wrażliwych [12]. Psychrotolerancyjny szczep drożdży *M. frigida* 2E00797, wyizolowany z osadów morskich, produkuje toksynę killerową o masie cząsteczkowej 55,6 kDa, której aktywność killerowa jest najwyższa w środowisku o pH 4,5 oraz w obecności chlorku sodu w stężeniu 6%. Białko to nie tylko działa na patogenne grzyby, wywołujące choroby krabów, lecz jest także cytotoksyczne w stosunku do patogenów człowieka – *C. tropicalis* oraz *C. albicans* [35, 47]. Kolejnym szczepem drożdży killerowych o interesujących cechach i potencjalnym zastosowaniu jest *W. anomalus* HN1-2, wyizolowany z ekosystemu lasu namorzynowego. Odnotowano, że białko killerowe produkowane przez ten szczep działa cytotoksycznie wobec komórek wielu grzybów szeroko rozpowszechnionych w środo-

wisku naturalnym: *M. bicuspidata*, *C. albicans*, *M. guilhermondii*, *Lodderomyces elongisporus*, *Yarrowia lipolytica* oraz *Kluyveromyces aestuarii* [86]. Do grupy toksyn, których producentem bytuje w środowisku morskim należy również białko killerowe, wydzielane przez *W. saturnus* WC91-2, wykazujące antagonistyczne działanie w stosunku do szeregu patogenów: *M. bicuspidata* WCY, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus aureus*, *Y. lipolytica*, *L. elongisporus*. Optymalne warunki środowiska, zapewniające wysoką stabilność tej toksyny to pH w zakresie 3–3,5 i 8% NaCl [93, 96]. Środowisko morskie charakteryzuje się temperaturą i zawartością soli, które są odpowiednie dla zapewnienia wysokiej aktywności killerowej wielu toksyn produkowanych przez drożdże, izolowane ze środowiska wodnego. Lekko zasadowy odczyn wody wykracza poza optymalny zakres pH dla większości toksyn killerowych.

6. Podsumowanie

Nadal opisywane są nowe szczepy drożdży killerowych, a niektóre z nich (szczególnie należące do rodzajów *Wickerhamomyces* i *Pichia*) charakteryzują się szerokim zakresem aktywności antagonistycznej wobec wielu szczepów drożdży i grzybów strzępkowych. Stosunkowo niska stabilność toksyn killerowych, ograniczona do wąskiego zakresu pH i temperatury, zmniejsza możliwości ich potencjalnego zastosowania jedynie do środowisk, które zapewniają odpowiednie warunki fizyko-chemiczne. Użycie toksyn killerowych na szerszą skalę może być również ograniczone z powodu wysokich kosztów izolacji oraz oczyszczania. Prostsze i znacznie tańsze wydaje się stosowanie aktywnych szczepów drożdży, będących ich producentami. Drożdże killerowe i ich toksyny mogą znaleźć potencjalne zastosowanie w wielu dziedzinach, m.in.: w przemyśle fermentacyjnym, jako czynniki biologiczne kontroli chorób roślin, w biotypowaniu szczepów drożdży, a także podczas projektowania nowych środków przeciwgrzybiczych.

Nadal wiele zagadnień związanych ze strukturą toksyn killerowych, mechanizmami ich działania, a także odpowiedzią komórkową mikroorganizmów wrażliwych wymaga poznania. Wyjaśnienie tych wątpliwości pozwoli na opracowanie skuteczniejszych strategii zwalczania niepożądanych mikroorganizmów i stworzy podstawy do szerszego stosowania drożdży killerowych i ich toksyn.

Piśmiennictwo

- Allen A., Islamovic E., Kaur J., Gold S., Shah D., Smith T.J.: Transgenic maize plants expressing the Totivirus antifungal protein, KP4, are highly resistant to corn smut. *Plant Biotechnol. J.* 9, 857–864 (2011)

2. Alonso A., Belda I., Santos A., Navascués E., Marquina D.: Advances in the control of the spoilage caused by *Zygosaccharomyces* species on sweet wines and concentrated grape must. *Food Control*, **51**, 129–134 (2015)
3. Aloui H., Licciardello F., Khwaldia K., Hamdi M., Restuccia C.: Physical properties and antifungal activity of bioactive films containing *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast and their application for preservation of oranges and control of postharvest green mold caused by *Penicillium digitatum*. *Int. J. Food Microbiol.* **200**, 22–30 (2015)
4. Bajaj B.K., Raina S., Singh S.: Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. *J. Basic Microbiol.* **53**, 645–656 (2013)
5. Banjara N., Nickerson K.W., Suhr M.J., Hallen-Adams H.E.: Killer toxin from several food-derived *Debaryomyces hansenii* strains effective against pathogenic *Candida* yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* **222**, 23–29 (2016)
6. Bartunek M., Jelinek O., Vondrejs V.: Susceptibility of individual cells of *Saccharomyces cerevisiae* to the killer toxin K1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**, 526–530 (2001)
7. Becker B., Schmitt M.J.: Yeast killer toxin K28: biology and unique strategy of host cell intoxication and killing. *Toxins*, **9**, 333 (2017)
8. Belda I., Ruiz J., Alonso A., Marquina D., Santos A.: The biology of *Pichia membranifaciens* killer toxins. *Toxins*, **9**, 112 (2017)
9. Bevan E.A., Makower M.: The physiological basis of the killer character in yeast. *Proceeding of the XIth International Conference on Genetics*, 1, 202–203 (1963)
10. Błaszczuk U., Satora P., Sroka P., Duliński R.: Effect of *Wickerhamomyces anomalus* and *Pichia membranifaciens* killer toxins on fermentation and chemical composition of apple wines produced from high-sugar juices. *J. Food Nutr. Res.* **56**, 189–199 (2017)
11. Breinig F., Tipper D.J., Schmitt M.J.: Kre1p, the plasma membrane receptor for the yeast K1 viral toxin. *Cell*, **108**, 395–405 (2002)
12. Buzdar M.A., Chi Z., Wang Q., Hua M.X., Chi Z.M.: Production, purification and characterization of a novel killer toxin from *Kluyveromyces siamensis* against a pathogenic yeast in crab. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**, 1571–1579 (2011)
13. Buzzini P., Corazzi L., Turchetti B., Buratta, Martini A.: Characterization of the *in vitro* antimycotic activity of a novel killer protein from *Williopsis saturnus* DBVPG 4561 against emerging pathogenic yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* **238**, 359–365 (2004)
14. Buzzini P., Martini A.: Discrimination between *Candida albicans* and other pathogenic species of the genus *Candida* by their differential sensitivities to toxins of a panel of killer yeasts. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3362–3364 (2001)
15. Cappelli A., Ulissi U., Valzano M., Damiani C., Epis S., Gabrielli M.G., Conti S., Polonelli L., Bandi C., Favia G., Ricci I.: A *Wickerhamomyces anomalus* killer strain in the malaria vector *Anopheles stephensi*. *PLoS One*, **9**, e95988 (2014)
16. Cenci E., Romani L., i wsp.: Protection of killer antiidiotypic antibodies against early invasive aspergillosis in a murine model of allogeneic T-cell-depleted bone marrow transplantation. *Infect. Immun.* **70**, 2375–2382 (2002)
17. Ciani M., Fatichenti F.: Killer toxin of *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 as a biopreservative agent to control apiculate wine yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3058–3063 (2001)
18. Coda R., Cassone A., Rizzello C.G., Nionelli L., Cardinali G., Gobetti M.: Antifungal activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during sourdough fermentation: Identification of novel compounds and long-term effect during storage of wheat bread. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 3484–3492 (2011)
19. Comitini F., Ciani M.: *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxin: purification and activity towards *Brettanomyces/Dekkera* yeasts in grape must. *FEMS Microbiol. Lett.* **316**, 77–82 (2011)
20. Comitini F., De Ingeniis J., Pepe L., Mannazzu I., Ciani M.: *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* **238**, 235–240 (2004)
21. Comitini F., Di Pietro N., Zacchi L., Mannazzu I., Ciani M.: *Kluyveromyces phaffii* killer toxin active against wine spoilage yeasts: purification and characterization. *Microbiology*, **150**, 2535–2541 (2004)
22. Comitini F., Mannazzu I., Ciani M.: *Tetrapisispora phaffii* killer toxin is a highly specific β -glucanase that disrupts the integrity of the yeast cell wall. *Microb. Cell Fact.* **8**, 55–66 (2009)
23. Conti S., Fanti F., Magliani W., Gerloni M., Bertolotti D., Salati A., Cassone A., Polonelli L.: Mycobactericidal activity of human natural, monoclonal, and recombinant yeast killer toxin-like antibodies. *J. Infect. Dis.* **177**, 807–811 (1998)
24. Conti S., Magliani W., Arseni S., Dieci E., Frazzi R., Salati A., Varaldo P.E., Polonelli L.: *In vitro* activity of monoclonal and recombinant yeast killer toxin-like antibodies against antibiotic-resistant gram-positive cocci. *Mol. Med.* **6**, 613–619 (2000)
25. Conti S., Magliani W., Arseni S., Frazzi R., Salati A., Ravanetti L., Polonelli L.: Inhibition by yeast killer toxin-like antibodies of oral *Streptococci* adhesion to tooth surfaces in an *ex vivo* model. *Mol. Med.* **8**, 313–317 (2002)
26. da Silva S., Calado S., Lucas C., Aguiar C.: Unusual properties of the halotolerant yeast *Candida nodaensis* killer toxin, CnKT. *Microbiol. Res.* **163**, 243–51 (2008)
27. Fiori P.L., Mattana A., Dessi D., Conti S., Maglaini W., Polonelli L.: *In vitro* acanthamoebicidal activity of a killer monoclonal antibody and a synthetic peptide. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 891–898 (2006)
28. Gage M.J., Rane S.G., Hockerman G.H., Smith T.J.: The virally encoded fungal toxin KP4 specifically blocks L-type voltage-gated calcium channels. *Mol. Pharmacol.* **61**, 936–944 (2002)
29. Gier S., Schmitt M.J., Breinig F.: Expression of K1 toxin derivatives in *Saccharomyces cerevisiae* mimics treatment with exogenous toxin and provides a useful tool for elucidating K1 mechanisms of action and immunity. *Toxins*, **9**, 345 (2017)
30. Giovati L., Santinoli C., Ferrari E., Ciociola T., Martin E., Bandi C., Ricci I., Epis S., Conti S.: Candidacidal activity of a novel killer toxin from *Wickerhamomyces anomalus* against fluconazole-susceptible and -resistant strains. *Toxins*, **10**, 68 (2018)
31. Grzegorzczak M., Źarowska B., Restuccia C., Cirvilleri G.: Postharvest biocontrol ability of killer yeasts against *Monilinia fructigena* and *Monilinia fructicola* on stone fruit. *Food Microbiol.* **61**, 93–101 (2017)
32. Guo F.J., Ma Y., Xu H.M., Wang X.H., Chi Z.M.: A novel killer toxin produced by the marine-derived yeast *Wickerhamomyces anomalus* YF07b. *Antonie van Leeuwenhoek*, **103**, 737–746 (2013)
33. Guyard C., Dehecq E., Tissier J.P., Polonelli L., Dei-Cas E., Cailliez J.C., Menozzi F.D.: Involvement of β -glucans in the wide-spectrum antimicrobial activity of *Williopsis saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 killer toxin. *Mol. Med.* **8**, 686–694 (2002)
34. Hu R.Y., Lee C.F., Chou H.C.: *Pseudozyma* spp. and *Barnettomyces* spp. effectively kill cancer cells *in vitro*. *Genomic Medicine, Biomarkers and Health Sciences*, **4**, 61–64 (2012)
35. Hua M.X., Chi Z., Liu G.L., Buzdar M.A., Chi Z.M.: Production of a novel and cold-active killer toxin by *Mrakia frigida* 2E00797 isolated from sea sediment in Antarctica. *Extremophiles*, **14**, 515–521 (2010)

36. Izgu F., Altinbay D.: Isolation and characterization of the K5-type yeast killer protein and its homology with an α -1,3-glucanase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 685–693 (2004)
37. Izgu D.A., Kepekci R.A., Izgu F.: Inhibition of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* *in vitro* and *in planta* with Panomycocin, a novel α -1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434. *Antonie van Leeuwenhoek* **99**, 85–91 (2011)
38. Jablonowski D., Schaffrath R.: Zymocin, a composite chitinase and tRNase killer toxin from yeast. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 1533–1537 (2007)
39. Jijakli M.H., Lepoivre P.: State of the art and challenges of post-harvest disease management in apples (w) Fruit and vegetable diseases, red. K.G. Mukerji, Kluwer Academic Publishers (2004)
40. Keszthelyi A., Ohkusu M., Takeo L., Pfeiffer I., Litter J., Kucsera J.: Characterization of anticryptococcal effect of the FC-1 toxin produced by *Filobasidium capsuligenum*. *Mycoses*, **49**, 176–183 (2006)
41. Kinal H., Park Ch.M., Berry J.O., Koltin Y., Bruenn J.A.: Processing and secretion of a virally encoded antifungal toxin in transgenic tobacco plants: evidence for a Kex2p pathway in plants. *Plant Cell*, **7**, 677–688 (1995)
42. Klassen R., Meinhardt F.: Induction of DNA damage and apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae* by a yeast killer toxin. *Cell. Microbiol.* **7**, 393–401 (2005)
43. Kordowska-Wiater M.: Drożdże jako czynniki ochrony biologicznej roślin. *Post. Mikrobiol.* **50**, 107–119 (2011)
44. Labbani F.Z.K., Turchetti B., Bennamoun L., Dakhmouche S., Roberti R., Corazzi L., Meraihi Z., Buzzini P.: A novel killer protein from *Pichia kluyveri* isolated from an Algerian soil: purification and characterization of its *in vitro* activity against food and beverage spoilage yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, **107**, 961–970 (2015)
45. Lima J.R., Gondim D.M.F., Oliveira J.T.A., Oliveira F.S.A., Gonçalves L.R.B., Viana F.M.P.: Use of killer yeast in the management of postharvest papaya anthracnose. *Postharvest Biol. Technol.* **83**, 58–64 (2013)
46. Liu G.L., Chi Z., Wang G.Y., Wang Z.P., Li Y., Chi Z.M.: Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **35**, 222–234 (2015)
47. Liu G.L., Wang K., Hua M.X., Buzdar M.A., Chi Z.M.: Purification and characterization of the cold-active killer toxin from the psychrotolerant yeast *Mrakia frigida* isolated from sea sediments in Antarctica. *Proc. Biochem.* **47**, 822–827 (2012)
48. Llorente P., Marquina D., Santos A., Peinado J.M., Spencer-Martins I.: Effect of salt on the killer phenotype of yeasts from olive brines. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1165–1167 (1997)
49. Lowes K., Shearman C., Payne J., MacKenzie D., Archer D., Merry R., Gasson M.: Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocin HMK. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1066–1076 (2000)
50. Lu J., Huang B., Esberg A., Johansson M.J.O., Byström A.S.: The *Kluyveromyces lactis* γ -toxin targets tRNA anticodons. *RNA*, **11**, 1648–1654 (2005)
51. Magliani W., Conti S., Gerloni M., Bertolotti D., Polonelli L.: Yeast killer systems. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 369–400 (1997)
52. Magliani W., Conti S., Travassos L.R., Polonelli L.: From yeast killer toxins to antibiodies and beyond. *FEMS Microbiol. Lett.* **288**, 1–8 (2008)
53. Malinowska M., Tokarz-Deptuła B., Deptuła W.: Mikrobiom człowieka. *Post. Mikrobiol.* **56**, 33–42 (2017)
54. Manfredi M., McCullough M.J., Conti S., Polonelli L., Vescovi P., AlKaraawi Z.M., Porter S.R.: *In vitro* activity of a monoclonal killer anti-idiotypic antibody and a synthetic killer peptide against oral isolates of *Candida* spp. differently susceptible to conventional antifungals. *Oral Microbiol. Immunol.* **20**, 226–232 (2005)
55. Marquina D., Santos A., Peinado J.M.: Biology of killer yeasts. *Int. Microbiol.* **5**, 65–71 (2002)
56. Mehlomakulu N.N., Prior K.J., Setati M.E., Divol B.: *Candida pyralidae* killer toxin disrupts the cell wall of *Brettanomyces bruxellensis* in red grape juice. *J. Appl. Microbiol.* **122**, 747–758 (2017)
57. Mehlomakulu N.N., Setati M.E., Divol B.: Characterization of novel killer toxins secreted by wine-related non-*Saccharomyces* yeasts and their action on *Brettanomyces* spp. *Int. J. Food Microbiol.* **188**, 83–91 (2014)
58. Muccilli S., Restuccia C.: Bioprotective role of yeasts. *Microorganisms*, **3**, 588–611 (2015)
59. Park C.M., Berry J.O., Bruenn J.A.: High-level secretion of a virally encoded anti-fungal toxin in transgenic tobacco plants. *Plant. Mol. Biol.* **30**, 359–366 (1996)
60. Perez M.F., Contreras L., Garnica N.M., Fernández-Zenoff M.V., Fariás M.E., Sepulveda M., Ramallo J., Dib J.R.: Native killer yeasts as biocontrol agents of postharvest fungal diseases in lemons. *PLoS ONE*, **11**, e0165590 (2016)
61. Pintar J., Starmer W.T.: The costs and benefits of killer toxin production by the yeast *Pichia kluyveri*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **83**, 89–98 (2003)
62. Platania C., Restuccia C., Muccilli S., Cirvilleri G.: Efficacy of killer yeasts in the biological control of *Penicillium digitatum* on Tarocco orange fruits (*Citrus sinensis*). *Food Microbiol.* **30**, 219–225 (2012)
63. Polonelli L., De Bernardis F., Conti S., Boccanera M., Gerloni M., Morace G., Magliani W., Chezzi C., Cassone A.: Idiotypic intravaginal vaccination to protect against candidal vaginitis by secretory, yeast killer toxin-like anti-idiotypic antibodies. *J. Immunol.* **152**, 3175–3182 (1994)
64. Provost F., Polonelli L., Conti S., Fiscaro P., Gerloni M., Boiron P.: Use of yeast killer system to identify species of the *Noctuidia asteroides* complex. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 8–10 (1995)
65. Ramírez M., Velázquez R., López-Piñero A., Naranjo B., Roig F., Llorens C.: New insights into the genome organization of yeast killer viruses based on “atypical” killer strains characterized by high-throughput sequencing. *Toxins*, **9**, 292 (2017)
66. Ramírez M., Velázquez R., Maqueda M., López-Piñero A., Ribas J.C.: A new wine *Torulaspota delbrueckii* killer strain with broad antifungal activity and its toxin-encoding double-stranded RNA virus. *Front. Microbiol.* **6**, 983 (2015)
67. Reiter J., Herker E., Madeo F., Schmitt M.J.: Viral killer toxins induce caspase-mediated apoptosis in yeasts. *J. Cell Biol.* **168**, 353–358 (2005)
68. Rodríguez-Cousiño N., Maqueda M., Ambrona J., Zamora E., Esteban R., Ramirez M.: A new wine *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin (Klus), encoded by a double-stranded RNA virus, with broad antifungal activity is evolutionarily related to a chromosomal host gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 1822–1832 (2011)
69. Rogalski P.: Kandydoza przewodu pokarmowego – fakty i mity. *Gastroenterologia kliniczna*, **2**, 87–97 (2010)
70. Santos A., Alonso A., Belda I., Marquina D.: Cell cycle arrest and apoptosis, two alternative mechanisms for PMKT2 killer activity. *Fungal Genet. Biol.* **50**, 44–54 (2013)
71. Santos A., del Mar Álvarez M., Mauro M.S., Abrusci C., Marquina D.: The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to *Pichia membranifaciens* killer toxin. *J. Biol. Chem.* **280**, 41881–41892 (2005)
72. Santos A., Marquina D., Leal J.A., Peinado J.M.: (1-6)- β -D-glucanase cell wall receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1809–1813 (2000)
73. Santos A., Marquina D.: Ion channel activity by *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Yeast*, **21**, 151–162 (2004)

74. Santos A., Marquina D.: Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. *Microbiology*, **150**, 2527–2534 (2004)
75. Santos A., Mauro M.S., Abrusci C., Marquina D.: Cwp2p, the plasma membrane receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Mol. Microbiol.* **64**, 831–843 (2004)
76. Santos A., San Mauro M., Bravo E., Marquina D.: PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens* and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiology*, **155**, 624–634 (2009)
77. Santos A., Sánchez A., Marquina D.: Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. *Microbiol. Res.* **159**, 331–338 (2004)
78. Satora P., Tarko T., Sroka P., Blaszczyk U.: The influence of *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast on the fermentation and chemical composition of apple wines. *FEMS Yeast Res.* **14**, 729–740 (2014)
79. Savoia D., Avanzini C., Conti S., Magliani V., Frazzi R., Polonelli L.: *In vitro* leishmanicidal activity of a monoclonal antibody mimicking a yeast killer toxin. *J. Eukaryot. Microbiol.* **49**, 319–323 (2002)
80. Schmitt M.J., Breinig F.: The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 257–276 (2002)
81. Schmitt M.J., Breinig F.: Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 212–221 (2006)
82. Schmitt M.J., Reiter J.: Viral induced yeast apoptosis. *Biochem. Biophys. Acta*, **1783**, 1413–1417 (2008)
83. Séguy N., Polonelli L., Dei-Cas E., Cailliez J.C.: Effect of a killer toxin of *Pichia anomala* to *Pneumocystis*. Perspectives in the control of pneumocystosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **22**, 145–149 (1998)
84. Séguy N., Polonelli L., Dei-Cas E., Cailliez J.C.: Monoclonal killer toxin-like antiidiotypic antibodies to control rat-pneumocystosis. *J. Eukaryot. Microbiol.* **44**, 37S (1997)
85. Spadaro D., Droby S.: Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends Food Sci. Technol.* **47**, 39–49 (2016)
86. Sun H.Y., Wang K., Chi Z., Xu H.M., Chi Z.M.: Simultaneous production of single cell protein and killer toxin by *Wickerhamomyces anomalus* HN1–2 isolated from mangrove ecosystem. *Proc. Biochem.* **47**, 251–256 (2012)
87. Suzuki C., Nikkuni S.: The primary and subunit structure of a novel type killer toxin produced by a halotolerant yeast *Pichia farinosa*. *J. Biol. Chem.* **269**, 3041–3046 (1994)
88. Takasuka T., Komiyama T., Furuichi Y., Watanabe T.: Cell wall synthesis specific cytotoxic effect of *Hansenula mrakii* toxin-1 on *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol. Biol. Res.* **41**, 575–581 (1995)
89. Valzano M., Ricci I., i wsp.: A yeast strain associated to *Anopheles* mosquitoes produces a toxin able to kill malaria parasites. *Malar. J.* **15**, 21–30 (2016)
90. Velázquez R., Zamora E., Álvarez M.L., Hernández L.M., Ramírez M.: Effects of new *Torulaspora delbrueckii* killer yeasts on the must fermentation kinetics and aroma compounds of white table wine. *Front. Microbiol.* **3**, 1222 (2015)
91. Villalba M.L., Sáez J.S., del Monaco S., Lopes C.A., Sangorrín M.P.: TdKT, a new killer toxin produced by *Torulaspora delbrueckii* effective against wine spoilage yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* **217**, 94–100 (2016)
92. Walker G.M., McLeod A.H., Hodgson V.J.: Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* **127**, 213–222 (1995)
93. Wang L., Yue L., Chi Z., Wang X.: Marine killer yeasts active against a yeast strain pathogenic to crab *Portunus trituberculatus*. *Dis. Aquat. Organ.* **80**, 211–218 (2008)
94. Wang X., Chi Z., Yue L., Li J., Li M., Wu L.: A marine killer yeast against the pathogenic yeast strain in crab (*Portunus trituberculatus*) and an optimization of the toxin production. *Microbiol. Res.* **162**, 77–85 (2007)
95. Wang X.H., Chi Z.M., Yue L., Li J.: Purification and characterization of killer toxin from a marine yeast *Pichia anomala* YF07b against the pathogenic yeast in crab. *Curr. Microbiol.* **55**, 396–401 (2007)
96. Wang X.X., Chi Z., Peng Y., Wang X.H., Ru S.G., Chi Z.M.: Purification, characterization and gene cloning of the killer toxin produced by the marine-derived yeast *Williopsis saturnus* WC91–2. *Microbiol. Res.* **167**, 558–563 (2012)
97. Weiler F., Schmitt M.J.: Zygocin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*, and its effect on sensitive fungal cells. *FEMS Yeast Res.* **3**, 69–76 (2003)
98. Żarowska B.: Biosynteza i charakterystyka toksyn killerowych drożdży *Debaryomyces hansenii*. Wrocław, UWP (2012)

ENTOMOPATOGENICZNE GRZYBY I ICH ZNACZENIE BIOCENOTYCZNE

Beata Zimowska*, Ewa Dorota Król

Katedra Ochrony Roślin, Zakład Fitopatologii i Mykologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Wpłynęło w czerwcu, zaakceptowano w sierpniu 2019 r.

Streszczenie: Naturalnie występujące entomopatogeny są ważnymi czynnikami regulacyjnymi populacji owadów. Wśród nich ważną rolę odgrywają grzyby entomopatogeniczne. Zakażenie owadów przez pasożytnicze grzyby następuje poprzez penetrację powłok żywiciela. Śmierć gospodarza jest wynikiem zniszczenia tkanek, wyczerpania składników odżywczych oraz produkcji toksyn. Najnowsze badania pokazują, że grzyby owadobójcze to nie tylko patogeny owadów, ale odgrywają również dodatkowe role w ekosystemach jako endofity, gatunki antagonistyczne oraz wspomagające wzrost roślin i kolonizację ryzosfery. Te nowo poznane mechanizmy oddziaływania stwarzają dodatkowe możliwości ich wykorzystania m.in. w integrowanej ochronie roślin. W tym artykule dokonano przeglądu literatury polskiej i światowej dotyczącej grzybów entomopatogenicznych. Przedstawiono również możliwe mechanizmy ochrony roślin wynikające z uzdolnień endofitycznych grzybów entomopatogenicznych i omówiono możliwości ich zastosowania w ochronie przed szkodnikami i patogenami.

Wstęp. 2. Rys historyczny i taksonomiczny. 3. Aspekty ekologiczne. 4. Zastosowanie grzybów entomopatogenicznych. 5. Perspektywy integrowanej ochrony roślin. 6. Podsumowanie

ENTOMOPATHOGENIC FUNGI AND THEIR BIOCENOTIC IMPORTANCE

Abstract: Naturally occurring entomopathogens are important regulatory factors of insect populations. Among them, entomopathogenic fungi play a meaningful role. The invasion of insects by parasitic fungi occurs through penetration of the host integument. Death of the host is a result of tissue destruction, exhaustion of nutrients, and the production of toxins. Many recent studies show that entomopathogenic fungi are not only considered as insect pathogens, but also play additional roles in nature, including endophytism, plant disease antagonism, plant growth promotion, and rhizosphere colonization. These newly understood attributes provide possibilities to use fungi in multiple roles. Such additional roles recently-discovered to be played by entomopathogenic fungi provide opportunities for multiple uses of these fungi in integrated pest management strategies. This article reviews the literature currently available on entomopathogenic fungi. It also addresses the possible mechanisms of protection conferred by endophytic fungal entomopathogens and explores the potential use of these fungi as dual microbial control agents against both insect and pathogen pests.

Introduction. 2. Historical and taxonomical notes. 3. Ecological aspects. 4. Use of entomopathogenic fungi. 5. Prospects in integrated pest management. 6. Conclusions

Słowa kluczowe: entomopatogeniczne grzyby, endofity, integrowana ochrona roślin, mykoinsektycydy

Key words: entomopathogenic fungi, endophytes, integrated pest management, mycoinsecticides

1. Wstęp

Entomopatogeniczne grzyby są prawdopodobnie najbardziej znanymi mikroorganizmami, które infekują szkodniki roślin. Szacuje się, że powodują one około 60% chorób epizootycznych owadów i innych stawonogów. Terminem „grzyby entomopatogeniczne” w najszerszym ujęciu określać można gatunki organizmów wykazujących w swoim rozwoju właściwości chorobotwórcze lub bezpośrednie zależności troficzne o charakterze pasożytniczym względem żywych stawonogów, głównie owadów i roztoczy. Ich rozwój prowadzi do zakłóceń funkcji fizjologicznych u gospodarzy, a w konsekwencji do ich śmierci [10, 76, 91].

Globalizacja rynków i intensyfikacja produkcji w rolnictwie coraz bardziej wskazują na potrzebę opraco-

wania działań łagodzących negatywne skutki dla środowiska i bezpieczeństwa konsumentów. Straty spowodowane przez szkodniki, choroby roślin i chwasty nadal stanowią istotną przeszkodę w zwiększaniu produkcji rolnej, pomimo znacznego wzrostu stosowania pestycydów. Od drugiej wojny światowej stosowanie syntetycznych środków ochrony roślin stanowi podstawowy system kontroli patogenów i pasożytów roślin uprawnych, mimo świadomości skutków ubocznych oraz szkodliwości dla zdrowia ludzkiego i środowiska. W wielu krajach uprzemysłowionych, od pewnego czasu, strategie ochrony roślin zostały ukierunkowane na wykorzystanie roślin transgenicznych, które charakteryzują się odpornością na owady i inne czynniki biotyczne. Działania te zmierzają do ograniczenia stosowania preparatów chemicznych. Całkowite systemowe podejście

* Autor korespondencyjny: Beata Zimowska, Katedra Ochrony Roślin, Zakład Fitopatologii i Mykologii, Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie K. St. Leszczyńskiego 7, 20-068 Lublin; e-mail: beata.zimowska@up.lublin.pl

do zmniejszenia stosowania środków chemicznych w rolnictwie powinno opierać się na lepszym zrozumieniu zależności panujących w różnych ekosystemach i modyfikacji krajobrazu w celu stworzenia odpowiednich warunków dla rozwoju mikroorganizmów pożytecznych w środowisku oraz zachowania bioróżnorodności [77, 92].

Wykorzystanie entomopatogenicznych grzybów mogłoby stanowić podstawową metodę ochrony roślin, opartą na ich uzdolnieniach i różnych rolach jakie mogą odgrywać w przyrodzie. Wiele gatunków spośród grzybów owadobójczych oddziałują endofitycznie i/lub w ryzosferze, zachowuje się jak antagoniści w stosunku do różnych czynników patogenicznych oraz wspomaga wzrost i rozwój roślin. Szersza wiedza na temat oddziaływania grzybów owadobójczych i lepsze zrozumienie interakcji pasożyt-żywiciel-środowisko może ułatwić skuteczniejsze wykorzystanie grzybów w zwalczaniu szkodników. Wiadomo bowiem, że aktywność biologiczna grzybów owadobójczych uzależniona jest m.in. od ich wirulencji, wilgotności powietrza, temperatury, pory roku, obecności antagonistów, dostępności gospodarzy oraz struktury i sposobu użytkowania gleby, w której występują [8, 77, 88, 90, 91].

2. Rys historyczny i taksonomiczny

Pierwsze badania dotyczące grzybów entomopatogenicznych zostały opracowane na początku XIX wieku. Zainspirowany potrzebą kontrolowania epizoozji jedwabników, przyrodnik Agostino Bassi zidentyfikował w 1835 roku czynnik wywołujący chorobę, nazwany później *Beauveria bassiana* [10]. Odkrycie, że grzyb jest również zdolny do infekowania innych owadów [5], zainicjowało stosowanie entomopatogenów do zwalczania szkodników przez innych wybitnych naukowców, takich jak Pasteur [54] i Le Conte [42]. Pod koniec XIX wieku w Rosji Miecznikow przeprowadził badania nad „zieloną muskardyną”, chorobą chrząszczy pszennych (*Anisoplia austriaca*) i zidentyfikował *Entomophthora anisopliae* (*Metarhizium anisopliae*) jako przyczynę tej choroby. Kilka lat później Krassilcznik [41] wyprodukował pierwszy biopreparat zawierający zarodniki *M. anisopliae*, co spowodowało wzrost zainteresowania grzybami owadobójczymi [10]. Patogeny te są najczęściej definiowane jako grzyby, które znajduje się na obumarłych owadach i innych stawonogach. Z tak szerokiego znaczenia wynika, że liczba gatunków rośnie w wyniku licznych badań lub sporadycznych izolacji. Dlatego też, chociaż podjęto próby oszacowania liczby gatunków (około 1000) według St. Leger i Wang [80], trudno jednoznacznie ocenić wielkość tej grupy mikroorganizmów. Sosnowska [77] podaje, że na świecie znanych

jest ponad 1200 gatunków grzybów owadobójczych, z czego w Polsce poznano 230.

Wprowadzenie technik molekularnych do identyfikacji, przede wszystkim sekwencjonowanie DNA, miało znaczący wpływ na klasyfikację grzybów owadobójczych, rzucając światło na związki filogenetyczne między różnymi grupami taksonomicznymi. Umożliwiło to ustalenie, że entomopatogeny nie stanowią oddzielnej grupy, przeciwnie należą do różnych jednostek taksonomicznych. Większość grzybów entomopatogenicznych klasyfikowana jest w 2 rzędach tj. *Entomophthorales* (*Zygomycota*) i *Hypocreales* (*Ascomycota*) [8]. Do pierwszego rzędu należą, takie rodzaje jak: *Entomophthora*, *Entomophaga*, *Erynia*, *Neozygites*, *Pandora* i *Conidiobolus*, które reprezentują głównie grzyby monofagiczne i obligatoryjne patogeny małej liczby stawonogów. Z kolei do *Hypocreales* należą przede wszystkim polifagiczne gatunki grzybów, znane ze swoich zdolności patogenicznych w stosunku do różnych gatunków owadów [10]. Typowy rodzaj *Cordyceps*, obejmuje wiele gatunków znanych z wytwarzania pod koniec cyklu, prowadzonego kosztem larw owadów, charakterystycznych wydłużonych maczug wystających z powierzchni gleby, które są zbierane i stosowane w medycynie tradycyjnej w Chinach i innych krajach azjatyckich [55]. Do *Cordycipitaceae* przypisano również gatunki z rodzaju *Culicinomyces*, zasadniczo związane z larwami komarów [64], natomiast do oddzielnej rodziny (*Ophiocordycipitaceae*) rodzaje *Ophiocordyceps*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Tolypocladium* i *Polycephalomyces* [36] i *Purpureocillium lilacinum* (*Paecilomyces lilacinus*) [46]. Z kolei w obrębie rodziny *Clavicipitaceae* znajduje się rodzaj *Metarhizium*, z gatunkami *M. anisopliae* i inne gatunki stosowane w ochronie biologicznej, takie jak: *M. acridum*, *M. brunneum*, *M. robertsii* i *M. rileyi* (*Nomuraea rileyi*). Do tej samej rodziny należą także rodzaje *Pochonia*, *Metacordyceps*, *Torribiella*, *Regiocrella* i *Hypocrella*, przy czym ten ostatni obejmuje kilka gatunków lepiej znanych w stadium konidialnym (np. *Aschersonia aleyrodis*) [85].

Badania molekularne wykazały także, że inne grzyby entomopatogeniczne są filogenetycznie podobne do gatunków z rodziny *Cordycipitaceae* i dlatego należy je przypisać do tej rodziny. Wśród nich znalazł się rodzaj *Akanthomyces*, do którego niedawno przypisano kilka gatunków z rodzin *Lecanicillium* [37], *Simplicillium*, *Gibellula*, *Beauveria*, z gatunkami *B. bassiana*, *B. brongniartii* i *B. tenella* [61] oraz gatunki *Isaria* tj. *I. farinosa* (*Paecilomyces farinosus*) i *I. fumosorosea* (*P. fumosoroseus*).

Gatunki entomopatogeniczne również występują w rodzajach z typu *Ascomycota*, takich: *Ascospaera* (*Eurotiomycetes*, *Eurotiales*), *Myriangium* (*Dothideomycetes*, *Myriangiales*) [15], *Podonectria* (*Dothideomycetes*, *Tubeufiales*) [65] oraz *Sporothrix* (*Sordariomycetes*,

Ophiostomatales), które ostatnio nabrały większego znaczenia [14]. Do gatunków o mniejszych właściwościach entomopatogenicznych należą: *Aspergillus flavus* [32], *Clonostachys rosea* oraz gatunki należące do rodzajów: *Fusarium* [84], *Acremonium* [81], *Cladosporium* [1] i *Alternaria* [34] oraz kilka innych gatunków z rodzaju *Aspergillus* i *Penicillium* [12].

3. Aspekty ekologiczne

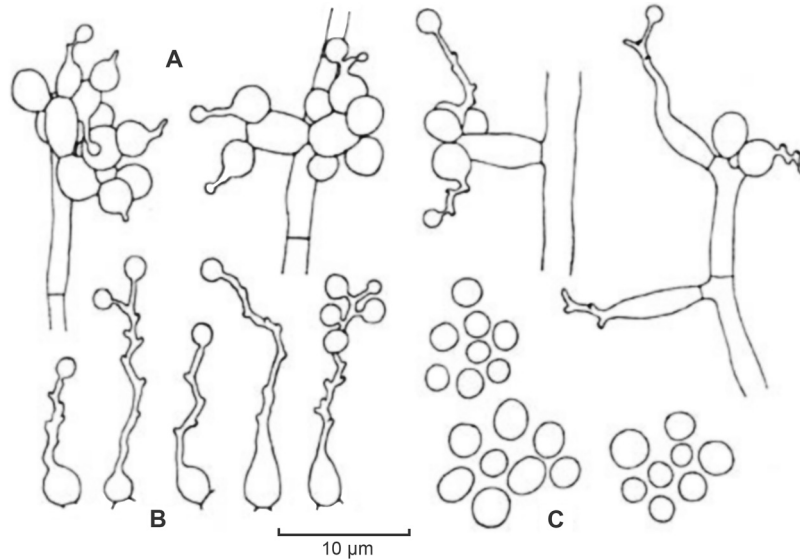
Cykl rozwojowy patogenów z typów *Zygomycota* i *Ascomycota* jest zróżnicowany, ale warunkiem ich przetrwania i rozprzestrzeniania jest zakażenie i uśmiercenie żywiciela. Entomopatogeniczne grzyby infekują swoich gospodarzy za pomocą zarodników, które rozprzestrzeniają się w otaczającym środowisku, tak powszechnie, że ich obecność została również udokumentowana na powłokach pozornie zdrowych osobników [21]. Infekcja jest skuteczna przy odpowiedniej temperaturze i wilgotności powietrza oraz w momencie bezpośredniego kontaktu zarodnika grzyba z ciałem żywiciela. Zarodniki grzybów z typu *Ascomycota* przenoszone są z wiatrem, a kiełkują tworząc struktury adhezyjne w postaci przysawek. Następnie strzępki infekcyjne przenikają przez otwory ciała lub egzozskielec, przy udziale enzymów degradujących naskórek [11]. Po osiągnięciu hemocelu grzyb pokonuje obronę immunologiczną gospodarza, używając broni biochemicznej [88, 89]. Późniejsza kolonizacja tkanek zachodzi w różny sposób w zależności od rodzaju interakcji. Można wyróżnić trzy typy interakcji: biotrofię, w której grzyb odżywia się żywymi komórkami; nekrotrofię, w której grzyb zasadniczo wykorzystuje martwe tkanki i nieco bardziej powszechną hemibiotrofię, gdy grzyb początkowo pasożytuje na żywych tkankach, a następnie korzysta z martwych tkanek. Po śmierci gospodarza grzyb tworzy na zewnątrz oznaki etiologiczne w postaci zarodników, które często pozostają przymocowane do podłoża przez ryzoidy wyłaniające się z powierzchni brzusznej lub z aparatu policzkowego. W wielu przypadkach udokumentowano produkcję i rozproszenie zarodników z ciała wciąż żywych owadów [67].

Do najważniejszych przedstawicieli grzybów owadobójczych z typu *Ascomycota* należą gatunki z rodzajów: *Beauveria*, *Isaria*, *Metarhizium* oraz *Lecanicillium*. Rodzaj *Beauveria* charakteryzuje się białą lub jasno zabarwioną grzybnią z odcieniem żółtym lub lekko różowym, o obficie rozwiniętych strzępkach substratowych i powietrznych. Konidiofory z pojedynczymi fialidami lub skupieniami fialid o kilkakrotnie wygiętej szyjce, na przecięciach której powstają jednokomórkowe, hialitowe, owalne lub elipsoidalne konidia. Gatunki w obrębie rodzaju różnią się głównie wielkością i kształtem konidiów [13, 16, 98].

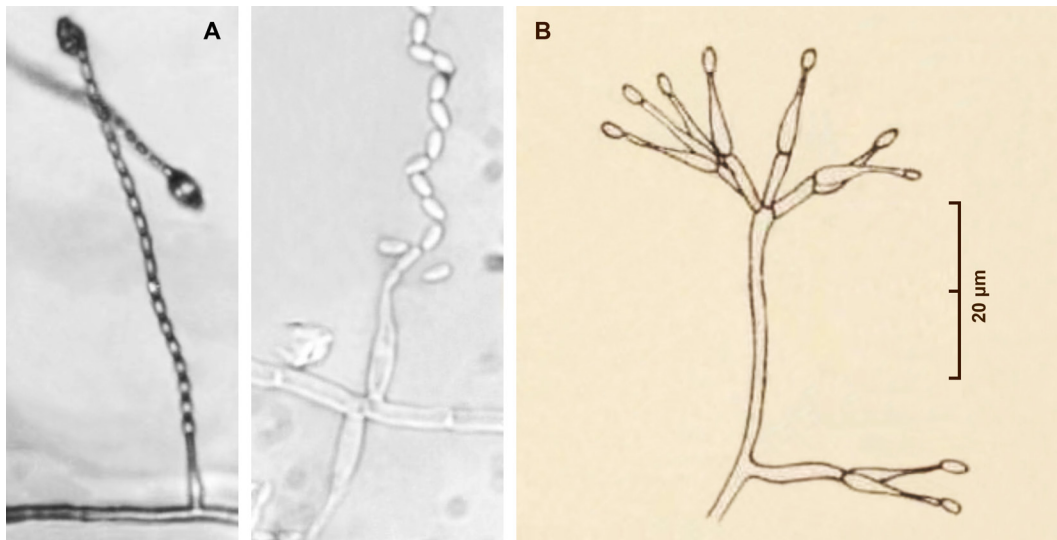
Jednym z najczęściej opisywanych gatunków jest *B. bassiana*. Kolonie tego gatunku osiągają średnicę 6–23 mm po 8 dniach hodowli na podłożach agarowych. Grzybnia tworzy murawkę wełnistą, białą, do 2 mm wysokości. W czasie zarodnikowania jest ona proszkowata do wapnowanej, biała lub kremowa. Dolna strona kolonii bezbarwna. Niektóre szczepy tworzą kolonie kłaczkowe lub o strukturze waty ze strzępkami grzybni o wysokości do 1 cm. Na strzępkach powietrznych powstają pojedynczo lub w rzadkich okółkach komórki konidiotwórcze (fialidy), które mogą także tworzyć kuliste skupienia lub pęczki. Fialidy są szeroko butelkowate lub mają postać wydłużonych rozgałęzień, zwężonych u szczytu w cienką szyjkę, na której tworzą się pierwsze konidia. Następne konidium wyrasta ukośnie z szyjki tuż przed pierwszym konidium, które jest przez nie odsuwane na bok. Po kilkakrotnie powtórzonym procesie na końcu fialidy powstaje zygzakowato wygięta szyjka z najstarszym konidium na szczycie. Konidia odpadają łatwo, natomiast zygzakowata szyjka pozostaje niezmieniona. Czasami fialidy tworzą się w dwóch warstwach nad sobą (pierwotne i wtórne), wówczas ich wielkość, a głównie długość znacznie się zwiększa. Pierwsze, kuliste mają wymiary 1,5–3,5 μm , a wtórne, walcowate 4–14 \times 2–3 μm . Konidia są gładkie, hialitowe, o średnicy 2–3 μm (ryc. 1). *B. bassiana* tworzy charakterystyczny biały nalot zarodników na powierzchni martwych owadów zwany białą muskardyną.

Grzyby z rodzaju *Isaria* (dawniej *Paecilomyces* spp.) tworzą kolonie wełniste, prószyste, czasami nieco sznurowate. U gatunków pasożytujących na owadach formują się wyraźne koreamie tj. mniej lub bardziej zwarte pęczki trzonków konidialnych, w górnej części rozpięchłych i zakończonych zarodnikami konidialnymi. Grzybnia biała, żółta, żółtobrunatna, fioletowa, czasami jasnozielona. Konidia powstają na fialidach pojedynczych lub znajdujących się w okółkach na pędzelnikowatym konidioforze, czym przypominają gatunki rodzaju *Penicillium*. Konidia powstają w łańcuchach. Niektóre gatunki tworzą zarodniki przetrwalnikowe – chlamidospory. Do przedstawicieli tego rodzaju należy m.in. *Isaria farinosa* (syn. *Paecilomyces farinosus*). Kolonie tego grzyba tworzą obfitą i wysoką grzybnię, wełnistą lub watowatą. Starsza kultura żółknie lub tworzy białe, żółte lub pomarańczowe, długie do 1 cm i wąskie koreamie. Rewers kolonii początkowo bezbarwny, potem żółknie lub staje się pomarańczowy. Konidiofory mają postać albo pojedynczych fialid o wymiarach 5–15 \times 0,8–2 μm , albo pojedynczych lub złożonych okółków. Konidia gładkie, elipsoidalne, o wymiarach 2 \times 3 \times 1–1,8 μm , tworzą się w długich łańcuchach [13, 16, 98] (ryc. 2). *Isaria* wywołuje różową muskardynę.

Gatunek *Metarhizium anisopliae* tworzy początkowo białe kolonie z żółtawym odcieniem, które podczas



Ryc. 1. *Beauveria bassiana*, trzonki konidialne A, komórki konidiotwórcze B, konidia C. Według De Hong 1972 [13].



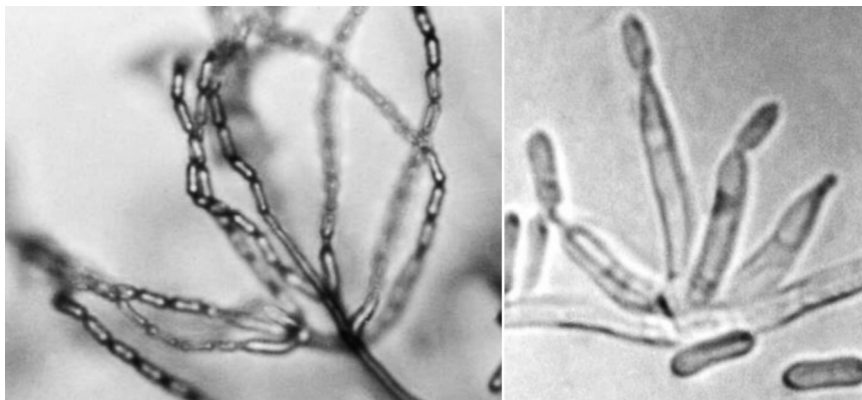
Ryc. 2. *Isaria farinosa*, fialidy i zarodniki konidialne w łańcuchach. A. Według Watanabe 2010 [98], konidiofor B. Według Fassatiowa 1983 [16].

zarodnikowania przybierają zielonkawe zabarwienie. Konidiofory o długości 40–80 µm, często powstają w skupieniach tworząc sporodochia. Fialidy pojedyncze lub skupione, na wierzchołku zaokrąglone. Fialidy o wymiarach 9,7–35,3 × 2,1–2,7 µm. Konidia powstają w długich łańcuchach, są bezbarwne, cylindryczne, 1-komórkowe o wymiarach 3,7–10 × 0,7–1,7 µm [98], (ryc. 3). *M. anisopliae* tworzący zieloną muskardynę.

Z kolei gatunki rodzaju *Lecanicillium* (syn. *Verticillium*) tworzą murawki białe lub jasne, przeważnie z obfitymi strzępkami powietrznymi, często także ze strzępkami substratowymi. Konidiofory proste, rozgałęzione okółkowo, pojedyncze odgałęzienia i fialidy są od siebie odległe. Konidia jednokomórkowe, głównie elipsoidalne lub o owalnym kształcie, pozostające jakiś czas

na szczycie fialidy połączone śluzem w rodzaj główki. Najczęściej opisywanym entomopatogenem jest *Lecanicillium lecanii* (syn. *Verticillium lecanii*). Kolonie tego grzyba mają barwę białą lub nieco żółtawą, o strukturze waty lub aksamitną, od dołu żółtawą. Na strzępkach formują się silnie wydłużone i ostre fialidy o wymiarach 11,2–30 × 1,7–2,5 µm. Tworzą się one pojedynczo lub w rzadkich okółkach. Na zakończeniu fiali grupują się konidia tworząc skupienia w kształcie główki o średnicy 5–15 µm. Konidia są hialitowe, wydłużone owalnie o wymiarach 3,7–5,5 × 1,8–2,9 µm (ryc. 4).

Grzyby owadomorkowe z typu *Zygomycota* wytwarzają 2 typy zarodników konidialnych tzw. konidia pierwotne i wtórne. Oba rodzaje zarodników odrzucane są aktywnie dzięki rosnącemu ciśnieniu osmotycznemu



Ryc. 3. Konidiofory i konidia *Metarhizium anisopliae*, Według Watanabe 2010 [98].



Ryc. 4. Konidiofory i konidia *V. lecanii* A. Według Watanabe 2010 [98], B. Według Fassatiou 1983 [16].

w zarodniku i komórce zarodnikotwórczej. Grzyby te mogą także wytwarzać zarodniki przetrwalnikowe, co pozwala im przetrwać niekorzystne warunki lub brak żywiciela. Dzięki temu synchronizują swój rozwój z rozwojem owadów [23].

Grzyby entomopatogeniczne wykazują różnorodne rzystosowania do pasożytowania na owadach, uwzględniając nie tylko zdolność do przewyciężenia obrony immunologicznej i uzyskania pożywienia, ale także do mniej zbadanych reakcji behawioralnych. Wykazano, że niektóre grzyby zmieniają zachowanie zarażonych owadów, na przykład poprzez stymulowanie ich do wspinania się na szczyt roślin, co ma ułatwiać rozproszenie zarodników. Pod tym względem więcej badań przeprowadzono dla zakażeń wywołanych przez grzyby z rzędu *Entomophthorales* niż przez gatunki z *Hypocreales* [66]. Przykładem obrazującym w jaki sposób entomopatogeny wpływają na behawior owadów jest *Ophiocordyceps unilateralis*. Grzyb ten powoduje, że zarażone mrówki wspinają się na rośliny i umierając zaciskają szczęki, mocując jednocześnie ciało w położeniu ułatwiającym uwalnianie zarodników [3]. W wielu przypadkach większa ekspozycja na zarodniki grzybów entomopatogennych wynika z naturalnego zachowania owada. Na przykład dojrzałe larwy *Lymantria* mają tendencję do koncentracji w dolnej części roślin lub na ziemi, gdzie kontakt z *Entomophaga maimaiga* jest najbardziej prawdopodobny [23]. Mogą występować również odwrotne sytuacje. Na przykład mszyca gro-

chowa wykazuje tendencję do oddalania się od kolonii, gdy jest zakażona *Pandora neoaphidis*. Takie zachowanie może stanowić zarówno korzyść dla kolonii mszyc, zmniejszając do pewnego stopnia postęp epizoocji, jak i dla grzyba, którego zarodniki zostaną uwolnione na większą odległość, tworząc potencjał dla lepszego rozprzestrzeniania [28].

Jednocześnie różne gatunki owadów wykształciły szereg przystosowań w celu skutecznej obrony przed entomopatogenami. Postawę behawioralną mającą na celu unikanie pewnych entomopatogenów udokumentowano m.in. u dziubałka gajowego [48] i biedronki siedmiokropki [50], które unikają zakażenia przez *B. assiana*, podczas gdy australijski termity *Coptotermes lacteus* ma tendencję do ucieczki przed *M. anisopliae* [81]. Udowodniono także, że owady w obronie przed zakażeniem mogą wytwarzać różne związki chemiczne na powierzchni oskórka, które hamują kiełkowanie zarodników [7]. Chociaż specyficzny mechanizm leżący u podstaw tego zachowania nie jest znany, te i inne dowody wskazują na zdolność niektórych owadów do rozpoznawania patogenicznych grzybów.

W rzeczywistości zależności ekologiczne grzybów entomopatogenicznych wykraczają daleko poza interakcje z owadami i dotyczą także roślin. W glebie są szeroko rozpowszechnione w ryzosferze, posiadając specyficzną zdolność do współistnienia w tym środowisku z wieloma innymi mikroorganizmami, które w kategoriach naukowych definiuje się jako

„kompetencje” [79]. Podkreśla to zatem, jak wiele entomopatogenów jest w stanie przetrwać w bliskim kontakcie z roślinami, zapewniając im korzyść w przypadku jakiegokolwiek ataku szkodników. Powiązanie to staje się jeszcze bardziej istotne, jeśli weźmiemy pod uwagę, że wiele entomopatogennych grzybów występujących w ryzosferze posiada zdolność do kolonizacji roślin endofitycznie, co dodatkowo zwiększa ich potencjał ochronny. Oczywiście zakres, w jakim zjawisko to nabiera znaczenia, zależy od wpływu wielu czynników biotycznych i abiotycznych. Na uwagę zasługuje również zdolność przenoszenia pionowego (tj. przez nasiona), co zostało udowodnione w przypadku *B. bassiana* na sośnie kalifornijskiej [43], sugeruje to jeszcze bardziej specyficzną adaptację, przynajmniej w przypadku niektórych gatunków roślin.

Pierwsze doniesienia na temat endofitycznego występowania grzybów entomopatogenicznych pojawiały się sporadycznie, jednak wkrótce informacje o endofitycznym zasiedlaniu różnych gatunków roślin przez te mikroorganizmy stało się coraz bardziej powszechne [103]. W Stanach Zjednoczonych endofityczne szczepy *B. bassiana* zidentyfikowano na roślinach kawy arabskiej [56], pomidorze zwyczajnym [52], kakaowcu właściwym [57] oraz kukurydzy zwyczajnej [68]. W Kolumbii *M. anisopliae* endofitycznie zasiedlał rośliny manioku jadalnego [37] oraz fasoli zwyczajnej [52], a w Niemczech bobu [2]. Powyższe fakty spowodowały, że to co przez długi czas uznawano za coś więcej niż pojedyncze zjawisko ekologiczne, przekształciło się w prawdziwą strategię kontroli biologicznej. Wydaje się zatem, że możliwe jest zapewnienie trwałej ochrony roślin poprzez traktowanie ich w czasie siewu lub uprawy szczepami endofitycznymi zdolnymi do rozwoju w tkankach roślin i działającymi jak naturalna broń w miejscach ataku fitofagów [59].

Ochronne właściwości szczepów endofitycznych przed różnymi czynnikami fitopatogenicznymi mogą przejawiać się w różny sposób. Przykładem może być kilka gatunków z rodzaju *Akanthomyces* (*Lecanicillium*), aktywnych jednocześnie przeciwko mszycom i mączniakowi [40] lub *L. lecanii*, który oprócz owadów może ograniczać rozwój grzyba rdzawnikowego (*Hemileia vastatrix*) [95]. Aktywność *I. fumosorosea* stwierdzono w stosunku do mączniaka dyniowatych [35]. Wykazano, że szczepy *B. bassiana* hamują zgniliznę sadzonek pomidorów i bawełny powodowaną przez grzyby *Rhizoctonia solani* i *Pythium myriotylum*, w tym drugim przypadku działając jako prawdziwy mykopasożyt [52]. W przypadku bawełny, endofityczne szczepy *B. bassiana* były w stanie złagodzić objawy spowodowane przez bakterię *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* [22]. Inne pozytywne efekty osłabienia objawów odnotowano w stosunku do mączniaka rzekomego winorośli [27], a nawet na roślinach dyni dotkniętych

wirusem mozaiki żółtej cukinii (*Zucchini yellow mosaic virus* – ZYMV). Zaobserwowano, że szczepy *B. bassiana* i *Lecanicillium* spp. zasiedlające tkanki palm daktylowych stymulują syntezę białek zaangażowanych w reakcję na stres biotyczny [19].

Innym mechanizmem, dzięki któremu grzyby entomopatogeniczne mogą pozytywnie wpływać na reakcje obronne roślin, jest stymulacja produkcji fitoaleksyn. Zjawisko to zaobserwowano u roślin soi zaszczepionych *M. anisopliae*, w których stwierdzono znaczny wzrost syntezy izoflawonoidów [38]. Ponadto, oprócz ochrony przed czynnikami biotycznymi, endofityczne grzyby entomopatogeniczne mogą mieć działanie wspomagające wzrost roślin dzięki uwalnianiu sideroforów i fitohormonów [38]. *Metarhizium robertsii* jest w stanie ponownie włączyć część związków azotu pochodzących z degradacji zabitych owadów i udostępnić go roślinom [70].

Większość dostępnych danych eksperymentalnych na temat korzyści wynikających z zasiedlania tkanek roślin przez grzyby entomopatogeniczne odnosi się do działania pojedynczych szczepów. Istnieje zatem potrzeba bardziej szczegółowych badań dotyczących interakcji różnych szczepów, które mogłyby działać synergistycznie [71].

4. Zastosowanie grzybów entomopatogenicznych

Mykopestycydy definiuje się jako produkty oparte na propagulach grzybów, przeznaczone do zwalczania szkodników za pomocą aplikacji inokulacyjnych. W przeciwieństwie do preparatów opartych na bakteriach i wirusach, które mogą działać tylko po ich spożyciu, większość mykopestycydów działa poprzez kontakt, dzięki adaptacyjnym mechanizmom biochemicznym i fizjologicznym, które obejmują tworzenie struktur zakaźnych, wytwarzanie proteaz i lipaz pozakomórkowo oraz toksyn. Dotychczas opracowano wiele produktów komercyjnych, których składnik aktywny reprezentuje co najmniej jeden z gatunków grzybów, głównie *Beauveria*, *Isaria*, *Lecanicillium* spp. i *Metarhizium* spp. [76, 77].

Jak dotąd uwaga producentów mykopestycydów skupiała się głównie na wyborze stosunkowo łatwych do produkcji i dystrybucji szczepów, przy rozsądnych kosztach, długoterminowej stabilności i zdolności do szybkiego działania w naturalnych warunkach. Procesy przemysłowe są ukierunkowane na wytwarzanie jednostek dyspersyjnych poprzez indukcję konidiogenezy na sztucznych podłożach, wytwarzanie blastosporów z hodowli drożdży w pożywkach płynnych lub wzrost biomasy strzępkowej na różnych substratach. W celu zwiększenia skuteczności mykopestycydy stanowią najczęściej zawiesinę konidiów, która jest rozpylana,

zapewniając pełne pokrycie i maksymalizując prawdopodobieństwo kontaktu i zakażenie docelowych owadów. W celu poprawy dyspersji preparatów, dodaje się środki zwilżające w postaci adiuwantów. Ponieważ na trwałość grzybów na powierzchni liści negatywnie wpływa promieniowanie ultrafioletowe, w wielu przypadkach podejmuje się próby ochrony inokulum grzyba przez włączenie blokerów i środków przeciwsłonecznych [17].

Mykolestycydy mogą być stosowane w krótkich odstępach czasu, lub nawet jednocześnie z wieloma insektycydami, co zostało potwierdzone w wielu doświadczeniach polowych [72]. Pewne ograniczenia w stosowaniu mykolestycydów mogą wynikać z warunków środowiskowych. W rzeczywistości inokulum entomopatogena ma ograniczony okres trwałości i zazwyczaj potrzeba 2–3 tygodnie, aby skutecznie doprowadzić do śmierci owadów. Ponadto aplikowanie musi być przeprowadzane w okresach wysokiej wilgotności względnej powietrza, aby stworzyć warunki dla kiełkowania zarodników. Zatem przestrzeganie optymalnych warunków aplikowania ma zasadnicze znaczenie dla uzyskania udanego zakażenia owadów przez entomopatogeny, a w przypadku szczepów endofitycznych skutecznego zasiedlenia rośliny, aby zagwarantować jej trwałą ochronę [62].

Badania laboratoryjne wykazały, że szczepy *B. bassiana* i *M. anisopliae* wybrane do biokontroli nie są ani toksyczne, ani zakaźne dla kręgowców [99, 100]. Choć takie badania nie wykazały szkodliwego wpływu grzybów i ich toksyn na ludzi i organizmy nie będące przedmiotem zwalczania, należy jednak zachować ostrożność, aby uniknąć wdychania konidiów podczas pracy z produktem. Wreszcie, biorąc pod uwagę udokumentowaną zdolność produkowania przez większość gatunków grzybów owadobójczych substancji toksycznych, nie należy lekceważyć możliwego zanieczyszczenia mykotoksynami organów roślin przeznaczonych do spożycia [83].

Grzyby entomopatogeniczne wykorzystywane są nie tylko do zwalczania wszelkiego rodzaju szkodliwych stawonogów, ale również coraz częściej mają szersze zastosowanie. Przykłady skuteczności gatunków takich jak *B. bassiana*, *M. anisopliae* i *I. fumosorosea* w leczeniu zwierząt hodowlanych udokumentowano w odniesieniu do ptaszyńca kurzego [88] oraz much [44]. Ewentualne zastosowanie w środowisku antropologicznym wynika ze skuteczności przeciwko musze domowej [47] oraz karaluchowi wschodniemu [26]. Wykazano również efekt synergiczny z syntetycznymi insektycydami wobec tych ostatnich owadów [32]. Wykazano również, że grzyby entomopatogeniczne np. *M. anisopliae*, mogą pasożytować na komarach, więc ich stosowanie wspomaga walkę z malarią [77]. Wyniki licznych badań przeprowadzonych na całym świecie wykazały

ogromny potencjał w ograniczaniu wszystkich gatunków komarów zdolnych do przenoszenia wirusów i innych czynników zakaźnych [96].

Statystyki wskazują, że Ameryka Południowa jest kontynentem, na którym występuje największe wykorzystanie mykoinsektycydów, tj. ok. 43% światowej produkcji. Krajem wiodącym jest Brazylia, gdzie obszar poddany działaniu *M. anisopliae* w celu zwalczania gatunków z rodzaju *Mahanarva* (*Cercopidae*) oszacowano na około milion hektarów w 2008 r., z czego 75% dotyczyło plantacji trzciny cukrowej [45]. W Kolumbii zarodniki *B. bassiana* uzyskane z hodowli na ugotowanym ryżu zostały wykorzystane do ograniczenia populacji ryjkowca kawowego [58]. Innym wiodącym krajem w tym konkretnym sektorze są Chiny, gdzie w ostatnim czasie *B. bassiana* był używany co roku na powierzchniach do 1,3 miliona hektarów dzięki rozwojowi małych regionalnych firm wykorzystujących tanie substraty do masowej produkcji. Osiągnięto mniej lub bardziej znaczące sukcesy jeśli chodzi o zwalczanie szkodników w leśnictwie i rolnictwie tj.: omacnicy prosowianki, skoczaków, ryjkowca ziemniaczanego i gatunków z rodzaju barczatkowate oraz brudnicowate. W Południowych Chinach obszar około miliona hektarów został poddany zabiegom dotyczącym ograniczania ćmy na sosnach [97]. W Polsce prowadzone są próby wykorzystania maczuźnika *Cordyceps militaria*, jako jednej z metod w profilaktyce ochrony lasu przed rozwojem gradacji owadów np. barczatki sosnowki, strzygoni choinówki oraz poprocha cetyniaka. *Cordyceps militaris* występuje na wszystkich kontynentach i ma w różnym stopniu udokumentowaną rolę w regulacji liczebności populacji niektórych owadów leśnych np. gatunku ćmy z rodziny garbatkowate i barczatki sosnowki w Japonii, Polsce i na Litwie. W literaturze sygnalizowana jest pilna potrzeba kontynuowania badań nad metodami wykorzystania maczuźnika *Cordyceps militaris* w profilaktyce ochrony lasu przed rozwojem gradacji owadów, zwłaszcza w świetle coraz krótszej listy dostępnych środków ochrony roślin służących ograniczaniu ich liczebności oraz konieczności spełniania wielu wymagań stawianych przez prawo przed profesjonalnymi użytkownikami w ich stosowaniu [75].

Najczęściej używanym grzybem w ochronie roślin jest *Baeuweria bassiana*, zapewne z powodu szczególnie dużej liczby żywicieli, która obejmuje około 700 gatunków stawonogów i zdolności do adaptacji w różnych środowiskach. Grzyb ten jest wszechobecny w glebie, a często izolowany nawet w środowisku morskim [102]. Gatunek ten, chociaż jednolity pod względem morfologicznym, wykazuje konkretne oznaki pasożytniczej specjalizacji, bowiem zidentyfikowano szczepy szczególnie aktywne przeciwko gatunkom roztoczy (*Tetranychus* spp.) [101]. Patogeniczne właściwości grzyba

związane są wytwarzaniem różnych metabolitów wtórnych, takich jak: kwas szczawiowy, oosporeina, bassianina, tenellina, beauvericina, bassianolid, izarolidyna i beauveriolid, które prawdopodobnie regulują wirulencję lub reakcję immunologiczną w różnym stopniu w zależności od gatunku gospodarza. Innym produktem bioaktywnym jest bassiacrydyna, toksyczne białko, które u wędrownego szarańczy wywołuje śmiertelność do 50%. Ma ona związek z melanizacją na poziomie tchawicy, pęcherzyków powietrza i ciał tłuszczowych [59]. Sekwencjonowanie genotypu *B. bassiana* pozwoliło uzyskać wiedzę na temat genów zaangażowanych w ekspresję wirulencji, które można wykorzystać w biotechnologii. Innym grzybem entomopatogenicznym, którego genotyp został zsekwencjonowany, jest *M. anisopliae* [18]. Podobnie jak w poprzednim przypadku, gatunek ten jest także wszechobecny, w środowisku, nawet znajdowany był w środowisku morskim [9]. Ponadto zidentyfikowano nowy gatunek, *M. blattodeae*, który wykazuje szczególną zdolność do zakażenia karaluchów [50].

Liczne badania wskazują na dominację *B. bassiana* w próbach gleby i ściółki leśnej w Polsce, Danii, Finlandii, Hiszpanii, Chinach i na Słowacji [90]. Grzyb ten występuje często na owadach przebywających w glebie lub zimujących w wierzchnich warstwach gleby. Prawdopodobnie dominacja tego gatunku w bogatych w materię organiczną powierzchniowych warstwach gleby wynika z jego zdolności do rozwoju w fazie saprotroficznej [89, 91]. Z kolei w glebach pól uprawnych najczęściej występuje *M. anisopliae* i *I. fumosorosea*. Pierwszy z wymienionych gatunków jest najbardziej tolerancyjnym w stosunku do gleb zmienianych działalnością człowieka. Ponadto, gatunek ten najlepiej znosi okresową nieobecność żywiciela w środowisku. Stwierdzono także, że na polach wieloobszarowych, gdzie stosowane są intensywne zabiegi agrotechniczne, maleje różnorodność patogenów stawonogów, podobnie jak pasożytów i drapieżców [33].

5. Perspektywy integrowanej ochrony roślin

Zgodnie z Dyrektywą UE i Metodami Instytutu Ochrony Roślin – PIB, Integrowana Ochrona Roślin „jest to sposób ochrony roślin uprawnych przed organizmami szkodliwymi (grzybami, bakteriami, wirusami i innymi czynnikami chorobotwórczymi; owadami; roztocznymi; nicieniami; chwastami lub zwierzętami kręgowymi), polegający na wykorzystaniu wszystkich dostępnych metod profilaktyki i ochrony roślin, w szczególności metod nie chemicznych, w celu minimalizowania potencjalnego zagrożenia dla zdrowia ludzi, zwierząt oraz środowiska. Celem Integrowanej Ochrony Roślin jest utrzymanie populacji agrofagów

poniżej progów szkodliwości oraz zabezpieczenie efektu ekonomicznego produkcji” [39].

Informacje przedstawione w poprzednich rozdziałach wskazują, że stosowanie grzybów entomopatogenicznych do zwalczania szkodliwych owadów w Europie jest nadal na niskim poziomie, pomimo wielu ich zalet, w porównaniu do produktów chemicznych i innych biologicznych. Jednak postęp wiedzy na temat tych grzybów i możliwości, jakie biotechnologia oferuje dzięki wykorzystywaniu pożądanych cech wybranych szczepów, wydaje się znacząco wpływać na poprawę skuteczności grzybowych środków owadobójczych i zwiększyć ich rolę w najbliższym czasie. Dalsze badania powinny uwzględniać zarówno bezpośrednie działanie grzybów owadobójczych jak i pośrednie oddziaływanie jako antagonistów, induktorów odporności i mikroorganizmów wspomagających wzrost roślin. Daje to możliwość wyselekcjonowania szczepów o wysokiej wirulencji i szerokim spektrum działania na szkodniki roślin. Z drugiej strony, wybór szczepów posiadających określone zdolności, powinien być ukierunkowany także na możliwość ich zastosowania w integrowanej ochronie roślin, razem z produktami syntetycznymi, których stosowanie wydaje się niezbędne do osiągnięcia wysokich plonów, szczególnie w przypadku upraw specjalistycznych. W związku z tym należy zwrócić należytą uwagę, że populacje owadów odporne na niektóre produkty syntetyczne są często bardziej podatne na entomopatogeny [25]. Z tego powodu, duże znaczenie powinna mieć możliwość wykorzystania synergistycznego działania grzybów owadobójczych z różnymi insektycydami. Niektóre badania pokazują, że jest to możliwe, bowiem uzyskano pozytywne wyniki w testach z preparatami: chlorantranilipolem [29] i pyretroidami [48]. Jednak większość fungicydów hamuje kiełkowanie grzybów owadobójczych [77]. W literaturze wskazuje się również na próby łącznego stosowania grzybów owadobójczych z entomofagami lub z zapylaczami, bowiem np. *Isaria fumosorosea* nie infekuje trzmieli [77]. Pozytywne wyniki odnotowano także w przypadku ochrony pomidorów i papryki uprawianych w szklarniach przy użyciu trzmieli (*Bombus impatiens*) w celu roznoszenia preparatu opartego na *B. bassiana* [74] oraz do zwalczania *Otiorynchus sulcatus* przez *M. brunneum* i *B. bassiana* [71], chociaż niektórzy autorzy wskazują na szkodliwość *B. bassiana* dla trzmieli [77].

Zastosowania entomopatogenów jest szczególnie wskazane w uprawach pod osłonami, gdzie osiągnięto największy sukces w stosowaniu bioinsektycydów. W takich warunkach można regulować temperaturę i wilgotność powietrza, a grzyby owadobójcze potrzebują temperatury ok. 25°C i wilgotności 80–90% dla skielkowania zarodników i dokonania zakażenia [77, 78]. Uprawy pod osłonami są zatem łatwiejsze do

ochrony przy pomocy preparatów opartych na grzybach owadobójczych z rzędu *Hypocreales*, a szczególnie *Entomophthorales*, które mają wyższe wymagania co do wilgotności, aby były skuteczne. Takie wymagania grzybów oraz trudności techniczne dotyczące głównie produkcji masowej oraz wielkości i stabilności propaguli, ograniczyły rozwój produktów opartych na grzybach owadobójczych, pomimo konkretnych badań przeprowadzonych w celu przewyższenia niektórych z wyżej wymienionych problemów [73]. Z tego powodu grzyby owadobójcze mogą być szczególnie przydatne, jeśli wdrażane zostaną strategie mające na celu ochronę rodzimej bioróżnorodności w ekosystemach, m.in. poprzez modyfikację środowiska lub ograniczenie zabiegów agrotechnicznych [77]. Stwierdzono bowiem, że większa różnorodność tych mikroorganizmów występuje w glebach, gdzie prowadzona jest uprawa ekologiczna niż w glebach z tradycyjnej uprawy. Wykazano także, że rozwojowi grzybów owadobójczych sprzyjają siedliska silnie uwilgotnione, lasy, szuwały, zadrzewienia, łąki i uprawy wieloletnie [77].

Obecnie, większość biopreparatów produkowanych na bazie grzybów owadobójczych opiera się na polifagicznych gatunkach grzybów z rzędu *Hypocreales*, które mają szerokie spektrum gospodarzy. Grzyby owadomorkowe z rzędu *Entomophthorales*, które są bardziej wyspecjalizowane w stosunku do żywiciela, trudno rosną na sztucznych podłożach, więc nie znajdują zainteresowania wśród potencjalnych producentów biopreparatów [6]. Na terenie Polski zarejestrowano dwa bioinsektycydy do zwalczania szkodników w uprawach pod osłonami: Preferal, na bazie grzyba *I. fumosorosea* [90] i Naturalis zawierający szczep ATCC 74040 grzyba *B. bassiana* [85]. Na świecie asortyment tych środków jest znacznie większy. Najwięcej bioinsektycydów opartych jest na gatunku *B. bassiana* [77].

Mykoinsektycydy komercyjne oparte na *B. bassiana* są stosunkowo stabilne w porównaniu z innymi. Dzięki inżynierii genetycznej opracowano metody transformacji dzikich szczepów w celu poprawy ich działania, łącząc cechy różnych zmutowanych szczepów. Na przykład, zaobserwowano, że reakcja fotoreceptora ma znaczący wpływ na konidiogenezę i wirulencję i że tolerancję na promieniowanie ultrafioletowe można znacznie poprawić przez wprowadzenie systemu fotoreceptorów pigmentowych od innych gatunków grzybów [94]. Jeszcze bardziej istotne dla rozwoju hiperwirulentnych szczepów jest pełne zrozumienie dynamiki procesu zakaźnego wpływającego na różne gatunki owadów. Obecnie prowadzonych jest wiele badań nad możliwością transformacji dzikich szczepów w celu zwiększenia ekspresji specyficznych genów, ze szczególnym uwzględnieniem tych kodujących chitynazy i proteiny oraz regulujących szlaki metaboliczne do produkcji toksyn. Bardzo interesujące wydają się

być wyniki badań wskazujące, że ekspresja białka fuzyjnego o połączonej aktywności proteazy i chitynazy zwiększa wirulencję *B. bassiana* przeciwko mszycy brzoskwińowej. Nie należy jednak zapominać, że transformowane szczepy ogólnie mają zmniejszoną zdolność adaptacji i trwałość w środowisku, co może obniżyć ich skuteczność [94].

Ważnym kryterium oceny mykoinsektycydów jest bezpieczeństwo dla ludzi, środowiska i pożytecznych organizmów. Generalnie uważa się, że grzyby owadobójcze nie powodują objawów fitotoksyczności roślin i są bezpieczne dla zdrowia ludzi oraz środowiska [77]. Niedawno jednak poddano w wątpliwość, czy metabolity produkowane przez gatunki *Beauveria* i *Metarhizium*, głównie ze strukturą cyklopeptydu, faktycznie są bezpieczne [86]. Wydaje się, że ryzyko związane ze stosowaniem tych produktów jest minimalne, może raczej wynikać z produkcji mykotoksyn przez grzyby z rodzajów: *Cladosporium*, *Aspergillus* i *Penicillium*, które są znacznie bardziej rozpowszechnione w środowisku. Ciekawym zagadnieniem są także aspekty związane z interakcjami entomopatogennych grzybów z układem odpornościowym owadów. Mechanizmy obrony owadów przed patogenami wskazują na wysokie podobieństwo do układu odpornościowego kręgowców. W związku z tym, w przyszłości wiele zależeć będzie od postępu badań i wiedzy na temat procesów regulujących odporność owadów oraz adaptacji grzybów entomopatogenicznych do pokonania tych barier podczas długiej drogi ewolucji [41].

6. Podsumowanie

W pracy zaprezentowano przegląd aktualnych badań nad grzybami owadobójczymi. Entomopatogeny są rozpowszechnione w przyrodzie i stanowią atrakcyjny czynnik biologicznej ochrony. Oprócz możliwości pasożytowania na owadach i roztoczach wykazują także inne, pośrednie mechanizmy oddziaływania, które przyczyniają się do ograniczania populacji szkodników. Wiele gatunków zasiedla endofitycznie tkanki roślin wspomagając ich odporność oraz wzrost i rozwój. Ochronne właściwości szczepów endofitycznych wynikają m.in. ze stymulacji produkcji fitoaleksyn, uwalniania sideroforów i fitohormonów. Szerokie uzdolnienia grzybów owadobójczych wykorzystywane są do produkcji biopreparatów, które mogą być włączone do integrowanej ochrony roślin. Obecnie badania ukierunkowane są na zwiększenie produkcji i wprowadzania bioinsektycydów do środowiska, prowadzone są także działania mające na celu modyfikację środowiska naturalnego poprzez stwarzanie dogodnych warunków do zachowania bioróżnorodności i rozwoju mikroorganizmów pożytecznych w ekosystemach

Piśmiennictwo

- Abdel-Baky N.F., Abdel-Salam A.H.: Natural incidence of *Cladosporium* spp. as a bio-control agent against whiteflies and aphids in Egypt. *J. App. Entomol.* **127**, 228–235 (2003)
- Akello J., Sikora R.: Systemic acropetal influence of endophyte seed treatment on *Acyrtosiphon pisum* and *Aphis fabae* offspring development and reproductive fitness. *Biol. Control* **61**, 215–221 (2012)
- Andersen S.B., Gerritsma S., Yusah K.M., Mayntz D., Hywel-Jones N.L., Billen J., Boomsma J.J., Hughes D.P.: The life of a dead ant: the expression of an adaptive extended phenotype. *Am. Nat.* **174**, 424–433 (2009)
- Askary H., Carriere Y., Belanger R.R., Brodeur J.: Pathogenicity of the fungus *Verticillium lecanii* to aphids and powdery mildew. *Biocontrol Sci. Techn.* **8**, 23–32 (1998)
- Audoin V.: Nouvelles expériences sur la nature de la maladie contagieuse qui attaque les vers à soie, et qu'on désigne sous le nom de muscardine. *Ann. Sci. Nat.* **8**, 257–270 (1837)
- Augustyniuk-Kram A.: Organizmy pożyteczne w strategiach biologicznego zwalczania – grzyby owadobójcze. *Studia Ecologiae et Bioethicae*, **8**, 45–53 (2010)
- Bałazy S.: Zróżnicowanie grup funkcjonalnych grzybów entomopatogenicznych. *Biotechnologia*, **3**, 11–32 (2000)
- Bałazy S.: Znaczenie obszarów chronionych dla zachowania zasobów grzybów entomopatogenicznych. *Kosmos*, **1**, 5–16 (2004)
- Bischoff J.F., Rehner S.A., Humber R.A.: A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, **101**, 512–530 (2009)
- Bruck D.J.: Fungal entomopathogens in the rhizosphere. *Biocontrol*, **55**, 103–112 (2010)
- Butt T.M., Coates C.J., Dubovskiy I.M., Ratcliffe N.A.: Entomopathogenic fungi: new insights into host-pathogen interactions. *Adv. Genet.* **94**, 307–364 (2016)
- Da Costa G.L., de Moraes A.M.L., Galvão C.: Entomopathogenic effect of *Aspergillus giganteus* and *Penicillium corylophilum* on two triatomine vectors of Chagas disease. *J. Basic Microb.* **43**, 3–7 (2003)
- De Hong G.S.: The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen.nov. *Studies in Mycology*, **1**, 1–41 (1972)
- De Lima Barros M.B., de Almeida Paes R., Schubach A.O.: *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Clin Microbiol. Rev.* **24**, 633–654 (2011)
- Dissanayake A.J., Jayawardena R.S., Boonmee S., Thambugala K.M., Tian Q., Mapook A., Senanayake I.C., Yan J., Li Y.M., Li X., Chukeatirote, E., Hyde K.D.: The status of *Myriangiaceae* (*Dothideomycetes*). *Phytotaxa*, **176**, 219–237 (2014)
- Fassatiava O.: Grzyby mikroskopowe w mikrobiologii technicznej. Wyd. Naukowo-Techniczne, Warszawa 1983, s. 256 (1983)
- Fernandes É.K., Rangel D.E., Braga G.U., Roberts D.W.: Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. *Current Genetics*, **61**, 427–440 (2015)
- Gao Q., Jin K., Ying S.H., Zhang Y., Xiao G., Shang Y., Duan Z., Hu X., Xie X.Q., Zhou G., Peng G., Luo Z., Huang W., Wang B., Fang W., Wang S., Zhong Y., Ma L.J., St. Leger R. J., Zhao G.P., Pei Y., Feng M.G., Xia Y., Wang C.: Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS Genetics*, **7**, e1001264 (2011)
- Gómez-Vidal S., Salinas J., Tena M., Lopez-Llorca L.V.: Proteomic analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) responses to endophytic colonization by entomopathogenic fungi. *Electrophoresis*, **30**, 2996–3005 (2009)
- Greenfield M., Gómez-Jiménez M.I., Ortiz V., Vega F.E., Kramer M., Parsa S.: *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation. *Biol. Control*, **95**, 40–48 (2016)
- Greif M.D., Currah R.S.: Patterns in the occurrence of saprophytic fungi carried by arthropods caught in traps baited with rotted wood and dung. *Mycologia*, **99**, 7–19 (2007)
- Griffin M.R., Ownley B.H., Klingeman W.E., Pereira R.M.: Evidence of induced systemic resistance with *Beauveria bassiana* against *Xanthomonas* in cotton. *Phytopathology*, **96**, S42 (2006)
- Hajek A.E., Leger R.J.: Interactions between fungal pathogens and insects host. *Annu. Rev. Entomol.* **39**, 15–22 (1994)
- Hajek A.E.: Larval behavior in *Lymantria dispar* increases risk of fungal infection. *Oecologia*, **126**, 285–291 (2001)
- Howard A.F., Koenraadt C.J., Farenhorst M., Knols B.G., Takken W.: Pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* leads to increased susceptibility to the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Malaria J.* **9**, 168 (2010)
- Hubner-Campos R.F., Leles R.N., Rodrigues J., Luz C.: Efficacy of entomopathogenic hypocrealean fungi against *Periplaneta americana*. *Parasitol. Int.* **62**, 517–521 (2013)
- Jaber L.R.: Grapevine leaf tissue colonization by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* s.l. and its effect against downy mildew. *Biocontrol*, **60**, 103–112 (2015)
- Jensen M.A., Losey J.E., Hajek A.E.: Altered behavior and distribution of pea aphids, *Acyrtosiphon pisum* (*Homoptera: Aphididae*), infected with *Pandora neoaphidis* (*Zygomycetes: Entomophthorales*). *Biocontrol*, **46**, 337–343 (2001)
- Jia M., Cao G., Li Y., Tu X., Wang G., Nong X., Whitman D.W., Zhang Z.: Biochemical basis of synergism between pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and insecticide chlorantraniliprole in *Locusta migratoria* (Meyen). *Sci. Rep.* **6**, 28424 (2016)
- Joop G., Vilcinskas A.: Coevolution of parasitic fungi and insect hosts. *Zoology*, **119**, 350–358 (2016)
- Kaakeh W., Reid B.L., Bohnert T.J., Bennett G.W.: Toxicity of imidacloprid in the German cockroach (*Dictyoptera: Blattellidae*), and the synergism between imidacloprid and *Metarhizium anisopliae* (Imperfect Fungi: Hyphomycetes). *J. Econ. Entomol.* **90**, 473–482 (1997)
- Karhi S., Shivakumar M.S., Ponsankar A., Thanigaiavel A., Chellappandian M., Vasantha-Srinivasan P., Muthu-Pandian C.K., Hunter W.B., Senthil-Nathan S.: Effect of *Aspergillus flavus* on the mortality and activity of antioxidant enzymes of *Spodoptera litura* Fab. (*Lepidoptera: Noctuidae*) larvae. *Pesti. Biochem. and Phys.* **149**, 54–60 (2018)
- Karg J., Bałazy S.: Wpływ struktury krajobrazu na występowanie agrofagów i ich antagonistów w uprawach rolniczych. *Prog. Plant. Prot./Post. Ochr. Roślin* **49**, 1015–1034 (2009)
- Kaur H.P., Singh B., Thakur A., Kaur A., Kaur S.: Studies on immunomodulatory effect of endophytic fungus *Alternaria alternata* on *Spodoptera litura*. *J. Asia-Pac. Entomol.* **18**, 67–75 (2015)
- Kavková M., Curn V.: *Paecilomyces fumosoroseus* (*Deuteromycotina: Hyphomycetes*) as a potential mycoparasite on *Sphaerotheca fuliginea* (*Ascomycotina: Erysiphales*). *Mycopathologia*, **159**, 53–63 (2005)
- Kepler R., Ban S., Nakagiri A., Bischoff J., Hywel-Jones N., Owensby C.A., Spatafora J.W.: The phylogenetic placement of hypocrealean insect pathogens in the genus *Polycephalomycetes*: An application of one fungus one name. *Fungal Biol.* **117**, 611–622 (2013)
- Kepler R.M., Luangsa-ard J.J., Hywel-Jones N.L., Quandt C.A., Sung G.-H., Rehner S.A., Aime M.C., Henkel T.W., Sanjuan T., Zare R., Chen M., Li Z., Rossman A.Y., Spatafora J.W., Shrestha B.: A phylogenetically-based nomenclature for *Cordycipitaceae* (*Hypocreales*). *IMA Fungus*, **8**, 335–353 (2017)

38. Khan A.L., Hamayun M., Khan S.A., Kang S.M., Shinwari Z.K., Kamran M., Ur Rehman S., Kim J.G., Lee I.J.: Pure culture of *Metarhizium anisopliae* LHL07 reprograms soybean to higher growth and mitigates salt stress. *World J. Microb. Biot.* **28**, 1483–1494 (2012)
39. Kielak K.: Nowe przepisy dotyczące stosowania środków ochrony roślin – wyzwania dla techniki ochrony roślin, <https://www.ior.poznan.pl/plik,1489,kielak-x-racjonalna-technika-2012> (12.08.2019)
40. Kim J.J., Goettel M.S., Gillespie D.R.: Potential of *Lecanicillium* species for dual microbial control of aphids and the cucumber powdery mildew fungus, *Sphaerotheca fuliginea*. *Biol. Control* **40**, 327–332 (2007)
41. Krassilstchik J.: La production industrielle des parasites végétaux par la destruction des insectes nuisibles. *Bulletin Biologique de la France et de la Belgique*, **19**, 461–472. (1888)
42. LeConte J.L.: Hints for the promotion of economic entomology. *P. Am. Assoc. Adv. Sci.* **22**, 10–22 (1874)
43. Lefort M.C., McKinnon A., Nelson T.L., Glare T.: Natural occurrence of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* as a vertically transmitted endophyte of *Pinus radiata* and its effect on above- and below-ground insect pests. *N. Z. Plant Protect.* **69**, 68–77 (2016)
44. Lohmeyer K.H., Miller J.A.: Pathogenicity of three formulations of entomopathogenic fungi for control of adult *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *J. Econ. Entomol.* **99**, 1943–1947 (2006)
45. Lu H.L., St. Leger R.J.: Insect immunity to entomopathogenic fungi. *Adv. Genet.* **94**, 251–285 (2016)
46. Luangsa-ard J., Houbraken J., van Doorn T., Hong S.B., Borman A.M., Hywel-Jones N.L., Samson R.A.: *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **321**, 141–149 (2011)
47. Machtinger E.T., Weeks E.N.I., Geden C.J., Kaufman P.E.: House fly (*Musca domestica*) (Diptera: Muscidae) mortality after exposure to commercial fungal formulations in a sugar bait. *Biocontrol Sci. Techn.* **26**, 1444–1450 (2016)
48. Meyling N.V., Arthur S., Pedersen K.E., Dhakal S., Cedergreen N., Fredensborg B.L.: Implications of sequence and timing of exposure for synergy between the pyrethroid insecticide alpha-cypermethrin and the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Pest Manag. Sci.* **74**. doi.org/10.1002/ps.4926 (2018)
49. Meyling N.V., Pell J.K.: Detection and avoidance of an entomopathogenic fungus by a generalist insect predator. *Ecol. Entomol.* **31**, 162–171 (2006)
50. Montalva C., Collier K., Rocha L.F.N., Inglis P.W., Lopes R.B., Luz C., Humber R.A.: A natural fungal infection of a sylvatic cockroach with *Metarhizium blattodeae* sp. nov., a member of the *M. flavoviride* species complex. *Fungal Biol.* **120**, 655–665 (2016)
51. Ormond E.L., Thomas A.P., Pell J.K., Freeman S.N., Roy H.E.: Avoidance of a generalist entomopathogenic fungus by the ladybird, *Coccinella septempunctata*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **77**, 229–237 (2011)
52. Ownley B.H., Griffin M.R., Klingeman W.E., Gwinn K.D., Moulton J.K., Pereira R.M.: *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. *J. Invertebr. Pathol.* **98**, 267–270 (2008)
53. Parsa S., Ortiz V., Gómez-Jiménez M.I., Kramer M., Vega F.E.: Root environment is a key determinant of fungal entomopathogen endophytism following seed treatment in the common bean, *Phaseolus vulgaris*. *Biol. Control* **116**, 64–81 (2018)
54. Pasteur L.: Observations (au sujet des conclusions de M. Dumas) relatives au phylloxera. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des Sciences*, **79**, 1233–1234 (1874)
55. Paterson R.R.M.: *Cordyceps* – A traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory? *Phytochemistry*, **69**, 1469–1495 (2008)
56. Posada F., Aime M.C., Peterson S.W., Rehner S.A., Vega F.E.: Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Mycol. Res.* **111**, 748–757 (2007)
57. Posada F., Vega F.E.: Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*). *Mycologia*, **97**, 1195–1200 (2005)
58. Posada-Flórez F.J.: Production of *Beauveria bassiana* fungal spores on rice to control the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, in Colombia. *J. Insect Sci.* **8**, 41 (2008)
59. Quesada-Moraga E., Landa B.B., Munoz-Ledesma J., Jimenez-Diaz R.M., Santiago-Alvarez C.: Endophytic colonization of opium poppy *Papaver somniferum* by an entomopathogenic *Beauveria bassiana* strain. *Mycopathologia*, **161**, 323–329 (2006)
60. Quesada-Moraga E., Vey A.: Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Mycol. Res.* **108**, 441–452 (2004)
61. Rehner S.A., Buckley E.: A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, **97**, 84–98 (2005)
62. Resquín-Romero G., Garrido-Jurado I., Delso C., Ríos-Moreno A., Quesada-Moraga E.: Transient endophytic colonizations of plants improve the outcome of foliar applications of mycoinsecticides against chewing insects. *J. Invertebr. Pathol.* **136**, 23–31 (2016)
63. Ríos-Moreno A., Garrido-Jurado I., Resquín-Romero G., Arroyo-Manzanares N., Arce L., Quesada-Moraga E.: *Destruxin A* production by *Metarhizium brunneum* strains during transient endophytic colonization of *Solanum tuberosum*. *Biocontrol Sci. Techn.* **26**, 1574–1585 (2016)
64. Rodrigues J., Luz C., Humber R.A.: New insights into the *in vitro* development and virulence of *Culicinomyces* spp. as fungal pathogens of *Aedes aegypti*. *J. Invertebr. Pathol.* **146**, 7–13 (2017)
65. Rossman A.Y.: *Podonectria*, a genus in the Pleosporales on scale insects. *Mycotaxon*, **7**, 323 (1978)
66. Roy H.E., Pell J.K.: Interactions between entomopathogenic fungi and other natural enemies: implications for biological control. *Biocontrol Sci. Techn.* **10**, 737–752 (2000)
67. Roy H.E., Steinkraus D.C., Eilenberg J., Hajek A.E., Pell J.K.: Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Annu. Rev. Entomol.* **51**, 331–357 (2006)
68. Russo M.L., Pelizza S.A., Cabello M.N., Stenglein S.A., Scorsetti A.C.: Endophytic colonisation of tobacco, corn, wheat and soybeans by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota, Hypocreales). *Biocontrol Sci. Techn.* **25**, 475–480 (2015)
69. Samson R.A., Gams W., Evans H.C.: *Pleurodesmospora*, a new genus for the entomogenous hyphomycete *Gonatorrhodiella coccorum*. *Persoonia*, **11**, 65–69 (1980)
70. Sasan R.K., Bidochka M.J.: The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *Am. J. Bot.* **99**, 101–107 (2012)
71. Senthilkumar N., Murugesan S., Babu D.S.: Metabolite profiling of the extracts of endophytic fungi of entomopathogenic significance, *Aspergillus flavus* and *Nigrospora sphaerica* isolated from tropical tree species of India, *Tectona grandis* L. *Journal of Agriculture and Life Sciences*, **1**, 108–114 (2014)
72. Shah F.A., Ansari M.A., Watkins J., Phelps Z., Cross J., Butt T.M.: Influence of commercial fungicides on the germination, growth

- and virulence of four species of entomopathogenic fungi. *Biocontrol Sci. Technol.* **19**,743–753 (2009)
73. Shah P.A., Aebi M., Tuor U.: Infection of *Macrosiphum euphorbiae* with mycelial preparations of *Erynia neoaphidis* in a greenhouse trial. *Mycol. Res.* **104**,645–652 (2000)
 74. Shipp L., Kapongo J.P., Park H.H., Kevan P.: Effect of bee-vectored *Beauveria bassiana* on greenhouse beneficials under greenhouse cage conditions. *Biol. Control* **63**,135–142 (2012)
 75. Sierpińska L.: Proceedings: Populations dynamics impacts and integrated management of forest defoliating insects : 129–142 (W: Ml. McManus i A.M. Liebhold (red.) USDA Forest Service General Technical Report, NE-247 (1998)
 76. Sosnowska D.: Biopreparaty grzybowe w biologicznym zwalczaniu szkodników upraw szklarniowych i polowych. *Post. Nauk Roln.* **5**,17–37 (2005)
 77. Sosnowska D.: Postępy w badaniach nad wykorzystaniem grzybów pasożytniczych w integrowanej ochronie roślin. *Prog. Plant. Prot./Post. Ochr. Roślin* **4**, 747–750 (2013)
 78. Sosnowska D., Piątkowski J. Nowy preparat biologiczny do zwalczania mączlika szklarniowego. *Ochrona Roślin*, **11**, 7–9 (1995)
 79. St. Leger R.J.: Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. *J. Invertebr. Pathol.* **98**, 271–276 (2008)
 80. St. Leger R.J., Wang C.S.: Genetic engineering of fungal biocontrol agents to achieve greater efficacy against insect pests. *Appl. Microbiol. Biot.* **85**, 901–907 (2010)
 81. Staples J.A., Milner R J.: A laboratory evaluation of the repellency of *Metarhizium anisopliae* conidia to *Coptotermes lacteus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Sociobiology*, **36**,133–148 (2000)
 82. Steenberg T., Humber R.A.: Entomopathogenic potential of *Verticillium* and *Acremonium* species (*Deuteromycotina: Hyphomycetes*). *J. Invertebr. Pathol.* **73**, 309–314 (1999)
 83. Strasser H., Vey A., Butt T.M.: Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolyocladium* and *Beauveria* species?. *Biocontrol Sci. Technol.* **10**,717–735 (2000)
 84. Strongman D.B., Strunz G.M., Giguere P., Yu C.M., Calhoun L.: Enniatins from *Fusarium avenaceum* isolated from balsam fir foliage and their toxicity to spruce budworm larvae, *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (*Lepidoptera: Tortricidae*). *J. Chem. Ecol.* **14**, 753–764 (1988)
 85. Studzińska B.: Nowości w ekologicznej ochronie roślin. <http://jakzostacrolnikiemeko.pl/wp-content/uploads/2019/03/Nowo%C5%9Bci-w-ekologicznej-ochronie-ro%C5%9Blin> (12.08.2019)
 86. Sung G.H., Hywel-Jones N.L., Sung J.M., Luangsa-ard J.J., Shrestha B., Spatafora J.W.: Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Stud. Mycol.* **57**, 5–59 (2007)
 87. Taevner L., Wynendaele E., De Vreese L., Burvenich C., De Spiegeleer B.: The mycotoxin definition reconsidered towards fungal cyclic depsipeptides. *J. Environ. Sci. Heal. C* **34**, 114–135 (2016)
 88. Tavassoli M., Allymeh M., Pourseyed S.H., Ownag A., Bernousi I., Mardani K., Ghorbanzadegan M., Shokrpour S.: Field bioassay of *Metarhizium anisopliae* strains to control the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*. *Vet. Parasitol.* **178**, 374–378 (2011)
 89. Tkaczuk C., Krzyczkowski T., Wegensteiner R.: The occurrence of entomopathogenic fungi in soils from mid-field woodlots and adjacent small-scale arable fields. *Acta Mycol.* **2**: 191–202 (2012)
 90. Tkaczuk C., Majchrowska-Safaryan A., Miętkiewski R.: Wpływ wybranych fungicydów oraz wyciągów glebowych na wzrost owadobójczego grzyba *Metarhizium anisopliae*. *Prog. Plant. Prot./Post. Ochr. Roślin* **4**: 751–756 (2013)
 91. Tkaczuk C., Król A., Majchrowska-Safaryan A., Niecewicz Ł.: The occurrence of entomopathogenic fungi in soils from fields cultivated as a conventional and organic system. *Journal of Ecological Engineering*, **4**: 137–144 (2014)
 92. Tkaczuk C., Majchrowska-Safaryan, Harasimiuk M.: Występowanie oraz potencjał infekcyjny grzybów entomopatogenicznych w glebach z pól uprawnych, łąk i siedlisk leśnych. *Prog. Plant Prot.* **1**: 5–11 (2015)
 93. Tomalak M., Sosnowska D., Lipa J.J.: Czynniki biologiczne w integrowanej ochronie roślin. *Prog. Plant. Prot./Post. Ochr. Roślin* **4**: 1776–1786 (2011)
 94. Tong S.M., Zhang A.X., Guo C.T., Ying S.H., Feng M.G.: Daylight length-dependent translocation of VIVID photoreceptor in cells and its essential role in conidiation and virulence of *Beauveria bassiana*. *Environ. Microbiol.* **20**, 169–185 (2018)
 95. Vandermeer J., Perfecto I., Liere H.: Evidence for hyperparasitism of coffee rust (*Hemileia vastatrix*) by the entomogenous fungus, *Lecanicillium lecanii*, through a complex ecological web. *Plant Pathol.* **58**, 636–641(2009)
 96. Vossbrinck C.R., Andreadis T.G., Vavra J., Becnel J.J.: Molecular phylogeny and evolution of mosquito parasitic microsporidia (*Microsporidia: Amblyosporidae*). *J. Eukaryot. Microbiol.* **51**, 88–95 (2004)
 97. Wang C.S., Fan M.Z., Li Z.Z., Butt T.M.: Molecular monitoring and evaluation of the application of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* in southeast China. *J. Appl. Microbiol.* **96**, 861–870 (2004)
 98. Watanabe T.: Pictorial atlas of soil and seed fungi. Morphologies of cultured fungi and key species. Wyd. 3.– CRC Press. 2010, s 404
 99. Weir A., Hammond P.M.: Laboulbeniales on beetles: host utilization patterns and species richness of the parasites. *Biodivers. Conserv.* **6**, 701–719 (1997)
 100. Wells P.M., Baverstock J., Majerus M.E., Jiggins F.M., Roy H.E., Pell J.K.: The effect of the coccinellid *Harmonia axyridis* (*Coleoptera: Coccinellidae*) on transmission of the fungal pathogen *Pandora neoaphidis* (*Entomophthorales: Entomophthoraceae*). *Eur. J. Entomol.* **108**, 87–90 (2011)
 101. Wu S., Xie H., Li M., Xu X., Lei Z.: Highly virulent *Beauveria bassiana* strains against the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*, show no pathogenicity against five phytoseiid mite species. *Exp. Appl. Acarol.* **70**, 421–435 (2016)
 102. Yamazaki H., Rotinsulu H., Kaneko T., Murakami K., Fujiwara H., Ukai K., Namikoshi M.: A new dibenz[b,e]oxepine derivative, 1-hydroxy-10-methoxy-dibenz[b,e]oxepin-6,11-dione, from a marine-derived fungus, *Beauveria bassiana* TPU942. *Mar. Drugs* **10**, 2691–2697 (2012)
 103. Zhang Q., Zhang J., Yang L., Zhang L., Jiang D., Chen W., Li G.: Diversity and biocontrol potential of endophytic fungi in *Brassica napus*. *Biol. Control* **72**, 98–108 (2014)
 104. Zimmermann G.: Review on safety of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci. Technol.* **17**, 553–596 (2007)
 105. Zimmermann G.: Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Sci. Technol.* **17**, 879–920 (2007)

MOLEKULARNE METODY DIAGNOSTYKI DERMATOMYKOZ – PRZEGLĄD DOSTĘPNYCH TECHNIK ORAZ OCENA ICH ZALET I WAD W IMPLEMENTACJI DO RUTYNOWEGO STOSOWANIA

Sebastian Gnat^{1,*}, Dominik Łagowski¹, Aneta Nowakiewicz¹, Mariusz Dyląg²

¹ Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt, Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej

² Uniwersytet Wrocławski, Wydział Nauk Biologicznych, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Zakład Mykologii i Genetyki

Wpłynęło w kwietniu, zaakceptowano w sierpniu 2019 r.

Streszczenie: Infekcje grzybicze skóry, włosów i paznokci stanowią najliczniejszą i najbardziej rozpowszechnioną grupę wszystkich grzybic. Czynniki etiologicznymi większości grzybiczych infekcji powierzchownych są dermatofity, które, pomimo że są najstarszymi mikroorganizmami uznanymi za czynniki chorobotwórcze, długo nie doczekały się stabilnego systemu taksonomicznego. Z diagnostycznego punktu widzenia, identyfikacja gatunkowa dermatofitów wciąż stanowi poważny problem w postępowaniu identyfikacyjnym, z czego wynikają częste błędy terapeutyczne. Wzrastająca liczba zakażeń, w tym również odzwierzęcych, brak stabilności taksonomicznej i niejednoznaczny obraz kliniczny wszystkich przypadków dermatomykoz powodują konieczność poszukiwania nowych metod szybkiej, taniej i powtarzalnej identyfikacji gatunkowej tych grzybów. Ostatnia dekada stanowi rewolucyjny czas opracowywania molekularnych metod diagnostyki i identyfikacji gatunkowej czynników etiologicznych powodujących te dermatomykozy. Wyniki wielu badań wskazują, że bezpośrednia identyfikacja grzybów z próbek dermatologicznych w oparciu o metody molekularne jest o wiele bardziej wiarygodna i znacznie szybsza w porównaniu z prowadzoną metodami konwencjonalnymi. Niejednokrotnie, identyfikowano też czynnik etiologiczny obserwowanych zmian, podczas gdy wynik hodowli był negatywny. Poszczególne metody molekularne stosowane w identyfikacji gatunkowej grzybów bezpośrednio z materiału klinicznego różnią się sposobami ekstrakcji DNA genomowego, zastosowanymi technikami PCR, wykorzystywanym markerem molekularnym oraz systemem interpretacji wyników. W niniejszej pracy dokonano przeglądu literatury traktującej o różnych metodach diagnozowania grzybic powierzchniowych opartych o techniki biologii molekularnej, o ich zaletach i ograniczeniach, a także o czynnikach krytycznych dla ich implementacji do rutynowego stosowania. Stanowisko mikrobiologów wydaje się być jednoznaczne, czas, kiedy diagnostyka molekularna zastąpi konwencjonalne techniki oparte na hodowli dermatofitów i ocenie ich morfologii, nieubłaganie nadchodzi. Molekularne metody identyfikacji czynników etiologicznych dermatomykoz bezpośrednio z próbek dermatologicznych są zdecydowanie bardziej atrakcyjne i mają wiele zalet.

1. Wprowadzenie. 2. Znaczenie identyfikacji gatunkowej dermatofitów w próbkach dermatologicznych. 3. Molekularna identyfikacja gatunkowa czystych kultur dermatofitów. 4. Metody bezpośredniej identyfikacji grzybów z prób klinicznych. 4.1. Izolacja DNA. 4.2. Techniki bezpośredniej identyfikacji oparte na klasycznym PCR. 4.3. Techniki bezpośredniej identyfikacji oparte na PCR w czasie rzeczywistym. 5. Wybór optymalnej metody do stosowania rutynowego. 6. Zalety i wady molekularnych metod identyfikacyjnych stosowanych w mykologii. 7. Podsumowanie

MOLECULAR METHODS FOR DIAGNOSTICS OF DERMATOMYCOSES – REVIEW OF AVAILABLE TECHNIQUES AND EVALUATION OF THEIR ADVANTAGES AND DISADVANTAGES IN IMPLEMENTATION FOR IN ROUTINE USE

Abstract: Fungal infections of the skin, hairs, and nails undeniably dominate among all types of fungal infections. The etiological factors of the majority of superficial fungal infections are dermatophytes which, although they are the oldest microorganisms considered as pathogens, have long been unstable in the taxonomic position. From a diagnostic point of view, the species identification of dermatophytes is still a serious problem, often generating therapeutic errors. An increasing number of infections, including zoonoses, lack of taxonomic stability and ambiguous clinical picture of all cases of dermatomycosis induce to search for new, fast, repeatable and at the same time cheap methods of species identification of these fungi. In the last decade, revolutionary progress has been observed in the development of molecular methods for the diagnosis of fungal infections and the reliable identification of species of etiological factors that cause these dermatomycoses. The results of many studies indicate that the direct identification of fungi from dermatological samples based on molecular methods is much more reliable and much faster compared to that carried out by conventional methods. Often, the etiological factor of the observed changes was also identified, while the result of cultivation was negative. Particular molecular methods used in the species identification of fungi directly from the clinical material differ in the procedures of genomic DNA extraction, PCR techniques used, the

* Autor korespondencyjny: dr hab. Sebastian Gnat, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt, Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; tel. 81 445 60 93; e-mail: sebastian.gnat@up.lublin.pl

molecular marker used and the results interpretation system. This paper reviews literature regarding different methods of diagnosing of superficial fungal infections based on molecular biology techniques, their advantages and limitations, as well as critical factors for their implementation for routine use. The position of microbiologists in this matter seems to be a foregone conclusion, the time when molecular diagnostics will replace the conventional techniques, based on the cultivation of dermatophytes and assessing their morphology, inexorably coming. Molecular methods of identifying aetiological factors of dermatomycoses directly from dermatological samples are much more attractive and have many advantages.

1. Introduction. 2. Importance of identification of dermatophyte species in dermatological samples. 3. Molecular species identification in pure dermatophyte cultures. 4. Methods for direct identification of fungi from clinical samples. 4.1. DNA isolation. 4.2. Classical PCR-based techniques of direct identification. 4.3. Real-time PCR-based techniques of direct identification. 5. Choice of an optimal method for routine use. 6. Advantages and drawbacks of molecular identification methods applied in mycology. 7. Summary

Słowa kluczowe: dermatofity, grzybnice powierzchniowe, identyfikacja, metody molekularne

Key words: dermatophytes, superficial mycoses, species identification, molecular methods

1. Wprowadzenie

Podstawę diagnostyki mykologicznej powierzchniowych infekcji grzybiczych stanowi niezmiennie od lat bezpośrednie badanie mikroskopowe próbek skóry, włosów i paznokci przeprowadzane w 10% KOH z DMSO i/lub w roztworze kalkofluoru białego (1 g/L, calcofluor white) [20–22]. Badanie to pozwala potwierdzić dermatomykozę zdiagnozowaną w oparciu o obraz kliniczny zmian, nie daje jednak możliwości identyfikacji gatunku czynnika etiologicznego grzybicy [22]. Klasyczna diagnostyka mykologiczna uzupełniana jest testami hodowlanymi, w których identyfikacja gatunkowa oparta jest o analizę mikro- i makro-morfologiczną uzyskanych kultur grzybów [23]. Izolacja czystej kultury dermatofitu jest w większości przypadków przeprowadzana równoległe z wykonywaniem preparatu bezpośredniego ze zmian skórnych [21, 22, 28]. Niemniej jednak badanie hodowlane nie jest „złotym środkiem” do szybkiej i wiarygodnej identyfikacji dermatofitów i związane są z nim trzy powtarzające się problemy. Jedną z zasadniczych kwestii utrudniających identyfikację gatunkową na podstawie morfologii jest subiektywizm oceny struktury makro- i mikroskopowej kultury i konieczność dużego doświadczenia personelu laboratoryjnego, a także zmienność cech morfologicznych w czasie [24, 28]. Drugim z problemów identyfikacyjnych jest możliwość uzyskania negatywnego wyniku hodowli, pomimo uwidocznienia artrospor w preparacie bezpośrednim. Ostatnią z najczęściej wymienianych wad diagnostyki klasycznej opartej na hodowli jest możliwość izolacji kultur grzybów strzępkowych nie będących dermatofitami (NDF, Non-Dermatophyte Fungi) a w szczególności keratynofilnych grzybów pleśniowych, jak chociażby z rodzaju *Chrysosporium*, które na podłożu DTM (Dermatophyte Test Medium) dają dokładnie ten sam efekt jak dermatofity.

Wymienione problemy hodowli dermatofitów, a szczególnie długi czas niezbędny do uzyskania kultur, związany z powolnym wzrostem grzybów tej grupy, skutkują wprowadzaniem nowego trendu diagno-

stycznego w mykologii. W ostatniej dekadzie obserwuje się wręcz rewolucyjny postęp w opracowywaniu molekularnych metod diagnostyki grzybic i wiarygodnej identyfikacji gatunkowej czynników etiologicznych powodujących te dermatomykozy [23]. Celem niniejszej pracy jest dokonanie przeglądu literatury traktującej o różnych metodach diagnozowania grzybic powierzchniowych opartych na technikach biologii molekularnej, o ich zaletach i ograniczeniach, a także o czynnikach warunkujących ich implementację do rutynowego stosowania.

2. Znaczenie identyfikacji gatunkowej dermatofitów w próbkach dermatologicznych

Znaczenie poprawnej identyfikacji gatunkowej czynnika etiologicznego dermatomykozy dostrzegane jest szczególnie wtedy, kiedy leczenie nie przynosi rezultatów. Błędy terapeutyczne skłaniają klinicystów do zlecenia lub ponawiania diagnostyki mykologicznej, która w przypadku pobierania materiału dermatologicznego z miejsc poddanych już działaniu miejscowych środków przeciwgrzybiczych niejednokrotnie jest niemożliwa lub obciążona błędem. Baudraz-Rosselet i wsp. [3] opisują przypadek wielokrotnego leczenia ogólnoustrojowego onychomykozy (*tinea unguinum*), zdiagnozowanej na podstawie objawów klinicznych, terbinafiną i itrakonazolem. Brak skuteczności stosowanych antymykotyków początkowo został przypisany występowaniu opornych na te leki szczepów i *Trichophyton interdigitale*. Dopiero po przeprowadzeniu diagnostyki laboratoryjnej okazało się, że onychomykoza nie ma etiologii dermatofitowej, a za jej występowanie odpowiedzialne są grzyby z rodzaju *Fusarium*, *Acremonium* i *Aspergillus*. Powszechnie wiadomo, że doustna terapia terbinafiną i/lub azolami najczęściej jest skuteczna w leczeniu onychomykozy dermatofitowej, ale terapia ta jest bezużyteczna, gdy czynnikiem etiologicznym jest NDF. Wówczas stosuje się najczęściej alternatywną terapię, tj. miejscowe kremy lub żele przeciwgrzybicze,

w tym z amfoterycyną B lub terapię fotodynamiczną. Poprawna identyfikacja gatunkowa dermatofitów jest także nieodzowna w grzybicach skóry owłosionej głowy (*tinea capitis*) [20]. Istotnym problemem epidemiologicznym w tym przypadku jest właściwa identyfikacja gatunków dermatofitów zoofilnych od ludzi. Dermatofity zoofilne diagnozowane u zwierząt, tj. *Trichophyton mentagrophytes*, *T. verrucosum*, *T. benhamiae*, *Microsporum canis*, *Lophophyton gallinae*, *Nannizzia nana*, odpowiedzialne są za infekcje objawowe, ale niejednokrotnie bytują również bezobjawowo, czyniąc zwierzę nosicielem i w tym przypadku mogą stać się źródłem epidemii [20, 23]. Dodatkowo, gdy dochodzi do transmisji na człowieka, gatunki zoofilne wywołują grzybice o ostrym przebiegu z silnie wyrażonymi objawami reakcji zapalnej i niejednokrotnie z wyraźnie zaznaczonym pierścieniem na obwodzie zmiany [20, 21]. Dowody naukowe podkreślają zjawisko wysokiej zaraźliwości dermatofitów zoofilnych pomiędzy ludźmi, niejednokrotnie prowadzące do powstawania ostrych ognisk infekcji. Zatem, w infekcjach na tle dermatofitów zoofilnych u ludzi zasadnym jest wskazanie możliwego źródła infekcji, którym często jest zwierzę domowe. Odpowiednie leczenie pacjenta i zwierzęcia, a także dezynfekcja środowiska jego przebywania może pomóc w zapobieganiu nawrotom lub nowym infekcjom, zwłaszcza u dzieci. Przeciwnie, identyfikacja gatunkowa dermatofitów nie ma zasadniczego znaczenia w większości przypadków infekcji skórnych (*tinea corporis*) o etiologii antropofilnej, ponieważ te dermatomykozy dobrze reagują na standardowe terapie miejscowe, niezależnie od gatunku [23].

3. Molekularna identyfikacja gatunkowa czystych kultur dermatofitów

Identyfikacja gatunkowa dermatofitów oparta o makromorfologię hodowli i mikromorfologię struktur grzybni jest trudna lub mało wiarygodna z uwagi na znaczne różnice na poziomie makro- i mikroskopowym między poszczególnymi izolatami z tego samego gatunku. Z drugiej strony, podobne morfologicznie szczepy mogą w rzeczywistości przynależać do zupełnie odrębnych gatunków [23]. W związku z tym, znacznie bardziej wiarygodnym kryterium diagnostycznym w mykologii są sekwencje DNA. Jednymi z najlepiej przebadanych fragmentów genomu dermatofitów są regiony międzygenowe rybosomalnego DNA określane jako ITS rDNA (Internal Transcribed Spacer ribosomal DNA) [20, 21, 24, 25, 28]. Gräser oraz de Hoog i wsp. [28], autorzy będący wysoce cenionymi specjalistami z dziedziny mykologii, na podstawie sekwencji ITS rDNA klasyfikują znaczną liczbę gatunków. W badaniach naukowych sekwencja ITS jest często wykorzysty-

wana w identyfikacji dermatofitów [20–22, 54], także w połączeniu z innymi markerami molekularnymi, takimi jak gen beta-tubuliny czy gen czynnika translacyjnego 1 [23, 28]. Sekwencje ITS cechuje na tyle wysoka specyficzność, aby można było przeprowadzić identyfikację na poziomie gatunku i wyższym [22, 28]. Sekwencje 28S rDNA są również użyteczne w identyfikacji gatunków dermatofitów, ale ich siła dyskryminacyjna jest znacznie niższa niż regionu ITS. De Hoog i wsp. [28] zaproponowali w 2016 roku podczas warsztatów zorganizowanych przez CBS KNAW Fungal Biodiversity Centre (The Centraalbureau voor Schimmelcultures Fungal Biodiversity Centre, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences) w Utrechcie w Holandii system taksonomii dermatofitów oparty na sekwencjach czterech regionów genomu: fragmentu ITS, rybosomalnego 60S, genu dużej podjednostki rybosomu (LSU) i genu beta-tubuliny (TUB). Każdy z nich prezentuje inną rozdzielczość, umożliwiając wyodrębnienie różnej liczby taksonów zgodnie z zależnością ITS > TUB > 60S > LSU [28]. Wyniki tych badań wskazują, że cząsteczka ITS rDNA jest wystarczająco informatywna w kontekście analiz genomów dermatofitów. Z tego też względu stanowi optymalny marker w rutynowej diagnostyce, chociaż dla odróżnienia poszczególnych członków niektórych „kompleksów gatunkowych” konieczne jest włączenie do badań molekularnych dodatkowych genów (markerów), jak również testów opartych o cechy fenotypowe. Spośród innych sekwencji używanych w identyfikacji grzybów na poziomie gatunku można wymienić geny kodujące topoizomerazę II i syntazę chityny 1 [27, 29–31].

Identyfikacja gatunku dermatofitu w oparciu o sekwencje nukleotydowe zdeponowane w publicznie dostępnej bazie danych GenBank prowadzonej przez NCBI (National Center of Biotechnology Information) jest często problematyczna. W bazie tej znajdują się liczne błędy, które polegają na zapisie identycznych sekwencji nukleotydowych pod różnymi nazwami gatunkowymi (w szczególności dotyczy to sekwencji ITS i 28S). Powodem takiego stanu są wielokrotne zmiany nomenklatury dermatofitów, przede wszystkim w obrębie kompleksów *T. mentagrophytes* i *T. benhamiae*, będących przedmiotem badań w licznych ośrodkach naukowych [4, 13]. Wiele gatunków, pochodzących z izolatów klinicznych, wchodzących w skład wymienionych kompleksów jest błędnie zidentyfikowanych przez deponentów sekwencji. Problem ten można częściowo rozwiązać wykorzystując bazę danych dedykowaną wyłącznie sekwencjom nukleotydowym ITS, która jest nieustannie aktualizowana przez jeden z bardziej znanych na świecie ośrodków zajmujących się tematyką dermatofitów, tj. CBS KNAW Fungal Biodiversity Centre. Obecnie w środowisku mikrobiologów trwa dyskusja nad rozpoczęciem prac nad przygotowaniem, dedykowanej

specjalnie dla laboratoriów diagnostyki mykologicznej, bazy danych sekwencji nukleotydowych oraz opisów morfologicznych gatunków sklasyfikowanych według nowych zasad taksonomicznych [23, 28].

4. Metody bezpośredniej identyfikacji grzybów z próbek klinicznych

Metody PCR do bezpośredniej identyfikacji grzybów w próbkach dermatologicznych oparte są na trzech głównych filarach: wysokowydajnej ekstrakcji DNA, specyficznych starterach i wiarygodnym sposobie analizy produktów [12, 31]. Zróżnicowana siła dyskryminacyjna wykorzystywanych markerów molekularnych pozwala wyodrębnić dwie grupy metod: służące do identyfikacji określonego gatunku dermatofitu oraz stosowane do określenia przynależności do grupy dermatofitów lub szerzej, do grzybów chorobotwórczych. Na szczególną uwagę zasługuje ta druga grupa metod, dla których opracowane zostały dedykowane startery określane jako tzw. „pan-dermatofitowe” i „pan-grzybowe” [11, 12]. Pospolicie wykorzystywanymi markerami diagnostycznymi w metodach wykorzystywanych do identyfikacji gatunkowej są sekwencje ITS i 28S rDNA oraz geny kodujące topoisomerazę II i syntazę chityny 1 [27, 29, 31] (Tabela I). W dotychczas opisanych metodach stosuje się zarówno konwencjonalny PCR [5, 8, 9, 12, 40], jak również techniki PCR w czasie rzeczywistym [7, 16, 39, 41]. Większość tych technik została opracowana do identyfikacji dermatofitów, a zaledwie nieliczne umożliwiają diagnostykę drożdży

i NDF jako możliwych czynników zakaźnych [8, 16]. Poniżej przedstawiono krótką charakterystykę najbardziej popularnych technik molekularnej identyfikacji dermatofitów w materiale klinicznym, zaczynając od najtrudniejszego etapu wszystkich analiz DNA w diagnostyce mykologicznej, jakim jest izolacja DNA.

4.1. Izolacja DNA

Ekstrakcja grzybowego DNA z materiału klinicznego jest trudna ze względu na wysoką zawartość keratyny w skórze, włosach i paznokciach, a także unikalną, słabo poddającą się działaniu enzymatycznemu, budowę ściany komórkowej grzybów. W wielu opisanych protokołach izolacji DNA grzybowego, łuski skóry, włosy i paznokcie poddawane są fragmentacji wstępnej za pomocą sterylnych narzędzi chirurgicznych [7, 15, 26, 32, 47, 52, 54]. Alternatywnym sposobem nieenzymatycznego rozwarstwienia próbek skóry, włosów i paznokci jest inkubacja w roztworze Na_2S w temperaturze pokojowej, najczęściej przez okres 1 godziny lub przez całą noc [8, 40, 49]. W tym przypadku możliwe jest pominięcie wstępnego mechanicznego rozdrobnienia materiału. Niemal w każdym opisywanym protokole ekstrakcji DNA z prób mykologicznych zasadniczy etap trawienia materiału wykonywany jest jednak enzymatycznie przy zastosowaniu proteinazy K, z dodatkiem lub bez ditiotreitolu (DTT) jako środka redukującego [1, 5, 6, 17, 32, 38, 41, 42, 53, 54]. Ten właściwy etap trawienia materiału klinicznego przeprowadzany jest w 55°C w czasie od 1 godziny aż po całą noc. W oryginalnych pracach badawczych dotyczących diagnostyki dermato-

Tabela I
Porównanie metod molekularnych opracowanych do bezpośredniej identyfikacji dermatofitów z próbek dermatologicznych

Metody	Liczba przebadanych próbek	Odsetek identyfikacji [%]		Różnica pomiędzy badaniem molekularnym a hodowlanym [%]	Referencja
		w badaniu molekularnym	w badaniu hodowlanym		
Oparte na konwencjonalnym PCR	204	79,9	59,8	20,1	[5]
	230	72	56	16	[9]
	25	100	100	0	[11]
	201	97	81,1	15,9	[15]
	253	50,2	34,4	15,8	[38]
	140	87,3	86,7	0,6	[44]
	219	74	26	48	[45]
Oparte na PCR w czasie rzeczywistym	862	61,0	54,5	6,5	[1]
	92	51,1	33,1	18,0	[2]
	120	61,7	47,5	14,2	[7]
	202	51	39	12	[6]
	311	64,6	43,4	21,2	[41]
	1437	48,5	26,9	18,7	[52]

mykoz, DNA najczęściej ekstrahowany jest z przygotowanych próbek dermatologicznych za pomocą różnych skomercjalizowanych zestawów, ręcznie lub za pomocą robota [6, 43, 54]. Właściwa homogenizacja i trawienie łusek skóry, włosów czy paznokci jest etapem istotnie wpływającym na powodzenie i wydajność całej procedury izolacji DNA grzybowego.

Właściwy etap izolacji DNA polega na jego wytrąceniu z mieszaniny związków uzyskanych z trawienia materiału klinicznego i następnie oczyszczeniu. Dość często, jako najbardziej użyteczna i wydajna metoda ekstrakcji DNA dermatofitów, wymieniana jest metoda z użyciem mieszaniny fenolu, chloroformu i alkoholu izoamylogowego w proporcji 25:24:1 [2, 16, 18, 20–22, 26, 47]. Na podstawie badań własnych [18], autorzy uważają, że metoda ta powinna być stosowana z wyboru do izolacji DNA z czystych kultur dermatofitów. Wydajność techniki nazwanej przez autorów „fenol-chloroform” jest około 39% wyższa niż techniki ekstrakcji DNA z wykorzystaniem CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) i aż 68–85% wyższa niż komercyjnych zestawów oferowanych przez różnych producentów. Zasadniczym minusem, który dyskwalifikuje ją do zastosowania w połączeniu z metodami tzw. szybkiej identyfikacji, jest czas wykonania, który może rozciągnąć się nawet do dwóch dni. Ten czynnik ograniczający wykorzystanie metody „fenol-chloroform” w ekstrakcji DNA z prób dermatologicznych należy wziąć pod uwagę przy rozważaniu rutynowego stosowania w laboratoriach mykologicznych. Alternatywna, bardzo szybka metoda izolacji DNA z materiału klinicznego została opisana przez Brillowską-Dąbrowską i wsp. [10, 11]. Ta zaledwie dwuetapowa i trwająca około 15 minut metoda izolacji grzybowego DNA została opatentowana przez zespół naukowców, a obecnie jest dostępna komercyjnie w zestawie Dermatophyte PCR Kit oferowanym przez SSI Diagnostica (Hillerød, Dania). W skrócie, protokół tej techniki przedstawia się następująco: DNA jest ekstrahowany podczas 10-minutowej inkubacji w 95°C w buforze wykonanym z 60 mM wodorowęglanu sodu (NaHCO₃), 250 mM chlorku potasu (KCl) i 50 mM Tris (pH 9,5), a następnie, za pomocą intensywnego wortekowania z buforem zawierającym 2% albuminy surowicy bydłowej, neutralizowane są wszelkie inhibitory białkowe. Uzyskany w ten sposób supernatant zawierający DNA dermatofitu nie jest oczyszczany, służy natomiast do bezpośredniego zastosowania jako matryca PCR. Niestety, w literaturze naukowej brak jest porównania wydajności tej metody z innymi komercyjnymi zestawami stosowanymi do ekstrakcji DNA z próbek dermatologicznych. Odnosząc się jednak do badań przeprowadzonych przez Gnat i wsp. [18], którzy porównywali wydajność izolacji i czystość preparatów DNA z różnych gatunków dermatofitów po wykonaniu ekstrakcji za pomocą metody „fenol-chloroform”, CTAB i pięciu

zestawów dostępnych komercyjnie, należy przypuszczać, że wydajność tej metody również nie dorówna metodom konwencjonalnym. Ostatecznie, decyzja o wyborze techniki ekstrakcji DNA pozostaje zawsze w gestii diagnosty, który musi odpowiedzieć na pytanie, co jest istotniejsze – czas czy wydajność procedury.

4.2. Techniki bezpośredniej identyfikacji oparte na klasycznym PCR

Z punktu widzenia diagnosty laboratoryjnego, technika identyfikacyjna powinna być przede wszystkim prosta do wykonania i interpretacji. Uważa się, że w dzisiejszych czasach określenie masy molekularnej amplikonu w żelu agarozowym spełnia oba wymienione warunki. Jedną z pierwszych takich metod, opisywana w literaturze, może być wykorzystywana wyłącznie do identyfikacji grupowo-specyficznego czynnika etiologicznego grzybicy [12]. Stosowanie starterów „pan-dermatofitowych” umożliwia uzyskanie produktu PCR o masie 366 bp, który jest uniwersalny dla wszystkich gatunków dermatofitów i pozwala w 100% wykazać w materiale diagnostycznym charakterystyczne dla tej grupy patogenów sekwencje nukleotydowe [12]. Charakterystyczna masa molekularna specyficznych gatunkowo amplikonów ITS jest podstawą identyfikacji *Trichophyton* spp. (302 bp), *M. canis* i *M. audouinii* (279 bp) w metodzie zaproponowanej przez Brillowską-Dąbrowską i wsp. [11]. Prawdopodobnie stosunkowo niska rozdzielczość metody i niewielka, licząca 25 pacjentów, grupa badana jest w tym przypadku powodem 100% korelacji wyników uzyskanych metodami molekularnymi i tradycyjnymi (hodowlanymi). Wysoko oceniana jest także możliwość identyfikacji za pomocą tej metody *M. canis* z sierści zwierząt, zwłaszcza kotów. Powszechnie wiadomo, że zwierzęta te są częstymi nosicielami dermatofitów i stanowią istotne zagrożenie epidemiologiczne dermatomykozami zoolicznymi [21]. Zdecydowanie bardziej specyficzna jest metoda skonstruowana przez Brasch i wsp. [9], która została zaprojektowana do identyfikacji *Trichophyton rubrum* w materiale bezpośrednim. W opisywanym badaniu zostało przebadanych 230 próbek dermatologicznych z paznokci, z których identyfikacja *T. rubrum* zarówno w metodzie PCR jak i hodowli została wykazana w 72% przypadków. Wynik pozytywny testu molekularnego, pomimo braku wzrostu dermatofitów w hodowli, został stwierdzony w 16% próbkach paznokci, podczas gdy dodatnia hodowla, ale ujemny PCR, odnotowano w 9% próbkach. Niestety, w całej publikacji autorzy posługują się jedynie określeniem specyficzne startery (w oryginale „specific primers”), bez podania informacji o właściwym markerze molekularnym, dla którego wspomniane sekwencje starterowe zostały zaprojektowane.

Innymi stosowanymi odmianami technik diagnostycznych, w których identyfikacja grzyba jest możliwa na podstawie określenia masy molekularnej amplikonu, są reakcje „multipleksowe” ze specyficznymi gatunkowo parami starterów w jednej mieszaninie PCR [12, 15, 38]. Dhib i wsp. [15] opisują metodę, w której podstawą identyfikacji *T. rubrum* i *T. interdigitale* są sekwencje ITS i genu syntazy chityny 1. Wykazano, że czułość tej techniki jest wyższa w porównaniu z tradycyjnym badaniem mykologicznym (97% vs. 81,1%), ale w przypadku diagnostyki przeprowadzanej bezpośrednio z materiału klinicznego zasadniczym problemem okazała się, występująca aż w 32,8% próbek, flora mieszana. Metoda zaproponowana przez Mehlig i wsp. [38], przetestowana na 253 próbkach pobranych od ludzi i zwierząt, okazała się przydatna w identyfikacji dermatofitów, *Scopulariopsis brevicaulis* i grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida*. Uzyskane przez autorów wyniki nie różnią się jednak wyraźnie od innych uzyskanych w podobnych badaniach. Mianowicie, w 34,4% próbek wyniki PCR i hodowli określono jako dodatnie, a w 50,2% uzyskano wynik dodatni wyłącznie w oparciu o techniki molekularne. Na uwagę zasługuje fakt wykonania badań z próbek klinicznych pobranych z różnych jednostek chorobowych, takich jak onychomykoza czy też infekcje powierzchniowe błon śluzowych i skóry o innej niż dermatofitowa etiologii. Zastosowanie trzech cykli PCR i trzech specyficznych wobec ITS1, 18S rRNA i 28S rRNA starterów znacznie zwiększa rozdzielczość metody, co zostało opisane w publikacji Kim i wsp. [33]. Multiplex PCR autorzy ci zastosowali do identyfikacji 11 gatunków szczepów referencyjnych dermatofitów, tj. *Epidermophyton floccosum* CBS 358.93, *Microsporium gypseum* IFM 5292, *M. canis* IFM 45829, *M. audouinii* IFM 5294, *M. fulvum* IFM 5318, *Trichophyton violaceum* CBS 319.31, *T. rubrum* KCTC 6375, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* CBS 126.34, *T. tonsurans* CBS 483.76, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* IFM 53931 i *T. verrucosum* CBS 134.66. Jednakże, bezpośrednia identyfikacja gatunkowa w 73 próbkach klinicznych przeprowadzona została jedynie w oparciu o narzędzia biologii molekularnej. Wykryte gatunki: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans* i *M. gypseum* nie zostały potwierdzone jednocześnie metodami hodowlanymi i/lub mikroskopowymi. Wyników podobnych badań w literaturze jest więcej; większość z nich metodą PCR typu duplex identyfikuje *T. rubrum* i wykazuje korelację z wynikami badania hodowlanego, mikroskopowego lub obu jednocześnie [12, 43].

Zwiększanie zdolności rozdzielczej molekularnych metod identyfikacji dermatofitów możliwe jest poprzez zastosowanie zagnieżdżonego („nested”) lub pół-zagnieżdżonego („semi-nested”) PCR [26, 49]. Piri i wsp. [44] opisują metodę nested-PCR z wykorzysta-

niem nowo opracowanej pary starterów ukierunkowanej na sekwencje czynnika elongacji translacji 1- α (Tef-1 α). Technika ta cechuje się wyjątkowo wysoką rozdzielczością i umożliwia identyfikację większości dermatofitów o znaczeniu klinicznym (*Trichophyton simii*, *T. mentagrophytes*, *T. verrucosum*, *T. benhamiae*, *T. equinum*, *M. canis*, *Nannizzia gypsea*, *N. nana*, *N. persicolor*, *N. fulva*, *Arthroderma uncinatum* i *Paraphyton cookei*) bezpośrednio z materiału diagnostycznego. Badania 140 próbek dermatologicznych pobranych od zwierząt wykazały o 11,1% wyższy odsetek dodatnich wyników metodą nested-PCR w porównaniu z hodowlą i bezpośrednim badaniem mikroskopowym oraz wysoką (94,4%) zgodność wyników badania molekularnego i badania mikroskopowego. Autorzy podkreślają również wysoki stopień wiarygodności identyfikacji tą metodą, korelujący w 100% z wynikami sekwencjonowania ITS i ITS-RFLP. W innym badaniu przeprowadzonym przez Wisselinka i wsp. [52], z zastosowaniem starterów „pan-dermatofitowych” oraz metody nested-PCR, pozytywnie zidentyfikowano 48,5% próbek, natomiast w oparciu o hodowle prowadzone na odpowiednich pożywkach zaledwie 26,9%. Należy podkreślić, że metoda nested-PCR ze starterami „pan-dermatofitowymi” umożliwiającą identyfikację 12 gatunków dermatofitów, jest również znacznie czulsza niż porównywalne techniki z wykorzystaniem konwencjonalnego PCR. Pomimo pewnych ograniczeń związanych ze zwiększeniem liczby manipulacji koniecznych do wykonania, ryzykiem zanieczyszczenia produktów PCR i wydłużonym czasem diagnostyki, metody nested-PCR są metodami o wysokiej zdolności rozdzielczej w identyfikacji dermatofitów i mogą być stosowane w diagnostyce bezpośredniej.

W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat do coraz powszechniejszego wykorzystania w diagnostyce grzybic bezpośrednio z próbek klinicznych, szczególnie paznokci, weszła metoda polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP, restriction fragment length polymorphism). Technika ta została wykorzystana do identyfikacji *Trichophyton* spp., *Fusarium* spp. i *Aspergillus* spp. w onychomykozach [8, 40]. Identyfikacja gatunków w materiale bezpośrednim z infekcji powierzchniowych jest możliwa dzięki porównywaniu profili elektroforetycznych żeli agarozowych izolatów klinicznych i gatunków referencyjnych dermatofitów, jak również szczepów grzybów należących do grupy NDF. Technika PCR-RFLP zapewnia znaczącą poprawę wiarygodności identyfikacji w porównaniu z wynikami uzyskanymi w oparciu o tradycyjne metody hodowlane [8]. Po pierwsze, uzyskane za pomocą tej techniki wyniki umożliwiają identyfikację i różnicowanie dermatofitów od NDF, a także od szczepów pochodzących z kontaminacji. Fakt ten jest szczególnie istotny, ponieważ pleśnie powodujące grzybicę paznokci nie

reagują na niektóre leki przeciwgrzybicze stosowane rutynowo u pacjentów z dermatomykozami [8]. Po drugie, możliwe stało się zidentyfikowanie czynnika zakaźnego w sytuacji, gdy bezpośrednio badanie mykologiczne próbek pobranych ze zmienionych chorobowo paznokci uwidacznia elementy grzybowe, ale wyniki badania hodowlanego są negatywne [40]. Alternatywnie do analizy zróżnicowania profili elektroforetycznych RFLP w identyfikacji grzybów powodujących onychomykozy wskazywane jest sekwencjonowanie amplikonu wybranego genu markerowego charakterystycznego dla dermatofitów i NDF [40, 49]. Niestety, podobnie jak metoda RFLP, także sekwencjonowanie amplikonów jest nieużyteczne w infekcjach mieszanych, o niejednoznacznej etiologii [51]. Ograniczenie to odnosi się nie tylko do onychomykoz, ale również do innych typów dermatomykoz, w przypadku których z jednego ogniska chorobowego można izolować więcej niż jeden gatunek [21]. Pomimo przebadania wielu genów markerowych grzybów, uzyskanie specyficznego gatunkowo amplikonu i jego sekwencjonowanie okazało się również niewystarczające do bezpośredniej identyfikacji dermatofitów z próbek klinicznych *tinea capitis* i *tinea corporis* u ludzi i zwierząt [20, 21, 48].

Verrier i wsp. [51] proponują zastosowanie techniki polimorfizmu długości terminalnych fragmentów restrykcyjnych (TRFLP, terminal restriction length polymorphism) znakowanego 5'-końca sekwencji 28S rDNA. Technika ta jest szczególnie przydatna w identyfikacji dermatofitów z rodzaju *Trichophyton* (szczególnie *T. rubrum* i *T. interdigitale*) oraz 12 gatunków z grupy NDF (*Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Aspergillus versicolor*, *A. flavus*, *Alternaria* spp., *Acremonium alternatum*, *A. strictum*, *Candida parapsilosis*, *C. albicans*, *Penicillium citrinum* i *Scopulariopsis brevicaulis*), które często są izolowane z mieszanych infekcji powierzchniowych. Technika ta stała się wyjątkowo użyteczna w identyfikacji grzybów w zakażeniach mieszanych, które stanowią nawet do 10% wszystkich infekcji grzybiczych [51]. Co więcej, wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że za pomocą TRFLP można wiarygodnie zidentyfikować grzyby w 74% (162/219) przypadków dermatomykoz, w których wyniki hodowli są ujemne [48]. TRFLP to technika „odcisków palców DNA” pierwotnie wykorzystywana do określania zróżnicowania mikrobiologicznego w różnych niszach ekologicznych, takich jak gleba i woda [14, 35, 52]. W medycynie technika znalazła zastosowanie do charakterystyki mikrobioty jamy ustnej w ślinie u osób zdrowych i pacjentów z zapaleniem przyzębia [52]. Niewątpliwą zaletą techniki TRFLP stanowi zautomatyzowany system interpretacji wyników, co przekonuje diagnostów, aby posługiwać się tą metodą z wyboru w przypadku dużej liczby próbek klinicznych wymagających opracowania.

Metodą służącą do bezpośredniej identyfikacji czynników etiologicznych infekcji dermatofitowych w próbkach skóry i paznokci, odznaczającą się znacznie wyższą czułością jest technika PCR-ELISA (PCR-enzyme-linked immunosorbent assay) [5]. Metoda PCR-ELISA z sondami znakowanymi biotyną pozwala na czułą i swoistą identyfikację pięciu najczęściej izolowanych gatunków dermatofitów – *Trichophyton rubrum*, *T. interdigitale*, *T. violaceum*, *Microsporum canis* i *Epidermophyton floccosum*. Markerem identyfikacyjnym w tej metodzie jest gen topoizomerazy II, amplifikowany przy użyciu starterów znakowanych digoksygeniną, a następnie hybrydyzowany z 5'-biotynylowanymi sondami oligonukleotydowymi specyficznymi dla gatunku. Detekcja gatunkowo-specyficznych hybryd odbywa się w mikrostudzienkach powleczonych streptawidyną, z zastosowaniem przeciwciał przeciw peroksydazie chranowej i substratu peroksydazy. Beifus i wsp. [5] korzystając z metody PCR-ELISA dokonali identyfikacji jednego z pięciu wymienionych gatunków dermatofitów w 163 z 204 (79,9%) próbkach klinicznych od ludzi, które zostały uznane za dodatnie w mikroskopowym badaniu bezpośrednim. W tym samym czasie wzrost dermatofitów w hodowli został wykazany w 59,8% przypadków. Ci sami autorzy stwierdzają ponadto, że czułość techniki PCR-ELISA jest 10-krotnie wyższa niż innych bezpośrednich metod identyfikacji grzybów opartych na PCR, a dodatkową zaletą tej metody jest uzyskanie wyniku w przeciągu 24 godzin. Przez pewien czas na rynku dostępny był komercyjny zestaw PCR-ELISA (Onychodiag, BioAdvance, Francja), ale został wycofany ze względu na niewielkie zainteresowanie [3, 50]. Prawdopodobnej przyczyny upatruje się w zbyt wielu manipulacjach koniecznych przy obróbce materiału w porównaniu z innymi metodami PCR wykorzystywanymi do bezpośredniej identyfikacji grzybów, które spowodowały, że technika ta nie stała się przedmiotem rzeczywistego zainteresowania i rutynowego stosowania.

4.3. Techniki bezpośredniej identyfikacji oparte na PCR w czasie rzeczywistym

Zaletą technik diagnostycznych opartych na PCR w czasie rzeczywistym (real time PCR) jest automatyzacja interpretacji uzyskiwanych wyników, która znacząco zmniejsza ryzyko zanieczyszczenia prób w trakcie analiz wykonywanych po klasycznym PCR. Wykorzystanie do identyfikacji gatunkowej grzybów testów PCR w czasie rzeczywistym ze starterami ukierunkowanymi na sekwencję ITS2 rDNA po raz pierwszy opisuje Alexander i wsp. [1]. Wysoka czułość i swoistość opracowanej metody została wykazana w badaniu klinicznym, w którym analizie poddano 862 próbki zeszkrobów paznokci z dermatomykozą o etiologii mieszanej. W badaniu opartym o tradycyjne hodowle uzyskano obfity wzrost

grzybów z grupy NDF, które to grzyby uniemożliwiają izolację i identyfikację dermatofitów w większości przypadków klinicznych. Podkreśla to przydatność tej techniki w diagnostyce różnicującej *T. rubrum* od innych grzybów potencjalnie zanieczyszczających materiał biologiczny, które mogą bytować jako komensale lub oportuniści w płytkach paznokci zainfekowanych przez dermatofity. Inną metodę przeznaczoną do gatunkowej identyfikacji *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* i innych grzybów, także NDF, opartą o PCR w czasie rzeczywistym proponują Miyajma i wsp. [39]. W swoich badaniach wykazują przydatność dwóch zestawów starterów, bazujących na sekwencji ITS1 rDNA i trzech sond fluorescencyjnych, które różnią się miejscami wiązania do sekwencji ITS1. Jedna z nich pozwala diagnozować obecność w materiale dermatologicznym grzybów patogennych, a dwie pozostałe wiążą specyficzne gatunkowo miejsca sekwencji ITS, umożliwiając identyfikację *T. rubrum* i *T. mentagrophytes*. Uzyskane wyniki są wysoce powtarzalne, a ich zgodność z dodatnią hodowlą kształtuje się na poziomie 45,2%. Całkowity czas wymagany do identyfikacji grzybów z próbki klinicznej w tej metodzie badacze określają na około 3 godziny, po jednej godzinie na przygotowanie DNA z próbek klinicznych, nastawienie PCR i czas trwania cyklu reakcji.

Identyfikację aż 11 gatunków dermatofitów (*M. canis* complex, *M. audouinii*, *T. rubrum*, *T. violaceum*, *T. verrucosum*, *T. erinacei*, *T. concentricum*, *T. mentagrophytes* complex, *T. tonsurans* i *E. floccosum*) umożliwia jedno-probówkowa metoda analizy krzywej topnienia PCR w czasie rzeczywistym oparta o sekwencje ITS1 rDNA i 5.8S rRNA skonstruowana przez Bergmansa i wsp. [7]. W oparciu o tą technikę uzyskano znacznie więcej dodatnich wyników identyfikacji dermatofitów niż w metodach konwencjonalnych (61,7% vs. 47,5%). Identyfikacja na poziomie gatunku za pomocą tej metody okazała się możliwa we wszystkich próbkach dermatologicznych określonych jako pozytywne, podczas gdy tylko w 45 z nich udało się uzyskać dodatni wynik hodowli. Autorzy podają, że czas uzyskania wyniku identyfikacji wynosi 4 godziny; należy jednak doliczyć konieczność wstępnej całkowitej lizy materiału przeznaczonego do diagnostyki. Tak wysokiej zdolności rozdzielczej metod molekularnych opartych o PCR w czasie rzeczywistym nie potwierdzają wyniki badania klinicznego przeprowadzonego przez zespół A. Bergmana w 2013 roku [6]. Łącznie 202 próbki kliniczne pochodzące od ludzi poddawano analizom zarówno technikami konwencjonalnymi jak i technikę PCR opartą o zautomatyzowaną ekstrakcję DNA i sekwencję genu syntazy chitynowej 1. W 103 (51%) próbkach zidentyfikowano materiał genetyczny dermatofitów, natomiast dodatnie hodowle wykazało 79 (39%). Spośród 103 pozytywnych próbek, w 94 (91%) został zidentyfikowany *T. rubrum*, a w 8 (8%) – *T. inter-*

digitale. Opisana metoda w porównaniu z konwencjonalnymi metodami hodowlanymi okazała się niewiele czulsza (51% vs. 39%), a jej zdolność dyskryminacyjna jest wystarczająca do identyfikacji tylko dwóch gatunków – *T. rubrum* i *T. interdigitale* [6]. Przyczyny takiego stanu można upatrywać w zbyt niskiej rozdzielczości zastosowanego markera molekularnego. Niewątpliwą zaletą przedstawionej metody jest jednak jej automatyzacja i ograniczenie do minimum manualnego przygotowywania materiału diagnostycznego.

Wnioski z tych badań wskazują, że lepszym celem identyfikacyjnym w bezpośredniej identyfikacji dermatofitów z zastosowaniem PCR w czasie rzeczywistym są sekwencje ITS1 rDNA i 5.8S rRNA niż gen syntazy chitynowej 1. Ohst i wsp. [41] bazując na dwóch pierwszych wymienionych markerach molekularnych proponują metodę, której zdolność dyskryminacyjna umożliwia identyfikację pięciu gatunków dermatofitów (*T. interdigitale*, *T. violaceum*, *T. verrucosum*, *E. floccosum* oraz *T. rubrum*) i czterech kompleksów gatunków (*M. canis* complex, obejmujący *M. canis*, *M. ferrugineum* oraz *M. audouinii*; *T. tonsurans* complex, obejmujący *T. tonsurans* oraz *T. equinum*; *A. benhamiae* complex, obejmujący *A. benhamiae*, *T. erinacei* oraz *T. concentricum*; *T. schöenleinii* complex, obejmujący *T. schöenleinii*, *A. simii* oraz *T. mentagrophytes*) dermatofitów. Wysoki odsetek uzyskanych przez autorów wyników pozytywnych w opisywanej metodzie (64,6%) w porównaniu z innymi publikacjami jest najprawdopodobniej spowodowany wstępnym wyborem prób do badań, pochodzących w 30% z przypadków określonych jako pozytywne w badaniu mikroskopowym. Stąd zapewne wynika zalecenie wstępne podane przez autorów, które wskazuje wykonanie konwencjonalnego PCR ze starterami „pan-dermatofitowymi” w celu identyfikacji materiału genetycznego dermatofita w materiale diagnostycznym i ograniczenie dalszej diagnostyki wyłącznie do prób pozytywnych w tym teście. Spośród innych metod PCR w czasie rzeczywistym warto wymienić metodę opracowaną przez Wisselinka i wsp. [52], która umożliwia identyfikację sześciu gatunków dermatofitów w dwóch reakcjach multipleksowych. Istotne wskazywane wady tej metody to brak możliwości identyfikacji antropofilnego, często izolowanego dermatofita *E. floccosum* i zoofilnego – *T. verrucosum*, a także gatunków wchodzących w skład kompleksu *A. benhamiae*.

5. Wybór optymalnej metody do stosowania rutynowego

Wybór optymalnej metody molekularnej do analizy próbek dermatologicznych uzależniony jest od wielu czynników, przede wszystkim od zakładanego czasu niezbędnego do uzyskania wyników, w tym ważną rolę

odgrywa czas spędzony praktycznie w laboratorium podczas przygotowywania prób i wykonywania analiz, kosztów odczynników i dostępnej aparatury badawczej, jak również znaczenia identyfikacji NDF w materiale. Ostatni z wymienionych argumentów odnosi się szczególnie do przypadków diagnostyki onychomykoz. Spośród wielu opisanych molekularnych metod identyfikacji dermatofitów i NDF, niewiele zostało przetestowanych na większej liczbie ($N > 100$) prób klinicznych (Tabela I). Zasadniczo, nie wiadomo, które techniki są stosowane rutynowo, a które z nich pozostały jedynie na etapie badań wstępnych lub były stosowane tylko w konkretnym badaniu klinicznym. Ponadto, jak dotąd nie ma również logicznego wyjaśnienia faktu tak dużej liczby fałszywych wyników dodatnich uzyskiwanych w metodach molekularnych w porównaniu z badaniem hodowlanym [50]. Być może wyjaśnieniem jest niska wrażliwość metod hodowlanych, niemniej jednak brakuje wiarygodnych dowodów empirycznych na potwierdzenie tych sugestii.

Implementacja do laboratoriów mykologicznych technik molekularnych wydaje się kusząca z uwagi na łatwość wykonywania analiz i szybkość otrzymywania wyników, ale w praktyce nadal pozostaje nieosiągalna ze względu na niejednorodność próbek dermatologicznych. Skłania to do refleksji, czy techniki molekularne mogą całkowicie zastąpić konwencjonalną diagnostykę mykologiczną. Na obecnym etapie rozwoju metod PCR opracowanych do identyfikacji dermatofitów, zasadnym wydaje się przeprowadzanie standardowego badania mikroskopowego i hodowli na odpowiednich pożywkach, których wyniki dodatkowo są weryfikowane metodami molekularnymi. Z drugiej strony, szybkie i metodycznie proste techniki PCR pozwalają na przeprowadzanie wstępnej diagnostyki już przez lekarzy dermatologów, zanim materiał dotrze do laboratorium w celu wykonania pełnej procedury diagnostycznej. Rozstrzygnięcie tych dylematów pozostaje istotnym tematem do dyskusji w środowisku mikrobiologów. Niewątpliwie, w tym aspekcie dalszych prac wymaga optymalizacja warunków analiz i interpretacji wyników. Ważne zadanie zajmuje również edukacja klinicystów dotycząca prawidłowego pobierania i transportu próbek do laboratorium, ponieważ już na tym pierwszym etapie dochodzi do wielu błędów, skutkujących całkowitym brakiem wyniku identyfikacyjnego lub jego niską wiarygodnością.

6. Zalety i wady molekularnych metod identyfikacyjnych stosowanych w mykologii

Odnoszenie się z uprzedzeniem i punktowanie wyłącznie ograniczeń metod molekularnych stosowanych w identyfikacji dermatofitów jest z pewnością

nieobiektywne. Pomimo pewnych wątpliwości dotyczących wiarygodności wyników diagnostycznych uzyskanych tymi metodami, które pochodzą z danych statystycznych badań klinicznych, wielu autorów, jako główną zaletę wskazuje ich wysoką czułość [39, 50, 53]. Identyfikacja czynnika zakaźnego z wykorzystaniem PCR jest możliwa w większości przypadków, w których uzyskano negatywne wyniki hodowli grzybów, ale bezpośrednie badanie mykologiczne wskazuje na obecność artrospor. Z drugiej strony, niemal wszystkie zidentyfikowane morfologicznie grzyby zostały również rozpoznane molekularnie, szczególnie dotyczy to *T. rubrum* i *T. interdigitale* [39, 48, 50]. Na uwagę zasługuje fakt, że po raz pierwszy potwierdzono metodami molekularnymi, że czynnikiem etiologicznym onychomykozy mogą być grzyby pleśniowe, takie jak *Fusarium* spp., *Acremonium* spp., *Aspergillus* spp. i *Scopulariopsis* spp., które dotychczas nie były dostrzegane i uważane za kontaminację próbek dermatologicznych przesyłanych do laboratorium [37, 46, 50].

Wszystkie metody molekularne łączy jeszcze jedna zaleta, jaką jest czas niezbędny do uzyskania wyniku identyfikacji czynnika etiologicznego dermatomykozy [50]. Wynik ten można uzyskać w dniu, w którym próbka dociera do laboratorium lub następnego dnia, podczas gdy hodowla grzybów może trwać nawet 1–3 tygodni [11, 18]. Najkrótszy czas wynoszący 3 godziny od dostarczenia materiału do uzyskania wyniku podawany jest przez Miyajma i wsp. [39]. Warto więc rozważyć także praktyczną użyteczność tej cechy analiz molekularnych. Dermatomykozy nie są jednostkami chorobowymi wymagającymi natychmiastowego rozpoczęcia leczenia celowanego, a miejscowe środki przeciwgrzybicze mogą być zalecane na podstawie wyników bezpośredniego badania mykologicznego, które trwa do 20 minut. Niemniej jednak, czas uzyskania wyniku diagnostycznego jest ważny, a zwolennicy nowoczesnych sposobów kontaktu z pacjentem mogą podać argument, że zarówno wynik identyfikacji jak i receptę można wystawić elektronicznie, bez ponownej wizyty pacjenta w szpitalu bądź gabinecie lekarskim. Pozostaje do rozważenia jedynie kwestia ekonomii analiz molekularnych pojedynczych próbek dermatologicznych. Zwykle przypadki dermatomykoz nie są na tyle częste, aby w ciągu jednego dnia do laboratorium dostarczano materiał od kilku pacjentów. Pewien kompromis między czasem a kosztami wykonywania identyfikacji można uzyskać poprzez wprowadzenie systemu grupowania prób, które mogą być poddawane analizie co kilka dni.

Najpoważniejszym ograniczeniem rutynowego stosowania metod molekularnych w identyfikacji dermatofitów jest rodzaj i ilość materiału dermatologicznego. Chociaż pospolicie uważa się, że czułość technik opartych o PCR jest bardzo wysoka i nawet niewielkie ilości DNA wystarczają do ich przeprowadzenia,

w diagnostyce dermatomykoz ta zasada nie sprawdza się. Nawet stosunkowo duża próbka łusek skóry, fragmentów włosów lub zeszkobin paznokci może nie odzwierciedlać faktycznej zawartości elementów grzybni w poddanym badaniu materiale biologicznym. Wielu autorów zauważa, że sukces w identyfikacji dermatofitu z zastosowaniem technik PCR jest wprost proporcjonalny do liczby elementów grzybni widocznych w preparacie bezpośrednim z materiału klinicznego [48, 50]. Uwagę należy zwrócić również na wysoki stopień zróżnicowania mikrobiologicznego materiału. Szczególnie dotyczy to zeszkobin paznokci, co wręcz wyklucza możliwość stosowania technik jednoetapowych z automatyczną detekcją wyników [47, 48, 50]. Dodatkowo, oczekiwane wyniki identyfikacji grzybów w dermatomykozach skóry i włosów różnią się od uzyskiwanych w onychomykozach [7]. W pierwszym przypadku czynnikiem etiologicznym jest jeden gatunek dermatofitu spośród kilkunastu-kilkudziesięciu, w drugim jest to najczęściej *T. rubrum* i *T. interdigitale* lub w rzadkich przypadkach inne gatunki antropofilne, takie jak *T. soudanense*, jak również czynnikiem etiologicznym może być grzyb z grupy NDF [3]. Trzeba też zdawać sobie sprawę z istnienia bezobjawowych nosicieli grzybów, co dotyczy nawet *T. rubrum* [36]. Istotne w diagnostyce są również objawy kliniczne i stopień ich nasilenia, a znajomość historii choroby i otoczenia pacjenta, przede wszystkim czy jest on właścicielem zwierząt lub czy zawodowo związany jest z ich hodowlą, mogą ukierunkować dalszą identyfikację. Z tego powodu diagnostyka dermatomykoz powinna być wielokierunkowa, oparta na obserwacji objawów klinicznych i wynikach bezpośredniego badania mykologicznego, hodowli oraz technik molekularnych.

Osobną kwestią wpływającą na wiarygodność wyników identyfikacji dermatofitów technikami molekularnymi jest ryzyko kontaminacji próbek dermatologicznych. Każdy diagnosta zdaje sobie sprawę z możliwego ryzyka zanieczyszczenia w laboratorium, skutkującego fałszywie dodatnimi wynikami. W tym aspekcie istotne jest też właściwe przygotowanie i dezynfekcja miejsca pobierania próbek przed i po każdym pacjencie. Szczególne środki ostrożności są stosowane, gdy metody identyfikacji obejmują dodatkowe manipulacje z produktami PCR, zwłaszcza, gdy amplikon jest ponownie powielany w „nested” lub „semi-nested” PCR [45, 49, 53]. Rygorystyczne przestrzeganie zasad obowiązujących w laboratorium biologii molekularnej zobowiązuje do tego, aby wszelkie manipulacje z produktami PCR przeprowadzać w oddzielnym pomieszczeniu niż to, w którym wykonuje się wstępne etapy, takie jak pobieranie materiału diagnostycznego [50]. Ryzyko kontaminacji jest ograniczone przy identyfikacji za pomocą metod PCR w czasie rzeczywistym i automatycznych systemach interpretacji wyników [7, 39].

7. Podsumowanie

Metody molekularne identyfikacji czynników etiologicznych dermatomykoz w próbkach dermatologicznych są zdecydowanie atrakcyjne i mają wiele zalet. Obecnie, niewiele jest laboratoriów mykologicznych wykorzystujących te techniki w rutynowej diagnostyce, a te z nich, które posługują się nimi, są pionierami. Stanowisko mikrobiologów jest jasne, czas, kiedy diagnostyka molekularna zastąpi konwencjonalne techniki oparte na hodowli dermatofitów i ocenie ich morfologii nieubłaganie nadchodzi. W chwili obecnej ważne jest, aby doświadczenie zdobyte w laboratoriach pionierskich stało się szeroko udostępniane, a zdolność rozdzielnia nowo opracowywanych, wiarygodnych, szybkich i tanich metod molekularnych nie ograniczała się do identyfikacji kilku gatunków.

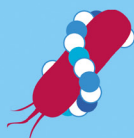
Piśmiennictwo

- Alexander C.L., Shankland G.S., Carman W., Williams C.: Introduction of a dermatophyte polymerase chain reaction assay to the diagnostic mycology service in Scotland. *Br. J. Dermatol.* **164**, 966–972 (2011)
- Arabatzis M., Bruijnesteijn van Coppenraet L.E.S., Kuijper E.J., de Hoog G.S., Lavrijsen A.P.M., Templeton K., van der Raaij-Helmer E.M.H., Velegaki A., Graser Y., Summerbell R.C.: Diagnosis of common dermatophyte infections by a novel multiplex real-time polymerase chain reaction detection/identification scheme. *Br. J. Dermatol.* **157**, 681–689 (2007)
- Baudraz-Rosselet F., Ruffieux C., Lurati M., Bontems O., Monod M.: Onychomycosis insensitive to systemic terbinafine and azole treatments reveals non-dermatophyte moulds as infectious agents. *Dermatology*, **220**, 164–168 (2010)
- Beguín H., Pyck N., Hendrickx M., Planard C., Stubbe D., Detandt M.: The taxonomic status of *Trichophyton quinckeanum* and *T. interdigitale* revisited: a multigene phylogenetic approach. *Med. Mycol.* **50**, 871–882 (2012)
- Beifuss B., Bezold G., Gottlober P., Borelli C., Wagener J., Schaller M., Korting H.C.: Direct detection of five common dermatophyte species in clinical samples using a rapid and sensitive 24-h PCR-ELISA technique open to protocol transfer. *Mycoses*, **54**, 137–145 (2011)
- Bergman A., Heimer D., Kondori N., Enroth H.: Fast and specific dermatophyte detection by automated DNA extraction and real-time PCR. *Clin. Microbiol. Infect.* **19**, E205–11 (2013)
- Bergmans A.M.C., van der Ent M., Klaassen A., Bohm N., Andriess G.I., Wintermans R.G.F.: Evaluation of a single-tube real-time PCR for detection and identification of 11 dermatophyte species in clinical material. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**, 704–710 (2010)
- Bontems O., Hauser P.M., Monod M.: Evaluation of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay for dermatophyte and nondermatophyte identification in onychomycosis. *Br. J. Dermatol.* **161**, 791–796 (2009)
- Brasch J., Beck-Jendroschek V., Glaser R.: Fast and sensitive detection of *Trichophyton rubrum* in superficial tinea and onychomycosis by use of a direct polymerase chain reaction assay. *Mycoses*, **54**, e313–7 (2011)

10. Brillowska-Dabrowska A., Michalek E., Saunte D.M.L., Nielsen S.S., Arendrup M.C.: PCR test for *Microsporium canis* identification. *Med. Mycol.* **51**, 576–579 (2013)
11. Brillowska-Dabrowska A., Nielsen S.S., Nielsen H.V., Arendrup M.C.: Diagnostic PCR tests for *Microsporium audouinii*, *M. canis* and *Trichophyton infections*. *Med. Mycol.* **48**, 486–490 (2010)
12. Brillowska-Dabrowska A., Saunte D.M., Arendrup M.C.: Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum*. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 1200–1204 (2007)
13. Chollet A., Cattin V., Fratti M., Mignon B., Monod M.: Which Fungus Originally was *Trichophyton mentagrophytes*? Historical Review and Illustration by a Clinical Case. *Mycopathologia*, **180**, 1–5 (2015)
14. Derakshani M., Lukow T., Liesack W.: Novel bacterial lineages at the (sub)division level as detected by signature nucleotide-targeted recovery of 16S rRNA genes from bulk soil and rice roots of flooded rice microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 623–631 (2001)
15. Dhib I., Fathallah A., Yaacoub A., Hadj Slama F., Said M.B., Zemni R.: Multiplex PCR assay for the detection of common dermatophyte nail infections. *Mycoses*, **57**, 19–26 (2014)
16. Ebihara M., Makimura K., Sato K., Abe S., Tsuboi R.: Molecular detection of dermatophytes and nondermatophytes in onychomycosis by nested polymerase chain reaction based on 28S ribosomal RNA gene sequences. *Br. J. Dermatol.* **161**, 1038–1044 (2009)
17. Elavarashi E., Kindo A.J., Kalyani J.: Optimization of PCR-RFLP Directly from the Skin and Nails in Cases of Dermatophytosis, Targeting the ITS and the 18S Ribosomal DNA Regions. *J. Clin. Diagn. Res.* **7**, 646–651 (2013)
18. Gnat S., Nowakiewicz A., Ziółkowska G., Trościańczyk A., Majer-Dziedzic B., Zięba P.: Evaluation of growth conditions and DNA extraction techniques used in the molecular analysis of dermatophytes. *J. Appl. Microbiol.* **122**, 1368–1379 (2017)
19. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Zieba P.: Phenotypic characterization of enzymatic activity of clinical dermatophyte isolates from animals with and without skin lesions and humans. *J. Appl. Microbiol.* **125**, 700–709 (2018)
20. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Trościańczyk A., Zięba P.: Infection of *Trichophyton verrucosum* in cattle breeders, Poland: A 40-year retrospective study on the genomic variability of strains. *Mycoses*, **61**, 681–690 (2018)
21. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Zieba P.: *Tinea corporis* by *Microsporium canis* in mycological laboratory staff: Unexpected results of epidemiological investigation. *Mycoses*, **61**, 945–953 (2018)
22. Gnat S., Nowakiewicz A., Łagowski D., Trościańczyk A., Zieba P.: Multiple-strain *Trichophyton mentagrophytes* infection in a silver fox (*Vulpes vulpes*) from a breeding farm. *Med. Mycol.* **57**, 171–180 (2019)
23. Gnat S., Nowakiewicz A., Zięba P.: Taksonomia dermatofitów – systemy klasyfikacyjne się zmieniają, problemy identyfikacyjne pozostają te same. *Post. Mikrobiol.* **58**, 49–58 (2019)
24. Graser Y., El Fari M., Vilgalys R., Kuijpers A.F., De Hoog G.S., Presber W., Tietz H.: Phylogeny and taxonomy of the family *Arthrodermataceae* (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region. *Med. Mycol.* **37**, 105–114 (1999)
25. Graser Y., Kuijpers A.F., Presber W., De Hoog G.S.: Molecular taxonomy of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. tonsurans*. *Med. Mycol.* **37**, 315–330 (1999)
26. Gupta M., Sharma N.L., Kanga A.K., Mahajan V.K., Tegta G.R.: Onychomycosis: Clinico-mycologic study of 130 patients from Himachal Pradesh, India. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* **73**, 389–392 (2007)
27. Hirai A., Kano R., Nakamura Y., Watanabe S., Hasegawa A.: Molecular taxonomy of dermatophytes and related fungi by chitin synthase I (CHS1) gene sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **83**, 11–20 (2003)
28. de Hoog G.S., Dukik K., Monod M., Packeu A., Stubbe D., Hendrickx M., Kupsch C., Stielow J.B., Freeke J., Goker M., Rezaei-Matehkolaei A., Mirhendi H., Graser Y.: Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. *Mycopathologia*, **182**, 5–31 (2017)
29. Kanbe T., Suzuki Y., Kamiya A., Mochizuki T., Fujihira M., Kikuchi A.: PCR-based identification of common dermatophyte species using primer sets specific for the DNA topoisomerase II genes. *J. Dermatol. Sci.* **32**, 151–161 (2003)
30. Kanbe T., Suzuki Y., Kamiya A., Mochizuki T., Kawasaki M., Fujihira M., Kikuchi A.: Species-identification of dermatophytes *Trichophyton*, *Microsporium* and *Epidermophyton* by PCR and PCR-RFLP targeting of the DNA topoisomerase II genes. *J. Dermatol. Sci.* **33**, 41–54 (2003)
31. Kano R., Hirai A., Muramatsu M., Watari T., Hasegawa A.: Direct detection of dermatophytes in skin samples based on sequences of the chitin synthase I (CHS1) gene. *J. Vet. Med. Sci.* **65**, 267–270 (2003)
32. Kardjeva V., Summerbell R., Kantardjiev T., Devliotou-Panagiotidou D., Sotiriou E., Graser Y.: Forty-eight-hour diagnosis of onychomycosis with subtyping of *Trichophyton rubrum* strains. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 1419–1427 (2006)
33. Kim J.Y., Choe Y.B., Ahn K.J., Lee Y.W.: Identification of dermatophytes using multiplex polymerase chain reaction. *Ann. Dermatol.* **23**, 304–312 (2011)
34. Kondori N., Abrahamsson A.L., Ataollahy N., Wenneras C.: Comparison of a new commercial test, Dermatophyte-PCR kit, with conventional methods for rapid detection and identification of *Trichophyton rubrum* in nail specimens. *Med. Mycol.* **48**, 1005–1008 (2010)
35. Lee H.K., Kim H.R., Mengoni A., Lee D.H.: Modified T-RFLP methods for taxonomic interpretation of T-RF. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 624–630 (2008)
36. Łagowski D., Gnat S., Nowakiewicz A., Osińska M., Zięba P.: Prewalencja symptomatycznych dermatofitów u psów i kotów oraz mechanizm infekcji dermatofitowych. *Post. Mikrobiol.* **58**, 165–176 (2019)
37. Macura B., Skóra M.: 21-year retrospective study of the prevalence of *Scopulariopsis brevicaulis* in patients suspected of superficial mycoses. *Post. Dermatol. Alergol.* **32**, 189–194 (2015)
38. Mehlig L., Garve C., Ritschel A., Zeiler A., Brabetz W., Weber C., Bauer A.: Clinical evaluation of a novel commercial multiplex-based PCR diagnostic test for differential diagnosis of dermatomycoses. *Mycoses*, **57**, 27–34 (2014)
39. Miyajima Y., Satoh K., Uchida T., Yamada T., Abe M., Watanabe S. ichi, Makimura M., Makimura K.: Rapid real-time diagnostic PCR for *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* in patients with tinea unguium and tinea pedis using specific fluorescent probes. *J. Dermatol. Sci.* **69**, 229–235 (2013)
40. Monod M., Bontems O., Zaugg C., Lechenne B., Fratti M., Panizzon R.: Fast and reliable PCR/sequencing/RFLP assay for identification of fungi in onychomycoses. *J. Med. Microbiol.* **55**, 1211–1216 (2006)
41. Ohst T., Kupsch C., Graser Y.: Detection of common dermatophytes in clinical specimens using a simple quantitative real-time TaqMan polymerase chain reaction assay. *Br. J. Dermatol.* **174**, 602–609 (2016)
42. Pankewitz F., Nenoff P., Uhrlass S., Bezold G., Winter I., Graser Y.: Development of a novel polymerase chain reaction-

- enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Trichophyton rubrum* onychomycosis. *Br. J. Dermatol.* **168**, 1236–1242 (2013)
43. Paugam A., Lollivier C., Viguie C., Anaya L., Mary C., de Ponthilly G., Ranque S.: Comparison of real-time PCR with conventional methods to detect dermatophytes in samples from patients with suspected dermatophytosis. *J. Microbiol. Methods*, **95**, 218–222 (2013)
44. Piri F., Zarei Mahmoudabadi A., Ronagh A., Ahmadi B., Makimura K., Rezaei-Matehkolaei A.: Assessment of a pan-dermatophyte nested-PCR compared with conventional methods for direct detection and identification of dermatophytosis agents in animals. *Mycoses*, **61**, 837–844 (2018)
45. Sakamoto M., Takeuchi Y., Umeda M., Ishikawa I., Benno Y.: Application of terminal RFLP analysis to characterize oral bacterial flora in saliva of healthy subjects and patients with periodontitis. *J. Med. Microbiol.* **52**, 79–89 (2003)
46. Skora M., Bielecki J., Bulanda M., Macura A., Jagielski T.: Grzyby z rodzaju *Scopulariopsis* – mało znane patogeny człowieka. *Post. Mikrobiol.* **54**, 44–52 (2015)
47. Uchida T., Makimura K., Ishihara K., Goto H., Tajiri Y., Okuma M., Fujisaki R., Uchida K., Abe S., Iijima M.: Comparative study of direct polymerase chain reaction, microscopic examination and culture-based morphological methods for detection and identification of dermatophytes in nail and skin samples. *J. Dermatol.* **36**, 202–208 (2009)
48. Verrier J., Krahenbuhl L., Bontems O., Fratti M., Salamin K., Monod M.: Dermatophyte identification in skin and hair samples using a simple and reliable nested polymerase chain reaction assay. *Br. J. Dermatol.* **168**, 295–301 (2013)
49. Verrier J., Monod M.: Diagnosis of dermatophytosis using molecular biology. *Mycopathologia*, **182**, 193–202 (2017)
50. Verrier J., Pronina M., Peter C., Bontems O., Fratti M., Salamin K., Schurch S., Gindro K., Wolfender J.L., Harshman K., Monod M.: Identification of infectious agents in onychomycoses by PCR-terminal restriction fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 553–561 (2012)
51. Vinten A.J.A., Artz R.R.E., Thomas N., Potts J.M., Avery L., Langan S.J., Watson H., Cook Y., Taylor C., Abel C., Reid E., Singh B.K.: Comparison of microbial community assays for the assessment of stream biofilm ecology. *J. Microbiol. Methods*, **85**, 190–198 (2011)
52. Wisselink G.J., van Zanten E., Kooistra-Smid A.M.D.: Trapped in keratin; a comparison of dermatophyte detection in nail, skin and hair samples directly from clinical samples using culture and real-time PCR. *J. Microbiol. Methods*, **85**, 62–66 (2011)
53. Yang G., Zhang M., Li W., An L.: Direct Species Identification of Common Pathogenic Dermatophyte Fungi in Clinical Specimens by Semi-nested PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism. *Mycopathologia*, **166**, 203–208 (2008)
54. Ziółkowska G., Nowakiewicz A., Gnat S., Trościańczyk A., Zieba P., Majer Dziedzic B.: Molecular identification and classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strains isolated from humans and selected animal species. *Mycoses*, **58**, 119–126 (2015)

INFORMACJE Z POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW



XXIX OGÓLNOPOLSKI ZJAZD
POLSKIEGO TOWARZYSTWA
MIKROBIOLOGÓW
15-18 WRZEŚNIA 2020,
WARSZAWA



XXIX OGÓLNOPOLSKI ZJAZD POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW

15-18 WRZEŚNIA 2020,
WARSZAWA



Miejsce Zjazdu:

Sangate Hotel Airport
Warszawa, ul. Komitetu Obrony Robotników 32
(dawniej 17 Stycznia, róg ul. Żwirki i Wigury)

Główny Organizator Zjazdu:

Polskie Towarzystwo Mikrobiologów
ul. Stefana Banacha 1b, 02-097 Warszawa
ptm.zmf@wum.edu.pl, www.microbiology.pl



XXIX OGÓLNOPOLSKI ZJAZD
POLSKIEGO TOWARZYSTWA
MIKROBIOLOGÓW
15-18 WRZEŚNIA 2020,
WARSZAWA



GLOBAL CONGRESS

Warszawa, 12.09.2019 r.

Szanowni Państwo,

Polskie Towarzystwo Mikrobiologów organizuje w przyszłym roku **XXIX Ogólnopolski Zjazd PTM w Warszawie w terminie: 15–18 września 2020 r.** Jest to okazja do zdobycia wiedzy mikrobiologicznej, podzielenia się swoimi osiągnięciami badawczymi oraz do spotkania merytorycznego i towarzyskiego osób zainteresowanych wspólną tematyką naukową.

PTM zostało powołane 92 lata temu i Ogólnopolskie Zjazdy Towarzystwa organizowane są co 4 lata
(www.microbiology.pl).

Jest to największe wydarzenie naukowe związane z mikrobiologią i najliczniejsze spotkanie polskich mikrobiologów w tym okresie. Zwykle bierze w nim udział ponad pół tysiąca mikrobiologów: naukowców, nauczycieli akademickich, lekarzy, diagnostów laboratoryjnych, specjalistów pracujących w służbie zdrowia, weterynarii, instytutach naukowych i uczelniach, a także w przemyśle, rolnictwie oraz wykonujących mikrobiologiczne badania kontrolne w rozmaitych obszarach. W Zjazdach PTM udział biorą firmy diagnostyczne, chemiczne, farmaceutyczne, kosmetyczne, wytwarzające żywność, środki przeciwdrobnoustrojowe, odczynniki, testy oraz aparaturę kontrolną i badawczą stosowaną w rozmaitych działach mikrobiologii.

Wiele mikrobiologicznych badań naukowych, rozwojowych i użytkowych dotyczy aktualnych problemów: narastającej lekooporności drobnoustrojów chorobotwórczych, doskonalenia diagnostyki mikrobiologicznej, badań genetycznych drobnoustrojów, badań mikrobiologicznego zanieczyszczenia środowiska, GMO, poprawy systemu jakości i metod kontroli żywności, leków, wyrobów medycznych, produktów biobójczych i kosmetycznych.

Planujemy, że obrady będą odbywały się w sesjach naukowych:

- * Mikrobiom człowieka i probiotyki; * Zakażenia układu pokarmowego; * Zakażenia układu oddechowego;
- * Zakażenia układu moczowo-płciowego; * Oporność bakterii na antybiotyki – mechanizmy lekooporności;
- * Genetyka drobnoustrojów; * Dochodzenie epidemiologiczne z zastosowaniem metod molekularnych;
- * Nowe terapie przeciwbakteryjne – kandydaci na leki; * Bakteriofagi i peptydy – jako nowe terapie alternatywne;
- * Aktualne problemy w wakcynologii; * Immunologia zakażeń;
- * Nowości w obszarze sterylizacji, dezynfekcji i antyseptyki; * Patomechanizmy zakażeń; * Mykologia;
- * Wirusologia; * Mikrobiologia środowiskowa naturalnego, bioróżnorodność i bioremediacja;
- * Mikrobiologia środowiska przemysłowego i biotechnologia; * Mikrobiologia żywności;
- * Mikrobiologia weterynaryjna; * Varia.

Planujemy również prezentacje najnowszych prac habilitacyjnych i doktorskich z obszaru mikrobiologii, a także sesje sponsorowane przez firmy.

Zachęcamy wszystkie zainteresowane osoby do zarezerwowania sobie terminu 15–18.09.2020 na uczestnictwo w tym wielkim wydarzeniu w świecie mikrobiologii polskiej. Zachęcamy również wszystkich mikrobiologów, a zwłaszcza młodych adeptów tej nauki do przygotowania interesujących wystąpień i podzielenia się wynikami swoich badań naukowych, jak również rutynowych.

Sekretarz Komitetu Organizacyjnego
XXIX Zjazdu PTM

SEKRETARZ
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów

A. Laudy
dr hab. n. farm. Agnieszka E. Laudy

Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego
XXIX Zjazdu PTM

PREZES
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów
Stefan Tyński
prof. dr hab. Stefan Tyński



INFORMACJE Z POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW

Od ostatniej informacji o działalności Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, zamieszczonej w zeszytach nr 3 z 2019 r. kwartalników Postępy Mikrobiologii i Polish Journal of Microbiology, Prezydium ZG PTM zajmowało się następującymi sprawami:

1. W dniu 01.10.2019 r., zorganizowano spotkanie redakcji PM i PJM w celu omówienia działań, które mogłyby podnieść notowania PM w rankingach, postanowiono:
 - redakcja PM będzie starała się pozyskać recenzentów i autorów manuskryptów spoza Polski. W tym celu porozumie się z redakcją PJM oraz będzie się starała rozpropagować PM poza granicami Polski;
 - podjęte zostaną działania w celu uzyskania większej liczby manuskryptów do PM oraz popularyzacji ukazujących się w PM i PJM publikacji. W tym celu informacje o pojawiających się zeszytach PM i PJM będą ukazywały się na głównej stronie PTM z możliwością dotarcia do artykułu. Ponadto na wszystkich przyszłych zjazdach organizowanych, współorganizowanych lub objętych patronatem przez PTM powinny ukazywać się informacje propagujące obydwie kwartalniki PTM i zachęcające do publikowania na ich łamach artykułów;
 - podjęte zostaną działania w celu pozyskiwania manuskryptów autorów polskich w wersji anglojęzycznej, w tym celu dla manuskryptów nadsyłanych począwszy od dnia 01.01.2020 r. wprowadzone zostaną zmiany w opłacie redakcyjnej.

Obecnie obowiązuje opłata, bez względu na przysłane wersje językowe: dla autora korespondencyjnego – członka PTM 250 zł + VAT 23% (307,50 zł), a jeżeli autor korespondencyjny nie jest aktywnym członkiem PTM (nie ma opłaconych składek w roku bieżącym), opłata wynosi 350 zł + VAT 23% (430,50 zł).

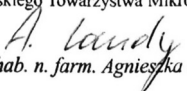
Nowa opłata od 01.01.2020 r.:

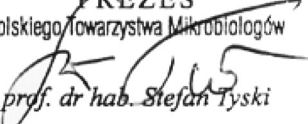
- a) dla autora korespondencyjnego – członka PTM (z opłaconą składką za rok bieżący), gdy manuskrypt jest w języku angielskim lub przysyłane są obie wersje językowe (angielska i polska): 200 zł + VAT* [dla autorów z Polski VAT wynosi 23%] (tj. 246 zł brutto), gdy manuskrypt jest przysyłany tylko w języku polskim – opłata wynosi 400 zł + VAT* [dla autorów z Polski VAT wynosi 23%] (tj. 492 zł brutto);
- b) dla pozostałych autorów korespondencyjnych, którzy nie są aktywnymi członkami PTM (nie mają opłaconych składek w roku bieżącym), gdy manuskrypt jest w języku angielskim lub przysyłane są obie wersje językowe (angielska i polska): 300 zł + VAT* [dla autorów z Polski VAT wynosi 23%] (tj. 369 zł brutto), gdy manuskrypt jest przysyłany tylko w języku polskim – opłata wynosi 600 zł + VAT* [dla autorów z Polski VAT wynosi 23%] (tj. 738 zł brutto);

VAT* – wysokość VAT-u jest zależna od kraju, z którego autor korespondencyjny dokonuje opłaty.

- redakcje PM i PJM zwracały uwagę na złą współpracę z wydawcą – firmą EXELEY, która nie w pełni wywiązuje się ze swoich obowiązków.
2. W dniu 02.10.2019 r. odbyło się spotkanie Komitetu Organizacyjnego XXIX Ogólnopolskiego Zjazdu PTM. Pojawiła się możliwość przeprowadzenia Zjazdu PTM w nowej lokalizacji. Zdecydowano, że zostanie przeprowadzona wizja lokalna w „Sangate Hotel Airport” (dawniej Hotel Gromada) i ewentualna zmiana lokalizacji Zjazdu z Centrum Konferencyjno-Szkoleniowego przy ul. Bobrowieckiej 9 do „Sangate Hotel Airport” przy ul. Komitetu Obrony Robotników 32 (dawniej 17 Stycznia 32, róg Żwirki i Wigury) w Warszawie. Przekazano firmie Global Congress dane ponad 250 firm, do których mają być wysłane e-maile z informacją o Zjeździe i zaproszeniu do uczestnictwa w nim. Zdecydowano, że w grudniu zostanie utworzona przez firmę Global Congress strona internetowa Zjazdu, zaś rejestracja na Zjazd zostanie uruchomiona w styczniu 2020 r. Rozważano miejsca na otwarcie Zjazdu i lokalizację przeprowadzenia imprezy towarzyszącej. Ponadto dyskutowano możliwości wystąpienia o dofinansowanie Zjazdu do MNiSW, FEMS oraz do ISME.
 3. W dniu 09.10.2019 r. kilku członków Komitetu Organizacyjnego Zjazdu PTM wraz z Prezesem firmy Global Congress udało się do Sangate Hotel Airport w celu przeprowadzenia wizji lokalnej odnośnie możliwości organizacji Zjazdu w tym hotelu. Po obejrzeniu pomieszczeń hotelu i odbyciu rozmów z dyrektorem hotelu oraz zastępcą kierownika ds. organizacji konferencji na terenie hotelu zdecydowano, że XXIX Zjazd PTM odbędzie się w Sangate Hotel Airport, natomiast impreza towarzysząca Zjazdowi w Koneserze. Będą prowadzone dalsze rozmowy w celu wybrania optymalnych rozwiązań do umowy.

4. W dniu 31.10.2019 r. odbyło się spotkanie kilku osób z Komitetu Naukowego Zjazdu, wymieniono informacje na temat organizacji sesji naukowych. Postanowiono w ramach popularyzacji mikrobiologii, w pierwszym dniu Zjazdu, przed jego oficjalnym otwarciem zorganizować 2 sesje popularno-naukowe, dostępne dla wszystkich zainteresowanych osób – zwłaszcza nauczycieli biologii ze szkół średnich z Warszawy i okolic. Sesje, każda obejmująca 4 wykłady uznanych polskich specjalistów, będą dotyczyły tematyki związanej z mikrobiologią środowiska (z elementami ochrony środowiska) oraz mikrobiologii lekarskiej (z zaznaczeniem problemu lekooporności drobnoustrojów oraz problemu – epidemiologia zakażeń, a szczepienia). Ponadto planujemy specjalną sesję plakatową dla uczniów szkolnych kół biologicznych, tak aby każde koło mogło zaprezentować plakat związany ze swoją działalnością. W ostatnim dniu Zjazdu zostaną przyznane nagrody za najciekawsze prezentacje plakatowe.
5. W dniu 06.11.2019 r. odbyło się zebranie kilku osób Komitetu Organizacyjnego Zjazdu PTM, W związku z trudnościami rezerwacji pomieszczeń w Koneserze, zdecydowano, że impreza towarzysząca Zjazdowi odbędzie się w Arkadach Kubickiego u podnóża Zamku Królewskiego. Omawiano sprawy finansowania Zjazdu i tworzenia strony internetowej Zjazdu.
6. Pan dr Mariusz Worek z Klinicznego Szpitala Wojewódzkiego Nr 1 im. Fryderyka Chopina w Rzeszowie, Podkarpackie Centrum Chorób Płuc, Kliniczny Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Regionalne Referencyjne Laboratorium Prątka Gruźlicy w województwie podkarpackim, zwrócił się do ZG PTM z prośbą o powołanie Oddziału Terenowego PTM w Rzeszowie. Pan doktor deklaruje, że chęć przystąpienia do nowego Oddziału Terenowego PTM zgłosiło ponad 30 osób. Z dużym zadowoleniem witamy tę inicjatywę. Prośba Pana doktora zostanie rozpatrzona na posiedzeniu ZG PTM w marcu 2020 r.
7. Pan prof. dr hab. Grzegorz Woźniakowski zgłosił problemy związane z funkcjonowaniem Oddziału Terenowego PTM w Puławach. Zarząd Oddziału podjął uchwałę o likwidacji Oddziału Terenowego PTM w Puławach, która będzie rozpatrywana na dorocznym posiedzeniu ZG PTM w marcu 2020 r.
8. Złożyliśmy odpowiednie wnioski do Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, FEMS, ISME, a także ORLENU, LOTOSU i KGHM z prośbą o dofinansowanie XXIX Ogólnopolskiego Zjazdu PTM. Odezwy firm, do których wysłano informacje o Zjeździe z prośbą o deklaracje uczestnictwa i wsparcie finansowe Zjazdu, jest na razie niewielki.
9. Ustalono, że informacja o Zjeździe PTM rozpowszechniana będzie w dwumiesięczniku „Zakażenia XXI wieku” wydawanym przez firmę MAVIPURO Polska Sp. z o.o.
10. Dnia 2 grudnia 2019 r. odbyła się na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego konferencja historyczno-naukowa „MAKRO-kierunki w MIKRO-biologii” z okazji 70-lecia powołania Oddziału Terenowego PTM w Warszawie. Konferencja obejmowała dwie sesje. Sesja historyczna była poświęcona sylwetkom założycieli i animatorów Oddziału. W jej trakcie wręczono medale i dyplomy zasłużonym członkom Oddziału. W sesji naukowej, osiągnięcia współczesnej mikrobiologii prezentowali specjaliści z zakresu m.in. mikrobiologii farmaceutycznej, weterynaryjnej, środowiskowej i żywności. W konferencji wzięło udział ponad 150 osób. Prezentowano ponad 60 plakatów w 5 sesjach tematycznych. Autorom najlepszych plakatów, w każdej sesji, przyznano dyplomy i nagrody ufundowane przez sponsora. Konferencję zorganizował Oddział Warszawski PTM we współpracy z Polskim Towarzystwem Mikrobiologów, a także Urzędem Marszałkowskim Województwa Mazowieckiego, Wydziałem Biologii i Instytutem Mikrobiologii Uniwersytetu Warszawskiego oraz American Society for Microbiology. Patronat nad wydarzeniem sprawowali: Marszałek Województwa Mazowieckiego, Prezydent m.st. Warszawy, Rektor Uniwersytetu Warszawskiego, Dyrektor Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny, Prezes Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów.

SEKRETARZ
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów

dr hab. n. farm. Agnieszka E. Laudy

PREZES
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów

prof. dr hab. Stefan Tyski

CZŁONKOWIE WSPIERAJĄCY PTM

Członek Wspierający PTM – Złoty
od 27.03.2017 r.



HCS Europe – Hygiene & Cleaning Solutions
ul. Warszawska 9a, 32-086 Węgrzce k. Krakowa
tel. (12) 414 00 60, 506 184 673, fax (12) 414 00 66
www.hcseurope.pl

Firma projektuje profesjonalne systemy utrzymania czystości i higieny dla klientów o szczególnych wymaganiach higienicznych, m.in. kompleksowe systemy mycia, dezynfekcji, osuszania rąk dla pracowników służby zdrowia, preparaty do dezynfekcji powierzchni dla służby zdrowia, systemy sterylizacji narzędzi.

Członek Wspierający PTM – Srebrny
od 12.09.2017 r.



Firma Ecolab Sp. z o.o. zapewnia: najlepszą ochronę środowiska pracy przed patogenami powodującymi zakażenia podczas leczenia pacjentów, bezpieczeństwo i wygodę personelu, funkcjonalność posiadanego sprzętu i urządzeń. Firma jest partnerem dla przemysłów farmaceutycznego, biotechnologicznego i kosmetycznego.

Członek Wspierający PTM – Srebrny
od 12.12.2017 r.



Od ponad 100 lat siedziba Wodociągów Krakowskich mieści się przy ul. Senatorskiej. Budowę obiektu ukończono w 1913 roku. W 2016 r. do sieci wodociągowej wtłoczono ponad 56 mln m³ wody. Szacuje się, że ponad 99,5% mieszkańców Gminy Miejskiej Kraków posiada możliwość korzystania z istniejącej sieci wodociągowej.

Członek Wspierający PTM – Zwyczajny
od 12.09.2017 r.



Merck Sp. z o.o. jest częścią międzynarodowej grupy Merck KGaA z siedzibą w Darmstadt, Niemcy i dostarcza na rynek polski od roku 1992 wysokiej jakości produkty farmaceutyczne i chemiczne, w tym podłoża mikrobiologiczne

**Członek Wspierający PTM – Zwyczajny
od 06.06.2019 r.**



BART Spółka z o.o. Sp. K
ul. Norwida 4, 05-250 Słupno
NIP: 1180741884, KRS: 0000573068
<https://bart.pl/>, email: info@bart.pl

Firma BART jest producentem i dystrybutorem surowców oraz dodatków dla przemysłu spożywczego i farmaceutycznego. Specjalizujemy się w probiotykach oraz surowcach uzyskiwanych metodami biotechnologicznymi. Współpracujemy z renomowanymi producentami: Probiotal, Gnosis, Lesaffre

SPIS TREŚCI

J. Płaczkiewicz – Unikanie mechanizmów wrodzonej odpowiedzi immunologicznej przez <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	367	
K. Furtak, A. Gałązka – Czynniki edaficzne i ich wpływ na bioróżnorodność mikrobiologiczną środowiska glebowego	375	
A. Wyszynska, P. Kobierecka, K. Elżbieta Jagusztyn-Krynicka – Postępy w opracowaniu szczepionki anti- <i>Campylobacter</i> przeznaczonej dla drobiu	385	
W. Grąźlewska, L. Holec-Gąsior – Antygeny rekombinantowe w diagnostyce serologicznej boreliozy	399	
K. Jaworska, A. Raczkowska, J. Frindt, J. Wachowicz, K. Brzostek – Mechanizmy funkcjonowania i regulacji systemów pobierania hemu u patogennych bakterii Gram-ujemnych	415	
A. Janczy, Z. Kochan, S. Małgorzewicz – Endotoksemia i zaburzenia bariery jelitowej towarzyszące nadwadze i otyłości	427	
A. Goryluk-Salmonowicz, M. Popowska – Występowanie zjawiska koselekcji w środowiskach pozaklinicznych	433	
M. Wołacewicz, D. Bębnowska, R. Hrynkiewicz, P. Niedźwiedzka-Rystwej – Wirusy środowisk ekstremalnych	447	
U. Błaszczuk – Drożdże killerowe i ich zastosowanie	455	
B. Zimowska, E. D. Król – Entomopatogeniczne grzyby i ich znaczenie biocenotyczne	471	
PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY		
S. Gnat, D. Łagowski, A. Nowakiewicz, M. Dyląg – Molekularne metody diagnostyki dermatomykoz – przegląd dostępnych technik oraz ocena ich zalet i wad w implementacji do rutynowego stosowania	483	
KOMUNIKATY, INFORMACJE		495

CONTENTS

J. Płaczkiewicz – Avoidance of mechanisms of innate immune response by <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	367	
K. Furtak, A. Gałązka – Edaphic factors and their influence on the microbiological biodiversity of the soil environment	375	
A. Wyszynska, P. Kobierecka, K. Elżbieta Jagusztyn-Krynicka – Advancements in developing anti- <i>Campylobacter</i> vaccine for poultry	385	
W. Grąźlewska, L. Holec-Gąsior – Recombinant antigens in serological diagnosis of Lyme borreliosis	399	
K. Jaworska, A. Raczkowska, J. Frindt, J. Wachowicz, K. Brzostek – Mechanisms of functioning and control of heme uptake in Gram-negative pathogenic bacteria	415	
A. Janczy, Z. Kochan, S. Małgorzewicz – Endotoxemia and intestinal barrier disorders associated with overweight and obesity	427	
A. Goryluk-Salmonowicz, M. Popowska – Occurrence of the co-selection phenomenon in non-clinical environments	433	
M. Wołacewicz, D. Bębnowska, R. Hrynkiewicz, P. Niedźwiedzka-Rystwej – Viruses of extreme environments	447	
U. Błaszczuk – Killer yeasts and their application	455	
B. Zimowska, E. D. Król – Entomopathogenic fungi and their biocenotic importance	471	
METHODS AND STANDARDS		
S. Gnat, D. Łagowski, A. Nowakiewicz, M. Dyląg – Molecular methods for diagnostics of dermatomycoses – review of available techniques and evaluation of their advantages and disadvantages in implementation for in routine use	483	
NEW REPORTS, INFORMATION		495

