

Kwartalnik

Tom 58

Zeszyt 1•2019

STYCZEŃ – MARZEC

CODEN:

PMKMAV 58 (1)

2019

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Postępy Mikrobiologii

Advancements of Microbiology

Index Copernicus ICV = 101,48 (2017)

Impact Factor ISI = 0,354 (2017)

Punktacja MNiSW = 15,00 (2016)

<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 RÓŻALSKI (Uniwersytet Łódzki),
ALEKSANDRA SKŁODOWSKA (Uniwersytet Warszawski), RADOSŁAW 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; fax 22 5541404, e-mail: jbielecki@biol.uw.edu.pl

RADOSŁAW STACHOWIAK (Zastępca)
Zastępca: Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa;
tel. 22 5541312; fax 22 5541404, 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; fax 22 5541404
e-mail: post.mikrobiol@biol.uw.edu.pl

REDAKTORZY

MONIKA ADAMCZYK-POPLAWSKA (Uniwersytet Warszawski)
ALEKSANDER DEPTUŁA (Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu), 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 lub kalemba@pum.edu.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 Bącał, Pracownia Inżynierii Nanohybrydowych Biosystemów Regulacji, Instytut Biocybernetyki i Inżynierii
Biomedycznej im. M. Nałęczka 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



Ministry of Science
and Higher Education

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 upowszechniających naukę.

Wersja anglojęzyczna wydrukowanych w bieżącym zeszycie artykułów
jest dostępna w archiwum internetowym czasopisma pod adresem:
<http://pm.microbiology.pl/category/numery/2019-1>

WSPOMNIENIE

Doktor Andrzej Kasprowicz (1943–2019)



W dniu 4 stycznia 2019 r. społeczeństwo Krakowa pożegnało ś.p. Pana dra Andrzeja Kasprowicza, mikrobiologa – diagnostę i pracownika naukowego.

Dr Andrzej Kasprowicz był wybitnym mikrobiologiem wysoko cenionym w środowisku naukowym i diagnostycznym w Polsce, osobą o ogromnym autorytecie, bardzo dobrze znaną społeczeństwu krakowskiemu. Był absolwentem Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego. Po ukończeniu studiów pracował w Wojewódzkiej Stacji Sanitarno Epidemiologicznej w Krakowie, a w latach 1973–1990 był pracownikiem naukowo-dydaktycznym w Instytucie Mikrobiologii Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej im. Mikołaja Kopernika w Krakowie (dzisiaj *Collegium Medicum* Uniwersytetu Jagiellońskiego). Zajmował się badaniem właściwości fenotypowych bakterii i diagnostyką mikrobiologiczną. Współpracując z lekarzami różnych specjalizacji przekazywał swoją wiedzę w poczuciu ogromnej odpowiedzialności za los cierpiącego człowieka; realizował godnie nakaz moralny, że dobro pacjenta jest najwyższą wartością. W czasie pracy

na uczelni kształcił studentów wydziałów lekarskiego, farmaceutycznego i pielęgnarskiego, zawsze znajdując dla nich czas i prowadząc zajęcia dydaktyczne na najwyższym merytorycznym poziomie. Związany z niezależnym ruchem związkowym, był w 1980 r. założycielem i przewodniczącym Komisji Oddziałowej NSZZ „Solidarność” w Instytucie Mikrobiologii krakowskiej Akademii Medycznej. W 1990 r. odszedł z Akademii i przy wsparciu DHN PAN utworzył od podstaw samodzielną placówkę – Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek im. dra Jana Bobra w Krakowie. Będąc świetnym organizatorem, powołał doskonale pracujący zespół, stawiając przed nim wysokie wymagania merytoryczne i narzucając najwyższe standardy pracy. Znalazło to wysokie uznanie w środowiskach naukowych i korporacjach diagnostycznych, w kraju i za granicą. Pracami Centrum kierował do 2019 r. Dr Andrzej Kasprowicz pełnił też obowiązki wojewódzkiego specjalisty w zakresie mikrobiologii lekarskiej w województwie nowosądeckim.

Dr Andrzej Kasprowicz był specjalistą II stopnia w zakresie mikrobiologii, autorem ponad 100 artykułów naukowych z dziedziny mikrobiologii lekarskiej opublikowanych w krajowych i zagranicznych specjalistycznych periodykach naukowych. Wśród osiągnięć naukowych dra Kasprowicza, wdrożonych do praktyki, szczególną uwagę zwraca skonstruowanie szczepionki przeciw trądzikowi o nazwie ACNEVAC. Według opinii niezującego już prof. Zdzisława Przybyłkiewicza, wybitnego dyrektora Instytutu Mikrobiologii Akademii Medycznej w Krakowie, skonstruowanie tej szczepionki było drugim z największych osiągnięć mikrobiologów krakowskich, po odkryciu w latach 20-tych XX w. mykoplazm przez prof. Juliana Nowaka. Tak więc dr Andrzej Kasprowicz wpisał się na stałe do historii mikrobiologii polskiej.

Dr Andrzej Kasprowicz i Jego zespół z Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek współpracował naukowo z licznymi placówkami leczniczymi i naukowymi, m.in. z Katedrą Immunologii Klinicznej *Collegium Medicum* Uniwersytetu Jagiellońskiego, Wydziałem Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ,

Uniwersytetem Rolniczym w Krakowie i Uniwersytetem Łódzkim. Dr Andrzej Kasprowicz zapraszany był do wygłaszania wykładów i prowadzenia seminariów, systematycznie na Wydziale Farmaceutycznym, Oddziale Analityki UJ, Uniwersytecie Rolniczym w Krakowie, a także w innych ośrodkach naukowych i oddziałach terenowych PTM.

Budując prestiż zawodu mikrobiologa diagnosty, dr Andrzej Kasprowicz przez długie lata z ogromnym zaangażowaniem pracował społecznie w Polskim Towarzystwie Mikrobiologów. Od 1967 roku pełnił funkcję sekretarza naukowego oddziału krakowskiego PTM. W latach od 1996 do 2011 był jego przewodniczącym, od 2012 r. przewodniczącym honorowym. W 1992 r. był głównym organizatorem Ogólnopolskiego Zjazdu Naukowego PTM w Krakowie, a przez kilka kadencji członkiem Zarządu Głównego PTM. Kierowany przez dra Andrzeja Kasprowicza oddział krakowski PTM stał się najliczniejszym i merytorycznie silnym oddziałem Towarzystwa. Upowszechnione wówczas regularne, comiesięczne zebrania naukowe, na które do dzisiaj są zapraszani najznamienitsi przedstawiciele środowiska mikrobiologów, reprezentujących różne dyscypliny mikrobiologii, organizowane przez oddział mini sympozja i szkolenia indywidualne przygotowujące diagnostów do specjalizacji, a także kilkudniowe kursy z częścią praktyczną laboratoryjną, to trwały wkład dra Andrzeja Kasprowicza w podnoszenie kwalifikacji i poziomu merytorycznego diagnostów mikrobiologów. Temu celowi miał także służyć ogólnopolski kwartalnik „Mikrobiologia Medycyna” założony i redagowany przez dra Andrzeja Kasprowicza i Jego przyjaciół. W latach 1994–2004, kiedy nie istniały jeszcze sieci informacyjne i międzynarodowe bazy danych z dostępem interneto-

wym, kwartalnik umożliwiał mikrobiologom dostęp do aktualnych osiągnięć naukowych i praktycznych procedur diagnostycznych. Od samego początku organizowania Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych dr Andrzej Kasprowicz reprezentował w niej środowisko mikrobiologów Polski Południowej. Był członkiem Krajowej Rady I Kadencji. O jego zaangażowaniu świadczy numer wpisu na listę diagnostów – jedenaście.

Pan dr Andrzej Kasprowicz był inicjatorem i fundatorem odznaki krakowskiego oddziału PTM – plakiety, specjalnie zaprojektowanej przez prof. Zbigniewa Czopa z krakowskiej Akademii Sztuk Pięknych. Plakietka, ustanowiona w roku 2010, ma zasięg ogólnokrajowy i zgodnie z regulaminem jest przyznawana wyróżniającym się pracownikom mikrobiologicznego środowiska naukowego i zawodowego na podstawie decyzji kolegium złożonego z osób wcześniej nią wyróżnionych.

Zaangażowanie i owoce pracy dra Andrzeja Kasprowicza zostały zauważone i docenione. Dr Andrzej Kasprowicz wyróżniony został członkostwem honorowym PTM i Medalem im. prof. Odon Bujwida, w kolejnych latach najwyższym odznaczeniem Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych – Statuetką SAPERE AUDE, Złotym Krzyżem Zasługi i Odznaką Honorową „Za Zasługi dla Ochrony Zdrowia”.

Dr Andrzej Kasprowicz, badacz, sprawny organizator, mądry pracodawca, kierujący się ideałami wspólnoty zawodowej, zaangażowany w pracę na rzecz pacjentów i służący im na co dzień swoją wiedzą i doświadczeniem, pozostanie wzorem dla kolejnego pokolenia mikrobiologów i diagnostów. W pamięci ludzkiej pozostanie jako Nasz Doktor – Człowiek szlachetny i prawy.

Jacek Międzobrodzki

Z głębokim żalem i smutkiem przyjęliśmy wiadomość, że odszedł do DOMU PANA dr Andrzej Kasprowicz, nasz znakomity Kolega, prawdziwy Przyjaciel, Pionier – Współorganizator Izby Diagnostów Laboratoryjnych. Z ogromnym wzruszeniem żegnam, jako I. Prezes KRDL, i jako Przyjaciel, Naszego Kolegę, wyjątkowego Człowieka, z którym los zetknął mnie prawie 30 lat temu. Trudno dziś znaleźć mi odpowiednie słowa, które mogłyby wyrazić wdzięczność i uznanie za uczestnictwo we wspólnym tworzeniu samorządu zawodowego; ponadto bezcenne jest doświadczenie wieloletniej przyjaźni, wsparcia, dobrego, mądrego słowa, wspólnego dzielenia się myślami, spostrzeżeniami i ta ciągła troska o drugiego człowieka. Był niezłomnym filarem wspomagającym działania tworzenia samorządu zawodowego, szczególnie się zasłużył

dla łączenia środowiska diagnostów laboratoryjnych okręgu krakowskiego w budowaniu idei samorządowej.

Promowanie prawdy, prawość, sprawiedliwość, wierność zasadom, uczciwość, wspaniałomyślność, ogromne poczucie odpowiedzialności to wartości, które emanowały z Jego Osoby, co również przekładało się na dzieła, które pozostawił po sobie, w tym „Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek im. dr. Jana Bobra w Krakowie”. Zostawił ogromny ślad w sercach ludzi, których spotkał na swojej drodze, dając świadectwo skromności, pokory, godnego postępowania w swojej pracy zawodowej, naukowej i społecznej.

Niech spoczywa w pokoju.

Łączę się w Bólu z Najbliższymi.

Żegnaj Drogi Przyjacielu

Henryk Owczarek

CHARAKTERYSTYKA I KIERUNKI WYKORZYSTANIA ENZYMÓW Z GRUPY WIELOMIEDZIOWYCH OKSYDAZ

Aleksandra Góralczyk-Bińkowska*, Anna Jasińska, Jerzy Długoński

Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

Wpłynęło w czerwcu, zaakceptowano w listopadzie 2018 r.

Streszczenie: Wielomiedziowe oksydazy (MCO) stanowią dużą rodzinę niebieskich białek, a ich centrum katalityczne składa się z trzech domen: typu I Cu, typu II Cu oraz pary typu III Cu. Wśród MCO wyróżnia się lakazy, ferroksydazy, oksydazy askorbinianowe, oksydazy bilirubinowe oraz lakazopodobne wielomiedziowe oksydazy. Wielomiedziowe oksydazy katalizują reakcje utleniania aromatycznych jak i niearomatycznych związków z jednoczesną redukcją tlenu cząsteczkowego do wody. Właściwości te czynią je cennym narzędziem w wielu gałęziach przemysłu i ochronie środowiska.

1. Wprowadzenie. 2. Wielomiedziowe oksydazy – klasyfikacja, struktura i właściwości. 3. Metody identyfikacji enzymów z rodziny MCO. 4. Lakazy vs. inne MCO. 5. Zastosowanie wielomiedziowych oksydaz. 6. Podsumowanie

CHARACTERISTICS AND USE OF MULTICOPPER OXIDASES ENZYMES

Abstract: The multicopper oxidases (MCOs) are a large family of blue copper proteins which contain from one to six copper atom per molecule. Their catalytic center consist of three domains which involve type I Cu, type II Cu and pair of type III Cu's. They include laccases, ferroxidases, ascorbate oxidase, bilirubin oxidase, laccase-like multicopper oxidases. MCOs are capable of one-electron oxidizing aromatic as well as non-aromatic compounds with concomitant four electron reduction of molecular oxygen to water. These properties make them a valuable tool in various industries (e.g. food, textile, pharmaceutical) medicine or environment protection.

1. Introduction. 2. Multicopper oxidases – classification, structure and properties. 3. Identification methods of MCOs. 4. Laccases vs. others MCOs. 5. Application of multicopper oxidases. 6. Summary

Słowa kluczowe: drobnoustroje, lakazy, wielomiedziowe oksydazy
Key words: microorganisms, laccases, multicopper oxidases

1. Wstęp

Wielomiedziowe oksydazy (Multicopper Oxidases, MCO) to rodzina enzymów katalizujących reakcje utleniania substratu z jednoczesną redukcją tlenu cząsteczkowego do wody. Za te reakcje odpowiada uniwersalne dla wszystkich MCO centrum katalityczne, w którego skład wchodzi 4 lub więcej atomów miedzi tworzących typy T1, T2 i dwuatomowy T3. Chociaż budowa centrum katalitycznego większości enzymów zaliczanych do MCO jest zbliżona, ich funkcje biologiczne oraz właściwości katalityczne mogą być zupełnie odmienne.

Jak dotąd poznano (wg bazy UniProt) ok. 50 tys. różnych enzymów charakteryzujących się obecnością typowego dla MCO centrum katalitycznego i zdolnością do utleniania związków organicznych i nieorganicznych. Wielu badaczy starało się przeanalizować cechy na podstawie, których możliwe jest odpowiednie zaklasyfikowanie nowo zidentyfikowanego enzymu o właściwościach MCO. Jednak ze względu na bardzo zbliżone właściwości wobec większości substratów oraz dużą

homologię sekwencji aminokwasowych (zwłaszcza w obrębie centrum katalitycznego) dla większości MCO problem ten nadal wydaje się być nierozwiązany. Do najczęściej opisywanych MCO należą lakazy (zwłaszcza pochodzące z grzybów zaliczanych do gromady *Basidiomycota*), oraz tzw. enzymy lakazopodobne (Laccase-like Multicopper Oxidases, LMCO), oksydaza askorbinianowa (opisywane głównie u roślin wyższych), oksydaza bilirubinowa (np. u *Myrothecium verrucaria*), niektóre pigmenty grzybowe i ferroksydazy (np. Fet3p drożdży *Saccharomyces cerevisiae*) [12, 26, 44].

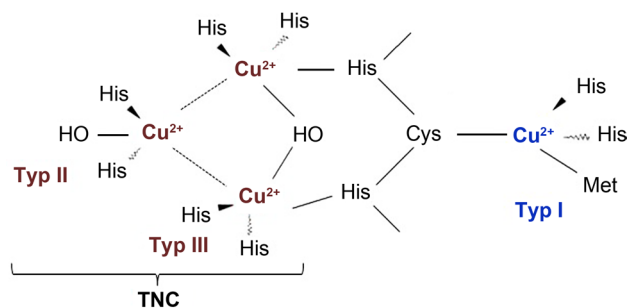
Bardzo wysoki potencjał utleniająco-redukujący MCO oraz różnorodność katalizowanych przez nie reakcji sprawiły, że enzymy te cieszą się dużym zainteresowaniem badaczy na całym świecie i wykazują wiele możliwości aplikacyjnych. MCO są enzymami stosunkowo stabilnymi, łatwymi do wydzielenia z hodowli oraz oczyszczenia, co w połączeniu z ich niską specyficznością substratową czyni je cennym narzędziem w procesach produkcji leków [5], eliminacji związków fenolowych z wyrobów alkoholowych [13],

* Autor korespondencyjny: mgr Aleksandra Góralczyk-Bińkowska, Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Banacha 12/16, 90-237 Łódź; +48 426 354 717; e-mail: aleksandra.goralczyk@biol.uni.lodz.pl

syntezy barwników [19], degradacji i odbarwiania pulpy drzewnej [93] lub detoksykacji ksenobiotyków [40]. Uwagę zarówno środowiska naukowego, jak i przemysłu, skupiły na sobie głównie lakazy oraz enzymy lakazo-podobne [40, 93, 94]. Niewiele uwagi poświęcono jak dotąd innym grupom enzymów z rodziny MCO, które, mimo że są stosunkowo słabiej rozpowszechnione w środowisku naturalnym, stanowią również interesujący obiekt badań oraz charakteryzują się możliwością zastosowania w praktyce.

2. Wielomiedziowe oksydazy – klasyfikacja, struktura i właściwości

Cechą wspólną wszystkich enzymów zaliczanych do rodziny MCO jest obecność centrum katalitycznego zbudowanego z co najmniej czterech atomów miedzi podzielonych, z uwagi na ich spektroskopowe i magnetyczne właściwości, na trzy typy: typy T1 i T2 – zawierające po jednym atomie miedzi oraz dwuatomowy typ T3 [67]. Typ T1 nadaje cząsteczce enzymu niebieskie zabarwienie i wykazuje intensywną absorpcję światła przy długości fali 610 nm wynikającą z kowalencyjnego wiązania miedź-cysteina. Z kolei typ T2 jest bezbarwny i podobnie jak typ T1, wykrywalny za pomocą spektroskopii rezonansu elektroparamagnetycznego (EPR). Typ T3 w wyniku antyferromagnetycznego sprzężenia pary atomów miedzi nie wykazuje aktywności w spektroskopii EPR, odznacza się jednak pasmem absorpcji światła przy długości fali 330 nm [9] (Ryc. 1).



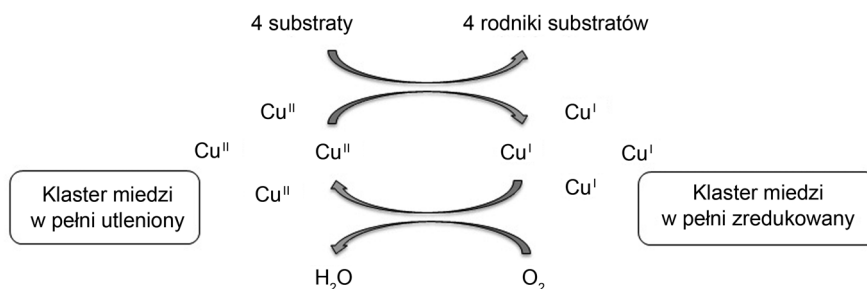
Ryc. 1. Schemat budowy centrum katalitycznego MCO

W centrum T1, gdzie następuje utlenienie substratu, atom miedzi związany jest z dwiema resztami histydyny i jedną cysteiną tworząc zniekształconą strukturę piramidy trygonalnej. Wymieniona sekwencja His-Cys-His, charakterystyczna dla MCO, łączy T1 z T3. Niekiedy może występować w pozycji osiowej, czwarta, słabiej związana reszta aminokwasowa (najczęściej metionina, leucyna lub fenyloalanina), która wpływa na potencjał oksydoredukcyjny enzymu, stabilizuje go oraz reguluje jego aktywność. Położone w bliskim sąsiedztwie atom miedzi typu T2 i dwa atomy typu T3 koordynowane są przez tzw. międzypomenowe miejsca wiązania miedzi, zbudowane odpowiednio z 2 i 6 reszt histydyny i tworzące trójatomowe miedziowy klaster (Trinuclear Cu Cluster, TNC). Stanowi on strukturę unikatową dla rodziny MCO i jest miejscem, w którym następuje wiązanie i czteroelektronowa redukcja tlenu cząsteczkowego do wody [76].

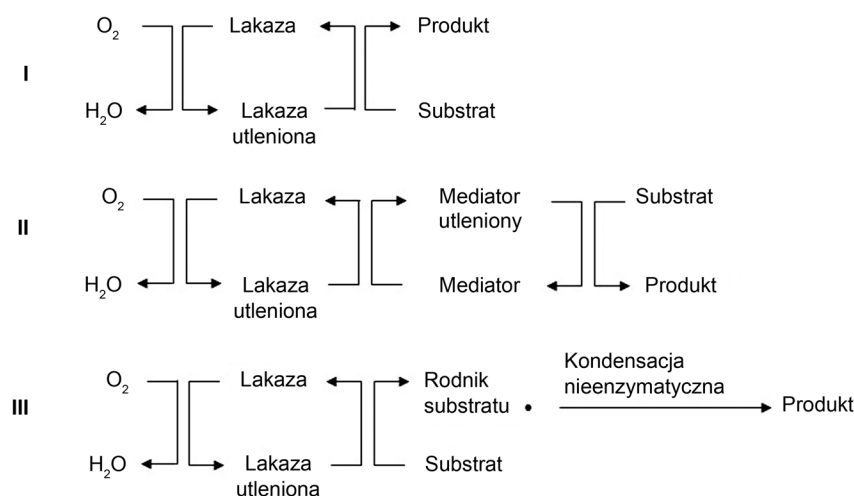
Większość MCO zawiera około 500 reszt aminokwasowych i przyjmuje w swej strukturze drugorzędowej układ harmonijki β (β -sheet) uformowanej w charakterystyczny motyw klucza greckiego (Greek Key) [32, 43]. Z reguły cząsteczka MCO składa się z trzech domen uformowanych ten sposób. Centrum miedzi T1 znajduje się w domenie 3 (blue copper-binding domain), a trójatomowy klaster miedziowy T2/T3 znajduje się na styku domeny 1 i 3, dalej od powierzchni białka w porównaniu do domeny 3. Jednak oprócz trójdomenowych MCO scharakteryzowano również białka posiadające dwie lub sześć domen [61].

Mechanizm katalityczny MCO obejmuje (1) redukcję miejsca T1 Cu poprzez przyjęcie elektronu z utlenionego substratu, (2) przeniesienie elektronu z miejsca T1 do TNC i (3) redukcję O_2 z wytworzeniem dwóch cząsteczek wody (Ryc. 2).

MCO utleniają szerokie spektrum substratów, takich jak fenol, metoksyfenol, aromatyczne aminy, związki wieloaromatyczne, jony metali [39, 51]. Reakcje katalizowane przez MCO mogą zachodzić bezpośrednio (reakcje utleniania prostych związków fenolowych) lub w obecności związku zw. mediatorem, który pośredniczy w przekazywaniu elektronów z substratu do centrum aktywnego enzymu (Ryc. 3). Jeśli bezpośred-



Ryc. 2. Schemat cyklu katalitycznego lakazy



Ryc. 3. Mechanizmy reakcji katalizowanych przez MCO

I – reakcje zachodzące bezpośrednio, II – reakcje zachodzące w obecności mediatora, III – reakcje sprzęgania.
Na podstawie Polak i Jarosz-Wilkolaka [66], zmodyfikowany.

nie utlenienie substratu fenolowego doprowadzi do powstania jego reaktywnych i niestabilnych rodników, mogą one w procesie nieenzymatycznej, spontanicznej reakcji sprzęgania łączyć się ze sobą tworząc dimery, oligomery lub polimery [66].

MCO stanowią bardzo zróżnicowaną grupę enzymów produkowanych zarówno przez organizmy prokariotyczne, jak i *Eukaryota*, i charakteryzujących się różnymi, nie do końca jeszcze poznanymi funkcjami biologicznymi. Chociaż wszystkie MCO wykazują zdolność do utleniania związków aromatycznych, można wśród nich wyróżnić dwie klasy funkcjonalne [86]. Pierwszą stanowią enzymy, które utleniają substraty organiczne chętniej, niż jony metali. Grupę tę tworzą głównie lakazy i enzymy lakazopodobne. Drugie z kolei utleniają jony metali, takie jak Fe (II), Cu (I) i/lub Mn (II), z wyższą wydajnością w porównaniu z substratami organicznymi. Te ostatnie enzymy są określane jako metalooksydazy, a najbardziej powszechne wśród nich to ludzka ceruloplazmina (Cp) i ferroksydaza drożdżowa (Fet3p) [53]. Podział MCO nie jest stały i usystematyzowany, ponieważ brakuje jasnych kryteriów klasyfikacji. Na przykład według Hoegger i wsp. [26] wielomiedziowe oksydazy tworzy 10 grup enzymów: lakazy *Basidiomycota*, lakazy *Ascomycota*, lakazy owadów, pigmenty grzybowe MCO, ferroksydazy grzybowe, roślinne i grzybowe oksydazy askorbinianowe, enzymy roślinne podobne do lakaz, białka odporne na miedź (CopA), oksydazy bilirubiny i białka wydzielania miedzi (CueO) (Tabela I). Z kolei Sirim i wsp. [83] w obrębie rodziny MCO wyróżnili: lakazy, ferroksydazy, oksydazy askorbinianowe (AO) i oksydazy bilirubinowe (BOD). Po zintegrowaniu danych na temat sekwencji i struktur MCO skonstruowano bazę danych The Laccase Engineering Database (LccED) (<https://lcced.biocatnet.de/>). Obecnie w bazie wyróżniono 16 nadrodzin

MCO, zawierających ponad 14 000 sekwencji aminokwasowych 10 415 różnych białek (Tab. I).

Identyfikacja lakaz spośród wielomiedziowych oksydaz dotychczas pozostaje niejednoznaczna. Reiss i wsp. [71] zaproponowała używanie pojęcia „lakazy” jedynie dla enzymu wydzielonego z soku drzewa *Rhus vernicifera* i wprowadzenie pojęcia „lakazopodobnych wielomiedziowych oksydaz” (LMCO), w celu uwzględnienia potencjalnej odmienności ich funkcji biologicznych i cech biochemicznych. Ponadto Brander i wsp. [6] podaje, iż termin „lakazy” pierwotnie był używany w stosunku do roślinnych wielomiedziowych oksydaz posiadających trzy domeny. Natomiast Ihssen i wsp. [30] zaleca klasyfikowanie jako lakaz jedynie tych MCO, które zostały wyizolowane w obecności urushiolu – nienasyconego alkilokatecholu. Klasyfikacja enzymów z rodziny MCO jest złożona z uwagi na ich szeroką specyficzność substratową, niemniej szczegółowa charakterystyka biochemiczna jest niezbędna w celu uporządkowania proponowanych przez badaczy podziałów. Podział MCO nie jest stały i usystematyzowany, ponieważ brakuje jasnych kryteriów klasyfikacji. Najbardziej odpowiedni wydaje się być podział przyjęty przez Hoegger i wsp. [26], jednak z uwagi na nieco odmienne właściwości biochemiczne i nie do końca sprecyzowane funkcje biologiczne, uzasadnionym wydaje się być wyróżnienie wśród MCO także grupy enzymów lakazopodobnych LMCO.

3. Metody identyfikacji enzymów z rodziny MCO

Do niedawna identyfikacja enzymów zaliczanych do MCO opierała się głównie na charakterystyce ich cech biochemicznych oraz uzdolnień katalitycznych. Interakcje MCO z substratami można ogólnie podzielić

Tabela I

Klasyfikacja wielomiedziowych oksydaz (MCO) wraz z przykładami organizmów zdolnych do ich produkcji i charakterystyką enzymu

Grupa MCO	Przykład organizmu	Charakterystyka enzymu	Piśmien- nictwo
Lakazy <i>Basidiomycota</i>	<i>Trametes pubescens</i>	pH 3–4,5; DMP, syryngaldazyna	[21]
MCO <i>Ascomycota</i>	<i>Aspergillus niger</i>	pH 5-6; DMPPDA	[90]
Lakazy owadów	<i>Anopheles gambiae</i>	pH 6; ABTS	[46]
Pigmenty grzybowe MCO	<i>Aspergillus niger</i>	pH 5; DMPPDA	[90]
Grzybowe ferrokasydazy (Fet3p)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	pH 5; p-fenylenodiamina	[86]
Oksydazy askorbinianowe	<i>Brassica oleracea var. italica</i>	pH 7,0 roztwór kwasu askorbinowego	[80]
Roślinne lakazy	<i>Rhus vernicifera</i>	pH 9; syryngaldazyna	[96]
Oksydazy bilirubinowe	<i>Myrothecium verrucaria</i>	pH 8; syryngaldazyna	[96]
Bakteryjne oksydazy wydzielania miedzi (CueO)	<i>Escherichia coli</i>	pH 6,5; DMP	[72]
Bakteryjne lakazy (CotA)	<i>Bacillus subtilis</i>	T ½ w temp. 80°C 2-4 godziny	[61]
Bakteryjne białka odporne na miedź (CopA)	<i>Pseudomonas syringae</i>	pH 5; DMP	[84]

Klasyfikacja MCO wg Hoegger i wsp. [26]

na dwie kategorie i wyróżnić enzymy o niskiej specyficzności substratowej i enzymy o wysokiej specyficzności. Roślinne i grzybowe lakazy należą do pierwszej kategorii i mogą one utleniać difenole, aminy aryłowe i aminofenole, a ich wartości K_m mieszczą się ogólnie w zakresie 1–10 mM. Pozostałe MCO mają znaczny stopień specyficzności substratowej ($K_m < 1$ mM) [85].

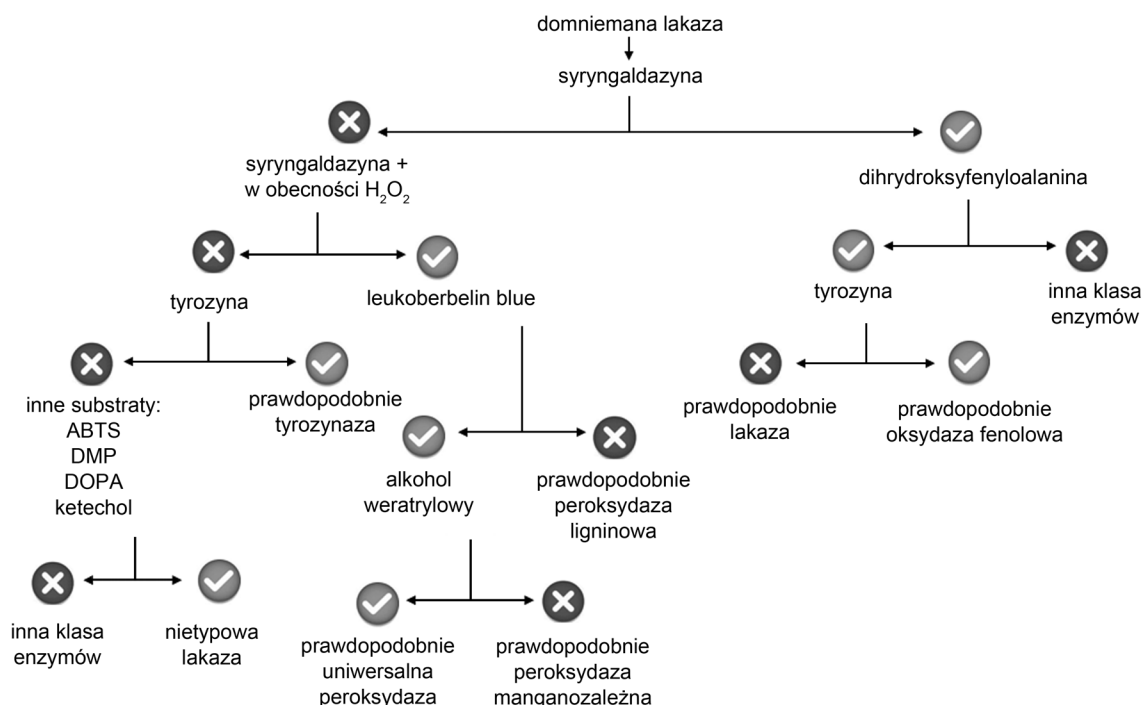
Niektóre substancje takie jak gwajakol, sól diamonowa 2,2'-azyno-bis (3-etylobenzotiazolino-6-kwasu sulfonowego) (ABTS), 2,6-dimetoksyfenol (DMP) i katechol od dawna są określane jako modelowe substraty lakaz [71]. Jednak jak się okazało wiele spośród nich jest również utlenianych przez inne enzymy z grupy MCO np. LMCO lub oksydazy bilirubinowe. Za specyficzny substrat lakazy uznawana była syryngaldazyna [64]. Syryngaldazyna i ABTS mogą być przekształcane przez MnP lub LiP. Jednak zależne od H_2O_2 utlenianie pozwala na rozróżnienie tych enzymów od MCO. MCO można również odróżnić od MnP za pomocą testu z barwnikiem leucoberbelin blue. Związek ten specyficznie reaguje z jonami manganu uwalnianymi przez MnP, co skutkuje pojawieniem się niebieskiego zabarwienia wykazującego maksymalną absorpcję światła przy długości fali 620 nm [18]. Na Rycinie 4 przedstawiono schemat identyfikacji i różnicowania lakaz od innych enzymów ligninolitycznych zaproponowany przez Fernandes i wsp. [18].

O ile zdolność do utleniania specyficznych substratów pozwala szybko ustalić aktywność danego enzymu z grupy MCO, o tyle w dobie rozwoju wysokozaawansowanych technik molekularnych nie powinna ona stanowić jedynej metody identyfikacji i charakterystyki nowopoznanego białka. Rozwój technik omicznych takich jak genomika, transkryptomika i proteomika przyczynił się do ustalenia genów odpowiedzialnych za kodowanie enzymów, badanie ich ekspresji na pozio-

mie transkryptomu i analizę ilościową i jakościową MCO na tle pozostałych białek organizmu. Perry i wsp. [65] jako pierwszy zidentyfikował dwa geny kodujące lakazy *Agaricus bisporus* i stwierdził, że enzymy te mogą występować jako izoformy i być kodowane przez wielogenowe rodziny genów. Od tego czasu setki genów kodujących MCO zidentyfikowano zarówno u grzybów, jak i bakterii. Obecność u jednego szczepu wielu genów kodujących izoformy enzymów może wskazywać na udział tych enzymów w różnych procesach fizjologicznych. Potwierdzeniem tej hipotezy może być fakt, że poszczególne izoformy enzymów często różnią się specyficznością substratową, a ich aktywność może być odmienna w różnych wariantach pH czy temperatury. Część z nich wykazuje charakter konstytutywny, a część może być indukowana np. związkami aromatycznymi lub jonami miedzi. Techniki genomiczne i proteomiczne pozwoliły na zidentyfikowanie dla MCO sekwencji konsensusowych odróżniających je od innych enzymów. Sekwencje te zawierają cztery (L1, L2, L3, L4) ciągle fragmenty reszt aminokwasowych wiążących miedź, których stopień podobieństwa w zależności od organizmu z jakiego pochodzi enzym może wynosić od 75 do 85%. Regiony L2 i L4 pozwalają na zaklasyfikowanie enzymu do MCO, podczas gdy sekwencje L1 i L3 wskazują na podgrupę enzymu [23].

4. Lakazy vs. inne MCO

Spośród drobnoustrojowych MCO najlepiej zbadaną i opisaną, a zarazem najliczniejszą grupę stanowią lakazy. Są to trójdomenowe MCO po raz pierwszy wyizolowane przez H. Yoshida w 1883 roku z żywicy pochodzącej z drzewa *Rhus vernicifera*. Roślinne lakazy dzięki mechanizmom dehydrogenacji odgrywają ważną



Ryc. 4. Proponowany schemat identyfikacji lakaz od innych enzymów lignino litycznych
Na podstawie Fernandes i wsp. [18], zmodyfikowany.

rolę w polimeryzacji związków fenolowych tworzących ligninę, regeneracji uszkodzonych tkanek i utlenianiu żelaza poprzez przekształcanie Fe (II) do Fe (III) [15]. Pomimo że wg niektórych badaczy termin lakaza powinien być zarezerwowany wyłącznie dla enzymów pozyskiwanych z roślin, również inne trójdomenowe MCO np. pochodzenia drobnoustrojowego, nazywane są lakazami jeśli tylko wykazują zdolność do utleniania związków aromatycznych [61].

Lakazy pochodzenia grzybowego najczęściej występują w postaci kilku monomerów, które oligomeryzują tworząc multimerowe kompleksy. Średnia masa cząsteczkowa monomeru mieści się w zakresie od około 50 do 110 kDa. Ważną cechą lakaz grzybowych jest związana kowalencyjnie grupa węglowodanowa, stanowiąca zwykle od 10 do 45% całej cząsteczki enzymu i składająca się głównie z mannozy, N-acetyloglukozaminy oraz galaktozy. Wszystkie te cechy chronią grzybowe lakazy przed proteolizą, działaniem wysokich temperatur, skrajnie wysokich lub niskich wartości pH i innych niekorzystnych czynników [15, 74].

Spośród grzybów zdolnych do biosyntezy lakaz najliczniejszą grupę stanowią te z gromady *Basidiomycota* np. *Lentinus tigrinus*, *Agaricus bisporus*, *Trametes versicolor* [82]. Wśród nich dość licznie występują tzw. grzyby białej zgnilizny drewna, m.in. szczepy z gatunku *Phlebia radiata*, *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Cerrena unicolor* [87]. Syntezę tych enzymów opisano również u grzybów należących do gromady *Ascomycota* np. *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Neurospora* sp., *Trichoderma atroviride* i *T. harzianum*

[87]. U grzybów lakazy uczestniczą w procesach morfogenezy, degradacji ligniny oraz reakcjach obronnych na stres. Enzymy te wytwarzane przez saprofityczne oraz mikoryzowe grzyby są zaangażowane w obieg materii organicznej w glebie poprzez degradację polimerów ściółkowych czy tworzenie związków humusowych [26]. Lakazy bakteryjne zidentyfikowano w hodowlach szczepów m.in. *Azospirillum lipoferum*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* oraz kilku gatunków *Streptomyces* [7]. Opisano je również u cyjanobakterii *Anabaena azollae*. Bakteryjne lakazy odznaczają się większą niż enzymy grzybowe aktywnością i stabilnością w wysokich temperaturach, przy alkalicznym pH oraz w obecności wysokich stężeń jonów chloru i miedzi [15].

Reakcjom katalizy, którym pośredniczy lakaza, mogą ulegać zarówno substraty fenolowe, jak i niefenolowe. W przypadku cząsteczek o wysokim potencjale oksydoredukcyjnym oraz cząstek o dużych rozmiarach, które nie są zdolne do samodzielnego przenikania do centrum aktywnego enzymu, niezbędne jest działanie tzw. mediatorów. Są to związki organiczne o małej masie cząsteczkowej, które ulegając utlenianiu przez lakazę, tworzą wysoce aktywne rodniki kationowe zdolne do utleniania związków niefenolowych. Najpowszechniej stosowanymi mediatorami syntetycznymi są ABTS, kwas hydroksyantranilowy (HAA), hydroksybenzotriazol (HBT) i hydroksyfitalimid (NPI). Podobne działanie wykazują także mediatory naturalne np. wanelina i syryngaldehid [66].

Lakazopodobne wielomiedziowe oksydazy (LMCO), tak samo jak lakazy, katalizują utlenianie różnych

substratów połączone z redukcją cząsteczki O_2 do dwóch cząsteczek H_2O . Ich funkcje biologiczne są zbliżone do roli lakaz, ale nie wszystkie zostały jeszcze poznane. LMCO zostały opisane u wielu bakterii i grzybów. Średnia masa cząsteczkowa LMCO mieści się przedziale 51–66 kDa, natomiast ilość sekwencji aminokwasowych enzymów wynosi 470–600 aa. Opiszano także LMCO bakterii *Streptomyces*, których masa cząsteczkowa wynosi 32,6 kDa, a długość sekwencji aminokwasów 297 aa. LMCO bakterii Gram-ujemnych różnią się od wszystkich innych LMCO obecnością proliny między dwoma histydynami i dodatkową histydyną w pozycji drugiej po motywie HXH. LMCO pochodzenia bakteryjnego uważa się za bardziej skuteczne w rozkładzie związków organicznych niż LMCO grzybowe. Natomiast LMCO grzybowe mają szersze spektrum substratów niż LMCO z bakterii Gram-ujemnych [49].

Optymalna wartość pH dla działania LMCO nie jest jednakowa, ponieważ zależy od wykorzystanego do jej pomiaru substratu [49]. Na przykład trzy typy LMCO pochodzące z *Aspergillus niger*: McoA, McoB i McoG oczyszczono i scharakteryzowano pod kątem potencjału biokatalitycznego. Wszystkie trzy enzymy były monomerami o masach cząsteczkowych w zakresie od 80 do 110 kDa. Najwyższą aktywność McoA odnotowano w środowisku o pH 5,0, podczas gdy pH 6,0 było optymalne dla McoB i McoG. Ponadto McoA i McoB utleniały DMPPDA (*N,N*-dimetylo-p-fenylendiaminę) w szerszym zakresie pH niż McoG [89]. LMCO wyizolowana *Myrothecium roridum* wykazywała aktywność zarówno MCO, jak i oksydazy bilirubinowej [35].

Oksydaza bilirubinowa jest enzymem termostabilnym, zawierającym mostek dwusiarczkowy. BOD katalizuje utlenianie tetrapyrroli np. bilirubiny do biliwerdiny oraz difenoli czy diamin arylowych z jednoczesną redukcją czterech atomów tlenu do wody [10]. Enzym ten został odkryty w nieligninolitycznym grzybie *Myrothecium verrucaria* MT-1 w 1981 roku przez Noriakięgo Tanaka i Sawao Murao. W odróżnieniu do lakaz, BOD charakteryzują się wyższą aktywnością i stabilnością w neutralnym pH oraz w wysokiej temperaturze, jednak nie większej niż 60°C. Odnaczają się również wysoką tolerancją na aniony chlorkowe i inne chelatory [52]. Na przykład oksydaza bilirubinowa wyizolowana z *Myrothecium verrucaria* (MvBOD) wykazała najwyższą aktywność katalityczną w zakresie temperatur 30–60°C i w pH od 7 do 8,5. Natomiast w roztworach o pH powyżej 9 zaobserwowano spadek aktywności katalitycznej BOD aż o 50% [91].

Oksydaza askorbinianowa katalizuje utlenianie askorbinianu do kwasu dehydroaskorbinowego z wytworzeniem H_2O w obecności tlenu. Została wyizolowana z roślin wyższych, u których występuje w największej ilości w ścianie komórkowej i zaangażowana jest w ich wzrost [80, 85]. Poprzez modyfikacje przestrzeni apo-

plastycznej oksydaza askorbinianowa uczestniczy również w reakcjach obronnych [26]. Jej aktywność i ekspresja są indukowane auksyną i światłem, co pozwala przypuszczać, iż uczestniczy ona w transdukcji sygnału [95]. AO opisano również u mikroorganizmów m.in. *Myrothecium verrucaria*, *Aerobacter aerogenes*, *Acromonium* sp. HI-25 [60, 80]. W przeciwieństwie do lakaz, które działają jako monomery, do prawidłowego funkcjonowania AO niezbędne jest utworzenie struktury homodimeru. Taka struktura białka pełni ponadto funkcje stabilizujące [61].

Oksydaza wydzielania miedzi (CueO) występująca w peryplazmie u *E. coli* może utleniać p-fenylendiaminę, 2,6-dimetoksyfenol i podobnie jak niektóre inne trójdomenowe MCO posiada aktywność ferrooksydazy. Dzięki temu enzym nie tylko chroni komórkę przed niekorzystnym wpływem jonów miedzi (poprzez utlenianie Cu^+ do mniej szkodliwych Cu^{2+}), lecz także bierze udział w homeostazie żelaza. Wykazano, iż CueO utlenia grupy katecholowe kwasu 2,3-dihydroksybenzoesowego, prekursora enterobaktyny [24]. CueO posiada budowę zbliżoną do lakazy i AO, jednak konformacja TNC różni ją od pozostałych MCO. Dodatkowo w obrębie trzeciej domeny CueO zawiera bogate w metioninę regiony, które działają jak czujnik jonów miedzi, w obecności których znacznie wzrasta aktywność enzymu [61, 72].

Kolejną bakteryjną MCO jest białko wydzielania miedzi (CopA), składające się z trzech domen, opisane u *Pseudomonas syringae* czy *Xanthomonas campestris* [26]. Aktywność tego enzymu określono na podstawie zdolności do utleniania 2,6-dimetoksyfenolu [84]. Jak podaje Nakamura i Go [61] w warunkach tlenowych CopA oraz CueO kontrolują metabolizm miedzi poprzez eksport nadmiaru $Cu(I)$ z cytoplazmy i utlenianie do $Cu(II)$, która jest mniej toksyczna.

Do produkcji termostabilnego białka opłaszczającego endospory – CotA zdolny jest szczep *B. subtilis*. CotA składa się z ponad 30 rodzajów polipeptydów i jest odporne na działanie czynników fizycznych jak i chemicznych. Wynika to funkcji jaką ono pełni, mianowicie wytwarzania melaninowego pigmentu, który chroni przed promieniowaniem UV i nadtlenkiem wodoru [17, 29]. Ponadto białko jest wysoce stabilne, ponieważ okres półtrwania aktywności w temperaturze 80°C ustalono na 2–4 godziny [61]. Jak podaje Rajeswari [69] lakaza CotA wykazuje podobieństwo do CueO u *E. coli* na podstawie budowy centrum katalitycznego, jednakże międzys domenowa pętla posiada miejsca umożliwiające ściślejsze upakowanie, co poprawia stabilność całej struktury oraz zwiększa termostabilność [61]. Jak podaje Enguita i wsp. [16] segment ten zawiera tylko 4 z 46 reszt proliny składających się na cały CotA. Dlatego może to sugerować, iż zawartość proliny, zarówno warunkuje termostabilność białka jak i w połączeniu ze zwiększonym upakowaniem znacznie ją wzmacnia [16].

Pigmenty grzybowe MCO występujące głównie u *Ascomycota* m.in. u *Aspergillus nidulans* [90] odpowiedzialnie są za utlenianie dihydroksyfenylolaniny (DOPA) do dopachinonu podczas szlaku syntezy melaniny. Enzymy te różnią się istotnie od innych MCO w budowie regionu S2 [44]. Utleniają typowe substraty lakaz m.in. p-fenylendiaminy, pyrogallol, kwas gallusowy czy ABTS [89].

Do MCO zaliczane są również ferroksozydazy, charakteryzujące się powinowactwem do Fe (II), którego nie wykazują pozostałe wielomiedziowe oksydazy. Najczęściej opisywanymi ferroksoydazami są białko błony plazmatycznej u *Saccharomyces cerevisiae* (Fet3p) oraz ludzka ceruloplazmina (hCp) składająca się z sześciu domen. Na podstawie rentgenograficznych badań struktury krystalicznej ceruloplazminy ustalono, iż w drugiej, czwartej i szóstej domenie występuje miejsce wiązania miedzi, zaś pierwsza i szósta domena dzielą trójjądrowe międzypoddomenowe miejsce wiązania miedzi tworząc pseudosymetryczną strukturę C3 [61]. Cp wykazuje zdolność utleniania aromatycznych diamin i innych związków aromatycznych [85]. Ferroksozydazy odgrywają istotną rolę w homeostazie żelaza u drożdży i ssaków [86]. Fet3p uczestniczy w systemie transportowym Fe (II) o wysokim powinowactwie u drożdży. Początkowo Fe (III) jest redukowane do Fe (II) przez ferroksoydazę, po czym transportowane jest w komórce. Fet3p pełni rolę ochronną poprzez znoszenie cytotoksycznego działania miedzi i żelaza [26, 85].

Kolejnym przykładem MCO jest SLAC, czyli dwudomenowa wielomiedziowa oksydaza opisana u *Streptomyces coelicolor*, wykazująca zdolność do utleniania aromatycznych i niearomatycznych związków zawierających grupy aminowe i hydroksylowe. Ze względu na podobieństwo sekwencji do lakaz grzybowych, lecz mniejszy rozmiar, enzym ten określono jako mała lakaza. Na podstawie analizy porównawczej sekwencji białkowych ustalono podobieństwo SLAC i innych lakaz w pozycji ligandów metali. Stwierdzono natomiast występowanie 24 reszt histydyny w sekwencji SLAC, co może wskazywać na jej udział w wiązaniu nadwyżki wewnątrzkomórkowych jonów miedzi w celu przeniesienia ich podczas eksportu przez system sekrecyjny TAT [50]. SLAC charakteryzuje się opornością na związki redukujące oraz stabilnością termiczną. Ponadto enzym ten wykazuje najwyższą aktywność w środowisku o pH 9 [11, 50]. Dzięki tym cechom SLAC znalazły zastosowanie w przemyśle celulozowo-papierniczym do odbarwiania barwników [11].

5. Zastosowanie wielomiedziowych oksydaz

Z uwagi na zdolność utleniania wielu substratów, zewnątrzkomórkowy charakter i dosyć wysoką stabilność w szerokim zakresie pH i temperatury enzymy

z grupy MCO odznaczają się wysokim potencjałem aplikacyjnym. Enzymy z tej grupy znalazły jak dotąd zastosowanie w ochronie środowiska, medycynie, przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym oraz w przemyśle spożywczym. Głównie lakazy i enzymy lakazopodobne, które są najbardziej rozpowszechnioną i scharakteryzowaną grupą MCO, wykorzystywane są jako biokatalizatory reakcji syntezy nowych związków, detekcji, biotransformacji i biodegradacji toksycznych zanieczyszczeń (Tabela II).

Enzymy z grupy MCO stosowane są w wielu obszarach przemysłu spożywczego jak piekarnictwo, przetwórstwo warzyw i owoców, winiarstwo i browarnictwo. Przemysł piekarniczy powszechnie wykorzystuje lakazy do poprawy struktury chleba, a także polepszenia smaku i trwałości ciast [73]. Udowodniono jednak, że także inne MCO takie jak oksydaza bilirubinowa mogą być stosowane w celu sieciowania biopolimerów poprawiając właściwości fizykochemiczne produktów spożywczych [98]. Proces ten zwiększa wytrzymałość i stabilność ciasta obniżając zarazem jego lepkość. Efekt ten zaobserwowano zwłaszcza w przypadku korzystania z gorszej jakości mąk [51]. MCO stosuje się np. do sieciowania arabinoksyalanów, dzięki czemu utworzona sieć poprzecznych wiązań polimerów wpływa pozytywnie na miękisz i chrupkość pieczywa [40]. Lakazy, zamiast fizycznych adsorbentów jak SO_2 , mogą być wykorzystywane do eliminacji niepożądanych pochodnych fenolowych, powodujących ciemnienie i zmętnienie soków owocowych, piw i win [13, 40]. W ostatnim czasie pojawiły się nowe doniesienia wskazujące możliwe zastosowanie MCO wyizolowanych z hodowli bakterii fermentacji mlekowej m.in. do usuwania amin biogennych z wina i niektórych wytworów kuchni orientalnej [2, 8, 25]. Wykorzystanie MCO w przemyśle spożywczym jest dość powszechne. Preparaty dostępne na rynku, takie jak Falouvorstar, Suberace, LACCASE Y120, których działanie opiera się na aktywności lakazy są z powodzeniem stosowane w piwowarstwie, produkcji korków dla przemysłu winiarskiego i polepszaniu walorów kolorystycznych wyrobów spożywczych [40].

Enzymy z grupy MCO stosowane są jako biokatalizatory w reakcjach otrzymywania wielu substancji aktywnych wchodzących w skład chemii gospodarczej, produktów do pielęgnacji ciała oraz leków charakteryzujących się działaniem przeciwdrobnoustrojowym i przeciwutleniającym [79, 93]. Takie działanie wykazuje jod cząsteczkowy (I_2), którego otrzymywanie poprzez utlenienie I^- opisano dla MCO wyizolowanych z hodowli *Alphaproteobacterium* sp. Q-1 i *Roseovarius* sp. A-2 [81, 88]. Silną aktywność przeciwgrzybiczą udowodniono także dla jodowanych związków fenolowych otrzymywanych w reakcji katalizowanej przez lakazę [31, 78]. Lakazy z powodzeniem wykorzystywane są

Tabela II
Wybrane reakcje syntezy, detekcji i biodegradacji katalizowane przez enzymy z grupy MCO

Obszar zastosowań	Enzym, aktywność	Organizm źródłowy	Substrat, katalizowana reakcja	Warunki reakcji, efektywność procesu	Piśmiennictwo
Biodegradacja ksenobiotyków	Wielomiedziowa oksydaza (1,5 U/mL)	<i>Spirulina platensis</i> CFTRI	Reactive Blue 4 (100 mg/L)	96%; 4 godz.	[1]
	Lakaza	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Atrazyna, pentachlorofenol, naproksen, oksybenzon (0,5 mg/L)	60–99%; 24 godz.; Wanimilina	[3]
	Oksydaza bilirubinowa	<i>Magnaporthe oryzae</i>	Remazol Brilliant Blue R (80 mg/L)	95%; 20 min.; ABTS	[14]
	Płyn pochodowlany zawierający lakazy (100 U/L)	<i>Pycnoporus sanguineus</i> CS43	Bisfenol A, 4-nonylofenol, tricolsan (10 mg/L)	89–100%; 5 godz.	[22]
	Lakaza (3 U/mL)	<i>Phoma</i> sp. UHH 5-1-03	Sulfametaksazol (0,25 mM)	87%; 22 godz.	[27]
	Lakaza (0,05 U/mL)	<i>T. versicolor</i>	Chloropiryfos, atrazyna, chlorotalonil, pirymetanol (20 mg/L)	90–100%; 24 godz. – 8 dni	[38]
	Oksydaza bilirubinowa	<i>Myrothecium</i> sp. IMERI	Remazol Brilliant Blue R (80 mg/L)	91,5%; 25 min.; ABTS	[48]
	Lakazopodobna wielomiedziowa oksydaza (2 U/mL)	<i>Streptomyces</i> sp. C1	Indigo Carmine, Diamond Black PV	56–84%; 2 godz.; aldehyd syringowy	[49]
	Lakaza (100 U/L)	<i>Pycnoporus sanguineus</i> CS43	2,4-dichlorofenol, β -nonylofenol (10 mg/L)	71–97%; 8 godz.	[75]
	Lakaza immobilizowana (1 U/mL)	<i>Trametes pubescens</i> Cui 7571	Acid Black 172 (50 mg/L)	69%; 48 godz.	[100]
Reakcje syntezy i polimeryzacji	Lakaza	<i>Trametes versicolor</i>	Kwas 4-metylo-3-hydroksyantranilowy	Synteza aktywny (składnika aktywny); pH 5, immobilizacja w żelu poliakrylamidowym	[63]
	Lakaza	<i>Myceliophthora thermophila</i>	etylo-1,4-hydrochinon, 2,3-dimetylo-1,4-hydrochinon	Synteza antybiotyków β -laktamowych;	[56]
	Lakaza (350 U/mg)	<i>Coriolus hirsutus</i>	Anilina (50 mM)	Polimeryzacja aniliny w obecności sulfonowanego polistyrenu (SPS) jako matrycy w pH 3.5 – 4.4	[42]
	Lakaza	<i>Trametes pubescens</i>	Biosynteza dimerów totarolu	pH 4.5–5, 30°C, 62.6% konwersja totarolu po 24 h	[62]
	Lakaza (0,29 U/mL)	<i>Aspergillus oryzae</i>	Detekcja luteoliny	Immobilizacja z chlorkiem cyjanurowym (CC) w chitozanie	[20]
Reakcje detekcji	Płyn pochodowlany zawierający lakazę (31,5 U/mL)	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Detekcja adrenaliny i dopaminy	Adsorpcja na węglu aktywnym; pH 7,0	[47]
	Oksydaza bilirubinowa (50 U)	<i>Myrothecium verrucaria</i>	Detekcja bilirubiny	Immobilizacja na naocząstkach złota, pH 8,4	[41]
	Kompleks dehydrogenazy glutaminianowe i lakazy	<i>Coriolus hirsutus</i>	Detekcja morfiny	Immobilizacja w poli (alkoholu winylowym); pH 6,5	[5]

również jako biokatalizatory w syntezie leków m.in. antybiotyków β -laktamowych i substancji przeciwnowotworowych np. winblastyny lub mitomycyny [45, 56]. Od 2006 roku, kiedy to po raz pierwszy wykazano aktywność antyproliferacyjną lakazy, trwają intensywne badania nad wykorzystaniem tego enzymu jako czynnika przeciwnowotworowego [92]. Zdolność do hamowania podziałów komórek raka piersi, wątroby, jelita grubego i prostaty udowodniono wobec lakaz pochodzących od różnych gatunków podstawczaków [68, 70]. Zastosowanie lakazy wytwarzanej przez *Cerrena unicolor* w leczeniu nowotworów krwi oraz raka szyjki macicy zostało wykazane i objęte ochroną patentową [37, 54]. Enzym dodany w odpowiednim stężeniu charakteryzował się silnie cytotoksycznym działaniem wobec komórek raka szyjki macicy linii SiHa i CaSki, jednocześnie nie wpływając niekorzystnie na komórki fibroblastyczne stanowiące układ odniesienia [59]. Ten sam enzym działał proapoptotycznie na komórki nowotworów krwi linii Jurkat oraz RPMI 8226 [55]. MCO mogą również działać przeciwwirusowo. Lakaza grzyba *Lentinus tigrinus* hamuje aktywność odwrotnej transkryptazy HIV-1, bez której wirus nie jest zdolny transkrybować materiału genetycznego z RNA na DNA [96].

MCO mogą być wykorzystane do celów analitycznych m.in. testów biologicznych, enzymatycznych i immunochemicznych [94]. Lakazę wykorzystuje się do wykrywania obecności morfiny [5]. Z kolei biosensory oparte na oksydazie bilirubinowej (BOD) zaprojektowane w celu dokładnego określenia poziomu bilirubiny, której zbyt wysokie stężenie w ludzkiej surowicy jest śmiertelne, charakteryzują się wysoką czułością i skutecznością [28]. Co więcej oksydaza bilirubinowa i oksydaza askorbinianowa zostały wykorzystane do badań klinicznych, których celem było wyeliminowanie efektu askorbinianu, który niekorzystnie oddziaływał na wątrobę [76]. Aktywność katalityczną MCO, której towarzyszy redukcja tlenu do cząsteczek wody, wykorzystuje się do pozyskania elektronów, czyli siły napędowej bioogniw [52, 77].

Lakaza w przemyśle kosmetycznym służy do produkcji barwników i może być stosowana w nietoksycznych farbach do włosów zamiast czynnika utleniającego – nadtlenu wodoru [4]. Takie preparaty są wygodniejsze w użyciu i mniej drażniące dla organizmu z uwagi na zastąpienie czynnika utleniającego, który osłabia włosy i niszczy ich strukturę [13]. Co więcej lakazy, poprzez zmniejszenie zawartości melaniny, mogą być wykorzystywane w preparatach rozjaśniających skórę [40].

Biosynteza barwników z wykorzystaniem lakazy stanowi przyjazną dla środowiska alternatywę do chemicznej syntezy barwników tekstylnych i pozwala zredukować koszty procesu. Substancje otrzymane w ten sposób odznaczają się szeroką gamą barw i trwałością porównywalną z barwnikami syntetycznymi [33].

Z drugiej strony enzymy te można wykorzystywać także do odbarwiania tkanin (np. jeansu) lub przekształcania prekursorów barwników do ich aktywnych form, zwiększając wydajność procesu barwienia [66]. Pozwala to na ograniczenie użycia chemicznych wybielaczy i jest szczególnie użyteczne dla tkanin wrażliwych na związki chemiczne [94].

Dzięki zdolności usuwania toksycznych fenoli powstających podczas degradacji ligniny lakazy uczestniczą w reakcjach jej depolimeryzacji [93]. Dodatkowo enzymy te mogą być użyteczne w modyfikacji włókien celulozowych [40]. W celu usprawnienia procesów utleniania niefenolowych związków działanie lakaz wspomagane jest mediatorami np. ABTS, TEMPO, HBT. Jednak największym ograniczeniem pozostaje koszt syntetycznych mediatorów [94].

W procesach bioremediacji skażonych terenów szczególne zastosowanie znalazły lakazy, głównie pochodzenia grzybowego [36]. Enzymy te stosowane są zarówno w formie wolnej, jak i immobilizowanej do eliminacji szerokiego spektrum toksycznych związków takich jak: związki fenolowe, chlorofenole, cykliczne węglowodory aromatyczne, alkeny wchodzących w skład m.in. pestycydów. Enzymy z grupy MCO mogą być również wykorzystywane w unieszkodliwianiu związków zaliczanych do grupy tzw. modulatorów hormonalnych (EDCs), czyli związków niekorzystnie wpływających na działanie układu wewnątrzwydzielniczego ludzi i zwierząt [58]. Badania przeprowadzone przez Garcia-Morales i wsp. [22] wykazały wysoką wydajność biokatalityczną mieszaniny białek (LacI i LacII) grzyba *Pycnoporus sanguineus* CS43, którą wykorzystano do biotransformacji EDCs takich jak bisfenol A, 4-nonylofenol, 17- α -etynyloestradiol i triklosan. Szeroko zbadane zostały również możliwości wielu lakaz, enzymów LMCO oraz oksydazy bilirubinowej w dekoloryzacji barwników przemysłowych i eliminacji ich ze ścieków [34, 94]. Na przykład surowy ekstrakt lakaz pochodzący z grzyba *P. nebrodensis* wykazywał efektywną dekoloryzację (82,69%) zieleni malachitowej już po godzinie inkubacji [99].

6. Podsumowanie

Białka MCO to enzymy, zawierające od jednego do sześciu atomów miedzi w cząsteczce. Do grupy wielomiedziowych oksydaz zaliczane są lakazy, ferroksozydazy, oksydaza askorbinianowa, oksydaza bilirubinowa, niektóre pigmenty grzybowe o charakterze wielomiedziowych oksydaz oraz tzw. enzymy lakazo-podobne. MCO posiadają zdolność do utleniania zarówno związków organicznych, jak i nieorganicznych. Reakcjom katalizowanym przez MCO towarzyszy redukcja tlenu cząsteczkowego do wody. Właściwości te czynią je

cennym narzędziem w procesach bioremediacji, medycynie, przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym oraz w przemyśle spożywczym.

Podziękowania

Artykuł powstał w wyniku realizacji projektu finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki w Krakowie przyznanych na podstawie umowy nr UMO-2017/27/N/NZ9/02160.

Piśmiennictwo

- Afreen S., Shamsi T.N., Baig M.A., Ahmad N., Fatima S., Qureshi M.I., Hassan M.I., Fatma T.: A novel multicopper oxidase (laccase) from cyanobacteria: Purification, characterization with potential in the decolorization of anthraquinonic dye. *PLoS One*, **12**, e0175144 (2017)
- Alvarez M.A., Moreno-Arribas M.A.: The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends Food Sci. Technol.* **39**, 146–155 (2014)
- Ashe B., Nguyen L.N., Hai F.I., Lee D., Van De Merwe J.P., Leusch F.D.L., Price W.E., Nghiem L.D.: Impacts of redoxmediator type on trace organic contaminants degradation by laccase: Degradation efficiency, laccase stability and effluent toxicity. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, **113**, 169–176 (2016)
- Bartosiak M., Cieślak A.: Zastosowanie grzybowej lakazy w procesie bioremediacji (w) Biotechnologia w analizie, ochronie środowiska, medycynie i przemyśle, red. K. Kropiwek, M. Szala, Fundacja na rzecz promocji nauki i rozwoju TYGIEL, Lublin, 2015, s. 41–52
- Bauer C.G., Kühn A., Gajovic N., Skorobogatko O., Holt P.J., Neil C., Bruce N.C., Makower A., Lowe C.R., Scheller F.W.: New enzyme sensors for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase. *Fresenius J. Anal. Chem.* **364**, 179–183 (1999)
- Brander S., Mikkelsen J.D., Kepp K.P.: Characterization of an Alkali- and Halide-Resistant Laccase Expressed in *E. coli*: CotA from *Bacillus clausii*. *PLoS One*, **9**, e99402 (2014)
- Brijwani K., Rigdon A., Vadlani P.V.: Fungal laccases: production, function, and applications in food processing. *Enzyme Res.* DOI:10.4061/2010/149748 (2010)
- Callejón S., Sendra R., Ferrer S., Pardo I.: Identification of a novel enzymatic activity from lactic acid bacteria able to degrade biogenic amines in wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 185–198 (2014)
- Chaurasia P.K., Bharati S.L., Singh S.K.: Comparative studies on the blue and yellow laccases. *Res. Plant Stud.* **1**, 32–37 (2013)
- Christenson A., Shleev S., Mano N., Heller A., Gorton L.: Redox potentials of the blue copper sites of bilirubin oxidases. *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 1634–1641 (2006)
- Cook R., Hannon D., Southard J.N., Majumdar S.: Small laccase from *Streptomyces coelicolor*-an ideal model protein/enzyme for undergraduate laboratory experience. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* DOI:10.1002/bmb.21102 (2017)
- Copete L.S., Chanagá X., Barriuso J., López-Lucendo M.F., Martínez M.J., Camarero S.: Identification and characterization of laccase-type multicopper oxidases involved in dye-decolorization by the fungus *Leptosphaerulina* sp. *BMC Biotechnology*, DOI:10.1186/s12896-015-0192-2 (2015)
- Desai S.S., Nityanand C.: Microbial laccases and their applications: a review. *Asian J. Biotechnol.* **3**, 98–124 (2011)
- Durand F., Gounel S., Kjaergaard C.H., Solomon El., Mano N.: Bilirubin oxidase from *Magnaporthe oryzae*: an attractive new enzyme for biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **96**, 1489–1498 (2012)
- Dwivedi U.N., Singh P., Pandey V.P., Kumar A.: Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **68**, 117–128 (2011)
- Enguita F.J., Martins L.O., Henriques A.O., Carrondo M.A.: Crystal structure of a bacterial endospore coat component. A laccase with enhanced thermostability properties. *J. Biol. Chem.* **278**, 19416–19425 (2003)
- Fernandes A.J.T.: Insight into the Multicopper Oxidases. Dissertation presented to obtain the PhD degree in Biochemistry at the Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa (2011)
- Fernandes T.A.R., da Silveira W.B., Passos F.M.L., Zucchi T.D.: Laccases from *Actinobacteria* – what we have and what to expect. *Adv. Microbiol.* **4**, 285–296 (2014)
- Forte S., Polak J., Valensina D., Taddei M., Basosi R., Vanhulle S., Jarosz-Wilkolazka A., Pogni R.: Synthesis and structural characterization of a novel phenoxazinone dye by use of a fungal laccase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **63**, 116–120 (2010)
- Franzoi A.C., Vieira I.C., Dupont J., Scheeren C.W., de Oliveira L.F.: Biosensor for luteolin based on silver or gold nanoparticles in ionic liquid and laccase immobilized in chitosan modified with cyanuric chloride. *Analyst.* **134**, 2320–23528 (2009)
- Galhaup C., Goller S., Peterbauer C.K., Strauss J., Haltrich D.: Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology*, **148**, 2159–2169 (2002)
- García-Morales R., Rodríguez-Delgado M., Gomez-Mariscal K., Orona-Navar C., Hernandez-Luna C., Parra R., Cárdenas-Chávez D., Mahlknecht J., Ornelas-Soto N.: Biotransformation of Endocrine-Disrupting Compounds in groundwater: bisphenol A, nonylphenol, ethynylestradiol and triclosan by a laccase cocktail from *Pycnoporus sanguineus* CS43. *Water Air Soil Pollut.* **226**, 251–265 (2015)
- Giardina P., Vincenza Faraco V., Pezzella C., Piscitelli A., Vanhulle S., Sannia G.: Laccases: a never-ending story. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 369–385 (2010)
- Grass G., Thakali K., Klebba P.E., Thieme D., Müller A., Wildner G.F., Rensing Ch.: Linkage between catecholate siderophores and the multicopper oxidase CueO in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**, 5826–5833 (2004)
- Guarcello R., De Angelis M., Settanni L., Formiglio S., Gaglio R., Minervini F., Moschetti G., Gobbetti M.: Selection of amine-oxidizing dairy lactic acid bacteria and identification of the enzyme and gene involved in the decrease of biogenic amines. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**, 6870–6880 (2016)
- Hoegger P.J., Kilaru S., James T.Y., Thacker J.R., Kües U.: Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS J.* **273**, 2308–2326 (2006)
- Hofmann U., Schlosser D.: Biochemical and physicochemical processes contributing to the removal of endocrine-disrupting chemicals and pharmaceuticals by the aquatic ascomycete *Phoma* sp. UHH 5-1-03. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 2381–2399 (2016)
- Hooda V., Gahlaut A., Gothwal A., Hooda V.: Bilirubin enzyme biosensor: potentiality and recent advances towards clinical bioanalysis. *Biotechnol. Lett.* **39**, 1453–1462 (2017)
- Hullo M.F., Moszer I., Danchin A., Verstraete I.M.: CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *J. Bacteriol.* **183**, 5426–5430 (2001)
- Hssen J., Reiss R., Luchsinger R., Thöny-Meyer L., Richter M.: Biochemical properties and yields of diverse bacterial laccase-like multicopper oxidases expressed in *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* **12**, 10465 (2015)

31. Ihssen J., Schubert M., Thöny-Meyer L., Richter M.: Laccase catalyzed synthesis of iodinated phenolic compounds with anti-fungal activity. *PLoS One*, **9**, e89924 (2014)
32. Janusz G., Kucharzyk K.H., Pawlik A., Staszczak M., Paszczynski A.J.: Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression and regulation. *Enzyme Microb. Technol.* **52**, 1–12 (2013)
33. Jarosz-Wilkolazka A., Polak J., Olszewska A.: Method of obtaining synthetic dyes. Nr patentu PL213247 (B1), Nr zgłoszenia PL385790 (A1), Właściciel: Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Data wydania decyzji 2012-09-25
34. Jasińska A., Góralczyk A., Długoński J.: Dyes decolourisation and degradation by microorganisms (w) Microbial biodegradation: from omics to function and application, red. J. Długoński, Caister Academic Press, Norflok, UK, 2016, s. 119–141
35. Jasińska A., Góralczyk A., Soboń A., Długoński J.: Novel laccase-like multicopper oxidases from the *Myrothecium roridum* fungus – production enhancement, identification and application in the dye removal process. *Acta Biochim. Pol.* **65**, 287–295 (2018)
36. Jasińska A., Różalska S., Bernat P., Paraszkiwicz K., Długoński J.: Malachite green decolorization by non-basidiomycete filamentous fungi of *Penicillium pinophilum* and *Myrothecium roridum*. *Int. Biodeter. Biodegr.* **73**, 33–40 (2012)
37. Jaszek M., Matuszewska A., Osińska-Jaroszuk M., Janusz G., Sulej J., Stefaniuk D., Giannopoulos K., Karp.: Laccase enzyme isolated from *Cerrena unicolor* fungus to be applied in treatments of blood neoplastic diseases. Nr patentu PL225934 (B1), Nr zgłoszenia PL406228 (A1), Właściciel: Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Data wydania decyzji 2016-12-16
38. Jin X., Yu X., Zhu G., Zheng Z., Feng F., Zhang Z.: Conditions optimizing and application of laccase-mediator system (LMS) for the laccase-catalyzed pesticide degradation. *Sci. Rep.* **24**, 35787 (2016)
39. Jones S.M., Solomon E.I.: Electron transfer and reaction mechanism of laccases. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 869–883 (2015)
40. Kaczmarek M.B., Kwiatos N., Szczęsna-Antczak M., Bielecki S.: Laccases – enzymes with an unlimited potential. *Biotechnol. Food Sci.* **81**, 41–70 (2017)
41. Kannan P., Chen H., Lee V.T., Kim D.H.: Highly sensitive amperometric detection of bilirubin using enzyme and gold nanoparticles on sol-gel film modified electrode. *Talanta*, **86**, 400–407 (2011)
42. Karamyshev A., Sergey V.S., Koroleva O., Yaropolov A., Sakharov I.Y.: Laccase-catalyzed synthesis of conducting polyaniline. *Enzyme Microb. Technol.* **33**, 556–564 (2003)
43. Kosman D.J.: Multicopper oxidases: a workshop on copper coordination chemistry, electron transfer, and metallophysiology. *J. Biol. Inorg. Chem.* **15**, 15–28 (2010)
44. Kües U., Rühl M.: Multiple multi-copper oxidase gene families in *Basidiomycetes* – What for? *Curr. Genomics*, **12**, 72–94 (2011)
45. Kunamneni A., Ballesteros A., Plou F.J., Alcalde M.: Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications (w) communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology, red. A. Mendez-Vilas, Formatex, Badajoz, 2007, s. 233–245
46. Lang M., Braun C.L., Kanost M.R., Gorman M.J.: Multicopper oxidase-1 is a ferroxidase essential for iron homeostasis in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 13337–13342 (2012)
47. Leite O.D., Fatibello-Filho O., Barbosa A. de M.: Determination of catecholamines in pharmaceutical formulations using a biosensor modified with a crude extract of fungi laccase (*Pleurotus ostreatus*). *J. Braz. Chem. Soc.* **14**, 297–303 (2003)
48. Liu Y., Huang J., Zhang X.: Decolorization and biodegradation of remazol brilliant blue R by bilirubin oxidase. *J. Biosci. Bioeng.* **108**, 496–500 (2009)
49. Lu L., Zeng G., Fan Ch., Ren X., Wang C., Zhao Q., Zhang J., Chen M., Chen A., Jiang M.: Characterization of a laccase-like multicopper oxidase from newly isolated *Streptomyces* sp. C1 in agricultural waste compost and enzymatic decolorization of azo dyes. *Biochem. Eng. J.* **72**, 70–76 (2013)
50. Machczyński M.C., Vijgenboom E., Samyn B., Canters G.W.: Characterization of SLAC: a small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity. *Protein Sci.* **13**, 2388–2397 (2004)
51. Madhavi V., Lele S.S.: Laccase properties and applications. *Bio-Resources*, **4**, 1694–1717 (2009)
52. Mano N., Edembe L.: Bilirubin oxidases in bioelectrochemistry: features and recent findings. *Biosens. Bioelectron.* **15**, 478–485 (2013)
53. Martins L.O., Paulo Durão P., Brissos V., Lindley P.F.: Laccases of prokaryotic origin: enzymes at the interface of protein science and protein technology. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 911–922 (2015)
54. Matuszewska A., Jaszek M., Janusz G., Osińska-Jaroszuk M., Sulej J., Stefaniuk D., Rogalski J., Mizerska-Dudka M., Kandefer-Szerszeń M.: Laccase enzyme isolated from *Cerrena unicolor* fungus to be applied in the cervical carcinoma treatment. Nr patentu PL225869 (B1), Nr zgłoszenia PL406573 (A1), Właściciel: Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Data wydania decyzji 2016-12-13
55. Matuszewska A., Karp M., Jaszek M., Janusz G., Osińska-Jaroszuk M., Sulej J., Stefaniuk D., Tomczak W., Giannopoulos K.: Laccase purified from *Cerrena unicolor* exerts antitumor activity against leukemic cells. *Oncol. Lett.* **11**, 2009–2018 (2016)
56. Mikolasch A., Hildebrandt O., Schluter R., Hammer E., Witt S., Lindequist U.: Targeted synthesis of novel α -lactam antibiotics by laccase-catalyzed reaction of aromatic substrates selected by pre-testing for their antimicrobial and cytotoxic activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 4885–4899 (2016)
57. Mikolasch A., Wurster M., Lalk M., Witt S., Seefekdt S., Hammer E., Schauer F., Julich W.D., Lindequist U.: Novel β -lactam antibiotics synthesized by amination of catechols using fungal laccase. *Chem Pharm. Bull.* **56**, 902–907 (2008)
58. Minussi R.C., Miranda M.A., Silva J.A., Ferreira C.V., Aoyama H., Marangoni S., Rotilio D., Pastore G.M., Durán N.: Purification, characterization and application of laccase from *Trametes versicolor* for colour and phenolic removal of olive mill wastewater in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *Afr. J. Biotechnol.* **6**, 1248–1254 (2007)
59. Mizerska-Dudka M., Jaszek M., Błachowicz A., Rejczak T.P., Matuszewska A., Osińska-Jaroszuk M., Stefaniuk D., Janusz G., Sulej J., Kandefer-Szerszeń M.: Fungus *Cerrena unicolor* as an effective source of new antiviral, immunomodulatory, and anti-cancer compounds. *Int. J. Biol. Macromol.* **79**, 459–568 (2015)
60. Murao S., Itoh H., Yajima T., Ozaki Y., Fukuyasu S., Shin T.: Isolation and purification of ascorbate oxidase from *Acremonium* sp. HI-25. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 847–852 (2014)
60. Nakamura K., Go N.: Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2050–2066 (2005)
61. Ncanana S., Baratto L., Roncaglia L., Riva S., Burton S.G.: Laccase-mediated oxidation of totarol. *Adv. Synth. Catal.* **349**, 1507–1513 (2007)
62. Osiadacz J., Al-Adhami A.J.H., Bajraszewska D., Fischer P., Peczyńska-Czoch W.: 1999. On the use of *Trametes versicolor* laccase for the conversion of 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid to actinocin chromophore. *J. Biotechnol.* **72**, 141–149 (1999)
63. Perna A., Agger J.W., Holck J., Meyer A.S.: Multiple reaction monitoring for quantitative laccase kinetics by LC-MS. *Scientific Rep.* **8**, 8114 (2018)

64. Perry C.R., Smith M., Britnell C.H., Wood D.A., Thurston C.F.: Identification of two laccase genes in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 1209–1218 (1993)
65. Polak J., Jarosz-Wilkolazka A.: Reakcje katalizowane przez lakazę – mechanizm i zastosowanie w biotechnologii. *Biotechnologia*, **4**, 82–94 (2007)
66. Potti R.B., Rajasekhar P., Subramanyam K.: Occurrences, physical and biochemical properties of laccase. *U.J.E.R.T.* **2**, 1–13 (2012)
67. Qianqian M., Miao L., Hexiang W.: Purification and characterization of a laccase with antiproliferative activity from *Coriolus versicolor*. *Acta Edulis Fungi*, **17**, 43–47 (2010)
68. Rajeswari M.: Characterization and optimization of bacterial laccase production and its application in the degradation of selected pollutants, 24.11.2015, <http://shodhganga.inflibnet.ac.in/handle/10603/93386> (20.10.2018)
69. Rashid S., Unyayar A., Mazmanci MA, McKeown SR, Banat IM, Worthington J. A study of anti-cancer effects of *Funalia trogii* in vitro and in vivo. *Food Chem. Toxicol.* **49**, 1477–1483 (2011)
70. Reiss R., Ihssen J., Richter M., Eichhorn E., Schilling B., Thöny-Meyer L.: Laccase versus laccase-like multi-copper oxidase: a comparative study of similar enzymes with diverse substrate spectra. *PLoS One*, **8**, e65633 (2013)
71. Roberts S.A., Weichsel A., Grass G., Thakali K., Hazzard J.T., Tollin G., Rensing Ch., Montfort W.R.: Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 2766–2771 (2002)
72. Rodriguez-Couto S., Toca-Herrera J.L.: Inhibitors of laccases: a review. *Curr. Enzym. Inhib.* **2**, 343–352 (2006)
73. Rodriguez-Couto S.: Fungal laccase in the textile industry (w) Fungal biomolecules: sources, applications and recent developments, red. V.K. Gupta, R.L. Mach, S. Sreenivasaprasad, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2015, s. 63–72
74. Rodríguez-Delgado M., Orona-Navar C., García-Morales R., Hernandez-Luna C., Parra R., Mahlknecht J., Ornelas-Soto N.: Biotransformation kinetics of pharmaceutical and industrial micropollutants in groundwaters by a laccase cocktail from *Pycnoporus sanguineus* CS43 fungi. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, **108**, 34–41 (2016)
75. Sakurai T., Kataoka K.: Basic and applied features of multicopper oxidases, CueO, bilirubin oxidase, and laccase. *Chem. Rec.* **7**, 220–229 (2007)
76. Sané S., Richter K., Rubenwolf S., Matschke N.J., Jolivalt C., Madzak C., Zengerle R., Gescher J., Kerzenmacher S.: Using planktonic microorganisms to supply the unpurified multi-copper oxidases laccase and copper efflux oxidases at a biofuel cell cathode. *Bioresour. Technol.* **158**, 231–238 (2014)
77. Schubert M., Ihssen J.: Wood protection against microorganisms by laccase-catalysed iodination. EP2871962A1EP, PCT/CH2013/000088 2013-11-28
78. Senthivelan T., Kanagaraj J., Panda R.C.: Recent trends in fungal laccase for various industrial applications: an eco-friendly approach – A review. *Biotechnol. Bioproc. E.* **21**, 19–38 (2016)
79. Shimada Y., Ko S.: Ascorbic acid and ascorbic acid oxidase in vegetables. *Chugokugakuen J.* **7**, 7–10 (2008)
80. Shiroyama K., Kawasaki Y., Unno Y., Amachi S.: A putative multicopper oxidase, IoxA, is involved in iodide oxidation by *Roseovarius* sp. strain A-2. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **79**, 1898–1905 (2015)
81. Shradhha, Shekher R., Sehgal S., Kamthania M., Kumar A.: Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme Res.* 217861 (2011)
82. Sirim D., Wagner F., Wang L., Schmid R.D., Pleiss J.: The laccase engineering database: a classification and analysis system for laccases and related multicopper oxidases. Database (Oxford) bar006. Published online 2011-04-15 DOI: 10.1093/database/bar006
83. Solano F., Lucas-ElióP, López-Serrano D., Fernández E., Sanchez-Amat A.: Dimethoxyphenol oxidase activity of different microbial blue multicopper proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* **204**, 175–181 (2001)
84. Solomon E.I., Sundaram U.M., Machonkin T.E.: Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* **96**, 2563–2605 (1996)
85. Stoj C., Kosman D.J.: Cuprous oxidase activity of yeast Fet3p and human ceruloplasmin: implication for function. *FEBS Lett.* **554**, 422–426 (2003)
86. Subramanian J., Ramesh T., Kalaiselvam M.: Fungal laccases – properties and applications: A Review. *Int. J. Pharm. Biol. Arch.* **2**, 8–16 (2014)
87. Suzuki M., Eda Y., Ohsawa S., Kanesaki Y., Yoshikawa H., Tanaka K., Muramatsu Y., Yoshikawa J., Sato I., Fujii T., Amachi S.: Iodide oxidation by a novel multicopper oxidase from the *Alphaproteobacterium* Strain Q-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 3941–3949 (2012)
88. Tamayo-Ramos J.A., Barends S., de Lange D., de Jel A., Verhaert R., de Graaff L.: Enhanced production of *Aspergillus niger* laccase-like multicopper oxidases through mRNA optimization of the glucoamylase expression system. *Biotechnol. Bioeng.* **2**, 543–551 (2013)
89. Tamayo-Ramos J.A., van Berkel W.J.H., de Graaff L.: Biocatalytic potential of laccase-like multicopper oxidases from *Aspergillus niger*. *Microb. Cell Fact.* **11**, 165–176 (2012)
90. Tasca F., Farias D., Castro C., Acuna-Rougier C., Antiochia R.: Bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria* physically adsorbed on graphite electrodes. Insights into the alternative resting form and the sources of activity loss. *PLoS One*, **10**, e0132181 (2015)
91. Unyayar A., Demirbilek M., Turkoglu M., Celik A., Mazmanci M.A., Erkurt E.A., Unyayar S., Cekic O., Atacag H.: Evaluation of cytotoxic and mutagenic effects of *Coriolus versicolor* and *Funalia trogii* extracts on mammalian cells. *Drug. Chem. Toxicol.* **29**, 69–83 (2006)
92. Upadhyay P., Shrivastava R., Agrawal P.K.: Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. *3 Biotech*, **6**, 1–12 (2016)
93. Viswanath B., Rajesh B., Janardhan A., Kumar A.P., Narasimha G.: Fungal laccases and their applications in bioremediation. *Enzyme Res.* 163242 (2014)
94. Xie N., Ruprich-Robert G., Silar P., Herbert E., Ferrari R., Chapeland-Leclerc F.: Characterization of three multicopper oxidases in the filamentous fungus *Podospora anserina*: A new role of an ABR1-like protein in fungal development? *Fungal Genet. Biol.* **116**, 1–13 (2018)
95. Xu F., Shin W., Brown S.H., Wahleithner J.A., Sundaram U.M., Solomon E.I.: A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. *Biochim. Biophys. Acta*, **1292**, 303–311 (1996)
96. Xu L.J., Wang H.X., Ng T.B.: A Laccase with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the broth of mycelial culture of the mushroom *Lentinus tigrinus*. *J. Biomed. Biotechnol.* 536725 (2012)
97. Yamaguchi S.: Method for cross-linking protein by using enzyme. No US6420148B2 US Grant 2002-01-24 Inventor
98. Yuan X., Tian G., Zhao Y., Zhao L., Wang H., Ng T.B.: Degradation of dyes using crude extract and a thermostable and pH-stable laccase isolated from *Pleurotus nebrodensis*. *Biosci. Rep.* DOI:10.1042/BSR20160163 (2016)
99. Zheng F., Cui B.-K., Wu X.-J., Meng G., Liu H.-X., Si J.: Immobilization of laccase onto chitosan beads to enhance its capability to degrade synthetic dyes. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, **110**, 69–78 (2016)

KATELICYDINY U LUDZI I ZWIERZĄT

Jakub Deptuła¹, Beata Tokarz-Deptuła^{2*}, Magdalena Malinowska-Borysiak²,
Michał Stosik³, Wiesław Deptuła⁴

¹Zakład Genetyki i Patomorfologii, Wydział Lekarski z Oddziałem Nauczania w języku angielskim,
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

²Katedra Immunologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński

³Katedra Mikrobiologii i Genetyki, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Zielonogórski.

⁴Centrum Weterynarii UMK w Toruniu

Wpłynęło w czerwcu, zaakceptowano w listopadzie 2018 r.

Streszczenie: Ważnymi peptydami odpornościowymi – HDP (Host Defence Peptides) o dużej aktywności biologicznej u ssaków, w tym człowieka i zwierząt kręgowych, są katelicydiny. Te stare ewolucyjnie cząsteczki efektorowe w tych organizmach, stanowią naturalne elementy odporności przeciwbakteryjnej, przeciwwirusowej, przeciwgrzybiczej i przeciw pasożytniczej, wobec których zarazki i pasożyty nie wykształciły oporności, co powoduje, że stają się one substancjami alternatywnymi dla antybiotyków. Katelicydiny u ludzi i zwierząt kręgowych, oddziałują na zarazki i pasożyty bezpośrednio oraz pośrednio poprzez aktywowanie układu odpornościowego.

Co to są peptydy odpornościowe. 2. Katelicydiny. 2.1. Katelicydiny u ludzi. 2.2. Katelicydiny u zwierząt. 3. Podsumowanie

CATELICIDINS IN HUMANS AND ANIMALS

Abstract: Cathelicidins are Important immunological peptides – HDP (Host Defence Peptides) with major biological activity in mammals, including human and vertebrate animals. These evolutionary ancient molecules in these organisms are natural elements of antimicrobial, antiviral, antifungal and antiparasitic immunity against which germs and parasites have not developed immunity, therefore making them alternatives to antibiotics. Cathelicidins in human and vertebrates affect the germs and parasites directly and indirectly by activating the immune system.

1. What are immune peptides? 2. Cathelicidins. 2.1. Cathelicidins in humans. 2.2. Cathelicidins in animals. 3. Summary

Słowa kluczowe: człowiek, katelicydiny, zwierzęta

Key words: human, cathelicidins, animals

1. Co to są peptydy odpornościowe

Peptydy odpornościowe – HDP (Host Defence Peptides), tworzą kompleks starych, ewolucyjnie zachowanych cząsteczek efektorowych, syntetyzowanych przez organizm ssaków (ludzie, zwierzęta – w tym torbacze i stekowce), ptaków, gadów, płazów, ryb, owadów i roślin. Na te substancje nawet mikroorganizmy na drodze ewolucji, nie wykształciły mechanizmu oporności, stąd HDP są określane często jako naturalne antybiotyki [36, 56, 60, 87, 89, 93, 94, 96, 108, 113, 118]. Stanowią one także ważny element odporności naturalnej będąc określane jako endogenne peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMP – Antimicrobial Peptides), które wykazują głównie bezpośrednie działanie wobec bakterii, wirusów, grzybów i *Protozoa*. Hamują u nich min. replikację DNA i RNA, syntezę białek i innych składników, np. w przypadku bakterii tyczą to w szczególności elementów ściany komórkowej.

Oddziałując stymulująco na układ odpornościowy ssaków, peptydy te pośrednio działają na zarazki i pasożyty makroorganizmów ssaczy, choć także ta droga ich działania warunkuje ich oddziaływanie przeciwnowotworowe [17, 18, 31, 33, 36, 47, 50, 56, 60, 64, 68, 89, 94, 108, 110, 118]. Zainteresowanie HDP rozpoczęło się w zasadzie w 1980 roku, kiedy odkryto cekropiny A i B u ćmy z gatunku *Hyalophora cecropia* [64, 94], choć badania w 1963 roku przyniosły już informacje o lizosomalnych białkach kationowych o działaniu przeciwdrobnoustrojowym [117]. W 1985 roku opisano ludzkie α -defensyny [84], a w 1987 roku, stwierdzono magaininy u żaby [116]. Obecnie znanych jest około 2900 naturalnych HDP, które cechują się bardzo zróżnicowaną budową i strukturą [7]. Przykładem HDP mogą być katelicydiny, zawierające od 12 do 80 reszt aminokwasowych i masę cząsteczkową wahającą się od 2 do 80 kDa. Nadto ze względu na obecność argininy i reszt lizyny, HDP mają ładunek dodatni, stąd

* Autor korespondencyjny: dr hab. Beata Tokarz-Deptuła, prof. US, Katedra Immunologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński, ul. Felczaka 3c, 71-412 Szczecin, e-mail: beata.tokarz-deptula@usz.edu.pl, tel. 91 444 16 10

określane są także jako peptydy kationowe [7, 18, 28, 36, 42, 56, 60, 64, 82, 96, 103, 108, 115]. Analizując budowę HDP oraz obecność mostków dwusiarczkowych i liczbę reszt aminokwasowych, wyróżnia się: 1) peptydy liniowe, posiadające budowę α -helikalną z brakiem wiązań dwusiarczkowych np.: katelicydyna LL-37 u ludzi; 2) peptydy o budowie β -kartki lub budowy szpilki do włosów, gdzie występują trzy lub więcej mostków dwusiarczkowych np.: niektóre α i β defensyny u ssaków; 3) peptydy o strukturze pętli z jednym mostkiem dwusiarczkowym np.: niektóre katelicydyny u przeżuwaczy; 4) peptydy bogate w aminokwasy takie jak tryptofan – np. indolicydyna u bydła, czy bogate w prolinę i argininę np.: katelicydyna PR-39 u świń [56, 69, 108, 119]. Znany jest także podział HDP ze względu na aktywność biologiczną, który wyróżnia: 1) peptydy działające na struktury bakteryjne np.: serprocydyny; 2) peptydy wiążące pierwiastki np.: kalprotektyna; 3) peptydy przerywające błonę bakteryjną np.: katelicydyny [69]. Na podstawie wielkości cząsteczki i trzyczłonowej struktury, wśród tych peptydów wyróżnia się tzw. „klasyczne” HDP, do których zaliczane są katelicydyny i defensyny [7]. Naturalne peptydy odpornościowe (HDP), mają amfipatyczną strukturę, która umożliwia im interakcję w szczególności z błoną patogenów – mającą ujemny ładunek elektryczny (-150 mV) natomiast występowanie w ich błonie min. fosfolipidów, powoduje że mają one dużą możliwość ich intensywnej penetracji, przez co powodują min. zmianę ich przepuszczalności i tworzenia w niej por [36, 42, 55, 56, 60, 64, 68, 82, 108, 118]. Badania z ostatnich lat wykazały, że wiele HDP, są bogato reprezentowane u ludzi i zwierząt, w tym gospodarskich. Szczególnymi miejscami (biotopami) ich występowania jest skóra oraz komórki nabłonkowe przewodu pokarmowego i układu oddechowego [9, 11, 34, 36, 38, 45, 48, 56, 63, 68, 69, 80, 87, 89, 118]. W tych biotopach, a w szczególności w przewodzie pokarmowym, „klasyczne” peptydy HDP u ludzi i zwierząt kręgowych, warunkują właściwą homeostazę tych ekosystemów, w tym ich mikrobiomu. Stan taki powoduje, że peptydy te wpływają na lokalną odporność tych organizmów (ludzi i zwierząt kręgowych), a w szczególności tyczy to jelit, gdzie wraz z defensynami syntetyzowanymi przez komórki *Panetha*, tworzą silną barierę przeciwarazkową [11, 12, 17, 28, 30, 38, 48, 49, 63, 68, 69, 75, 118].

2. Katelicydyny

Katelicydyny, stanowią grupę najstarszych ewolucyjnie białek działających jako cząsteczki prekursorowe, które po proteolizie uwalniają peptydy oddziałujące bezpośrednio na zarazki i pasożyty oraz pośrednio, immunomodulując układ odpornościowy ssaków,

wykazują także działanie przeciwnowotworowe [2, 3, 15, 18, 28, 60, 64, 70, 89, 101, 107, 110, 118]. Ich oddziaływanie m.in. na bakterie i grzyby wiąże się z przerywaniem błon komórkowych tych mikroorganizmów [69, 108, 110], zaś w przypadku wirusów oddziałują na ich osłonki i replikację [2, 21, 50, 69, 115]. Pierwsze katelicydyny u ssaków izolowano z neutrofilii bydła, jako mały cykliczny dodekapeptyd, którego nazwę utworzono od *bacterium necare* tzn. zabijający bakterie i nazwano go bakteneocyną [48, 108, 118]. Analogiczną substancję u świń nazwano protegryną [48, 108, 110, 118]. U ludzi pierwszą opisaną katelicydyną był peptyd hCAP (*human Cathelicidin Antibacterial Peptide*) albo hCAP18 (*human Cationic Antimicrobial Protein*), który obecnie nosi nazwę katelicydyna LL-37 [28, 110]. Katelicydyny są produkowane jako nieaktywne pre-pro-peptydy, składające się z 128–143 reszt aminokwasowych. Posiadają wysoce konserwatywną domenę N-końcową – będącą peptydem sygnałowym, domenę katelinową o masie cząsteczkowej 11 kDa oraz C-końcowy zmienny rejon, który jest „dojrzałym” peptydem, co warunkuje, min. protranskrypcyjną regulację ich syntezy i zabezpiecza je przed niekontrolowaną aktywnością [28, 96, 108, 110]. Sama część N-końcowa sekwencji sygnałowej, posiada 29–30 reszt aminokwasowych, której zadaniem jest uwalnianie aktywnego biologicznie peptydu [28, 108, 110]. Natomiast domena katelinowa zbudowana z 94–144 reszt aminokwasowych, jest odpowiedzialna za ochronę przed proteolizą [48], którą opisano po raz pierwszy w leukocytach świni [48, 78]. Zarejestrowano, że domena katelinowa łączy się ze stanowiącym dojrzały peptyd odcinkiem C-końcowym, składającym się z 12–100 reszt aminokwasowych, co razem stanowi pro-peptyd, a w wyniku działania endogennych proteaz, takich jak proteinaza 3, azurofilna, czy gastryny, uwalniany jest dojrzały peptyd [96]. Wykazano, że sekwencje domeny katelinowej u różnych gatunków ssaków, w tym ludzi, są bardzo do siebie podobne, co sugerować może, że peptydy te mogły ewoluować w wyniku powielania i modyfikacji wspólnego genu [28].

Katelicydyny stwierdzono i opisano u ludzi i małp, a także u zwierząt domowych i gospodarskich – to jest bydła, owiec, kóz, świń, koni, psów, kotów; zwierząt laboratoryjnych – królików, szczurów, myszy, świnek morskich; zwierząt dzikich – to jest jeleni, wołów z rodziny krętorogich, osłów, pand, torbaczy i stekowców, a także u ptaków, ryb, gadów, płazów i owadów [6, 10, 19, 25, 46, 48, 52, 53, 56, 64, 69, 75, 86, 88, 96, 97, 99, 100, 102, 108, 111, 114, 116, 118, 119]. U ludzi opisano tylko jedną katelicydynę, natomiast u zwierząt przyjmuje się, że jest ich więcej. Według wielu autorów [10, 24, 48, 52, 56, 62, 75, 86, 88, 96, 106, 108, 112, 113], u świń jest ich 11, u owiec 7–10, u bydła 4–8, u ryb po 2–6, u kur 4–5, u kóz 2–4, u małp – 4, u koni i królików – 3, u dziobaka – 2, zaś kotów, psów, myszy,

szczurów, świnek morskich, pand i jeleni po 1. Dwie katelicydyny (HFIAP-1 i HFIAP-3), wykazano także u takich prymitywnych zwierząt jak śluzice, u których w domenie katelinowej, podobnie jak u ssaków, ptaków i ryb, zachowane jest rozmieszczenie czterech reszt cysteiny, choć domena katelinowa u śluzic wykazuje bardzo niskie podobieństwo do domeny katelinowej u innych zwierząt [48, 99, 108, 111]. Najbardziej znanymi katelicydynami u ssaków jest katelicydyna u ludzi, która jest odmienna od tych peptydów odpornościowych u ryb, płazów i owadów [96].

2.1. Katelicydyny u ludzi

Peptydy te u ludzi są reprezentowane przez katelicydynę LL-37, która charakteryzuje się strukturą liniową o budowie α -helikalnej [2, 118]. Może występować w postaci monomeru, dimeru lub tetrameru [74, 76], tworząc kationowe, amfipatyczne struktury, zbudowane z trzech części [74, 76]. Jest to: N-końcowa i C-końcowa część α -helisy oraz regionu na C-końcu, przy czym α -helisa na N-końcu, uczestniczy w oligomeryzacji peptydu oraz zapewnia cząsteczkę oporność na działanie proteaz, gdyż odcinek C-końcowy, jest ważny dla powstawania tetramerów [101, 110]. Początkowo katelicydyna LL-37 nazywana była hCAP18, co odnosiło się do peptydu o wielkości do 18 kDa, który zawierał dwa dwusiarczkowe wiązania pomiędzy resztą cysteiny C85-C96 i C107-C124, powstającego przez zewnątrzkomórkową proteolizę C-końcowego ludzkiego CAP (Cationic Antimicrobial Protein) [110]. W momencie kiedy stwierdzono, że peptyd ten składa się z 37 aminokwasów zaczynających się od dwóch leucyn, zmieniono nazwę z hCAP18 na LL-37. Obecnie hCAP18 odnosi się tylko do propeptydu, podczas gdy samo LL-37, oznacza dojrzały peptyd posiadający plejotropowe właściwości po uwolnieniu z C-końca hCAP18. Ludzka katelicydyna – peptyd LL-37, jest kodowana przez gen CAMP (Cathelicidin Antimicrobial Peptide), który znajduje się w locus 21 chromosomu 3 (3p21.3) [110]. Peptyd LL-37 jest syntetyzowany w organizmie człowieka, w odpowiedzi na infekcje bakteryjne, wirusowe i grzybicze albo jest skutkiem działania elastazy neutrofilów, która nie aktywuje jego peptydów nagromadzonych w ziarnistościach granulocytów, a rozkłada je na aktywne składowe, wydzielane z tych komórek [97]. Peptyd LL-37 u ludzi pojawia się już na bardzo wczesnym etapie rozwoju, bo wykryto go już u noworodków w skórze i tchawicy [61, 81]. U dorosłych osobników ulega on ekspresji m.in. w nabłonku przewodu pokarmowego, w tym w nabłonku jamy ustnej i jelit [28] oraz dróg oddechowych [11, 27, 28, 30, 32, 33, 34], a także keratynocytach [33, 66, 118]. Jest on także syntetyzowany w neutrofilach, w monocytach – makrofagach, komórkach NK, tucznych, dendrytycznych i limfocytach T i B, a także ko-

mórkach nabłonka spojówek, dróg moczowo-płciowych i żółciowych oraz w wątrobie, szyjce macicy, pochwie, najądrzach, jądrach i jest stwierdzany także w osoczu krwi, ślinie, pocie, nasieniu oraz wydzielinie w tchawicy [4, 6, 8, 16, 22, 26, 28, 33, 48, 65, 66, 74, 92, 107, 118]. Peptyd LL-37 w neutrofilach, w odpowiedzi na bakterie lub ich produkty, jest wytwarzany konstytutywnie, zaś w monocytach-makrofagach, komórkach NK, tucznych, limfocytach T i B, enterocytach i keranocytach, powstaje dopiero wskutek oddziaływania cytokin prozapalnych (TNF, IL1 α , IL-6, IL-17A, IFN- γ), czynników wzrostu (IGF-1) oraz wskutek działania aktywnej postaci witaminy D [2, 73, 92, 101, 118]. Badania dowiodły, że w wyniku proteolitycznego działania proteaz serynowych, które reprezentują rodzinę kalikrein tkankowych, powstają pochodne peptydu LL-37, co wskazuje na jego niejednorodność [112]. Stwierdzono, że na skutek działania SCTE (Stratum Corneum Tryptic Enzyme), tworzą się trzy peptydy – to jest KS30, KS22 oraz LL29, zaś pod wpływem działania SCCE (Stratum Corneum Chymotryptic Enzyme), powstają dwa peptydy – RK31 i KR20. Stąd przyjmuje się, że peptyd LL-37, stanowi jedynie 20% katelicydyn u ludzi, natomiast reszta to jego pochodne, wykazujące tak właściwości przeciwdrobnoustrojowe jak i modulujące komórki układu odpornościowego oraz oddziałują na komórki nabłonkowe i keratynocyty [18, 20, 33, 35, 54, 64, 96, 108, 112].

Działanie przeciwbakteryjne peptydu LL-37, wiąże się z jego wysokim stężeniem i obecnością dwuwartościowych jonów [18, 64]. U kobiety w drogach rodnych (pochwa), wśród jego pochodnych, opisano peptyd ALL-38, który jest bardzo ważnym elementem obronności tego odcinka [21, 96, 108]. Peptyd LL-37, oprócz wspomnianego działania przeciwarzakowego i modulującego układ odpornościowy, cechuje się aktywnością pro- i przeciwzapalną, proangiogenną i antyapoptyczną oraz przeciwnowotworową [2, 15, 18, 28, 33, 41, 59, 64, 70, 89, 101, 107, 118]. Wobec bakterii i wirusów posiadających osłonkę, a także grzybów, wykazuje on silne działanie bezpośrednie [50, 69, 104, 108, 110]. Na ten peptyd, w szczególności są wrażliwe bakterie Gram-dodatnie m.in. *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Bacillus* spp., *Lactobacillus acidophilus*, *Listeria monocytogenes*, *Propionibacterium acnes*, a także bakterie Gram-ujemne m.in. *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aureginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* oraz *Neisseria gonorrhoeae* [1, 11, 14, 26, 28, 51, 60, 69, 90, 98, 101]. Oddziaływanie tego peptydu na zarazki – głównie bakterie, wiąże się z jego działaniem na ich błonę komórkową, co prowadzi do jej fragmentacji i powstania w niej por. Peptyd LL-37 może także indukować śmierć komórki bakteryjnej poprzez hamowanie syntezy jej składników bakterii, w tym ściany

komórkowej. Oddziałuje on także neutralizująco na bakteryjny LPS, co jest ważne w trakcie zakażenia bakteriami Gram-ujemnymi [60]. *In vitro* LL-37 wykazuje hamujący wpływ na fibroblasty wyizolowane z klinicznie zdrowych dziąseł u ssaków, które poddano działaniu LPS pochodzącego z *E. coli* [60], oddziałując hamująco na LPS. Przyjmuje się, że może on być wykorzystywany min. w zwalczaniu w jamie ustnej patogenów takich jak *Porphyromonas gingivalis* i *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [44]. Zarejestrowano również hamujący wpływ tego peptydu na powstawanie biofilmu bakteryjnego *P. aeruginosa*, *Francisella novicida* czy *Staphylococcus epidermidis*, jak też wykazano jego bezpośrednie niszczące działanie na biofilm tych bakterii [5, 24, 27, 39, 58]. Działa on także bójczo wobec mykobakterii, a w szczególności *Mycobacterium (M.) smegmatis*, *M. bovis* oraz *M. tuberculosis*, co prawdopodobnie następuje poprzez jego egzogenne działanie po dostaniu się na drodze endocytozy, do zainfekowanych makrofagów, a co prowadzi do inaktywacji prątków [79, 91]. Inną drogą działania LL-37 na prątki, jest droga endogenna poprzez jego syntezę w makrofagach, w wyniku stymulacji tych komórek witaminą D [79, 91]. Jego przeciwdrobnoustrojowe działanie poprzez aktywację komórek odpornościowych, następuje poprzez receptory TLR [18, 44], z tym że w keratynocytach działa poprzez receptor TLR5, w monocytach przez TLR2 i TLR3, a w limfocytach B, komórkach dendrytycznych i neutrofilach poprzez TLR9 [3, 43, 71]. Obecnie wykazano, na przykładzie katelicyny – CATH2 (kura), że peptyd ten dostarczając sygnał przez TLR 2 i 4, wskazuje na nowy mechanizm „dostrajania” odpowiedzi immunologicznej, skutkującej ograniczeniem zapalenia, dzięki której układ odpornościowy może rozróżnić działanie między żywymi i nieżywymi bakteriami Gram-ujemnymi (*E. coli*), a co może być bardzo ważne np. w sepsie [59]. Dowiedziono, że peptyd LL-37 może aktywować także inne receptory niż TLR, bo w neutrofilach i limfocytach pobudza także znacznik błonowy sprzężony z białkami G (GPCR – G Protein-Coupled Receptor) np. FPRL-1 (Formyl Peptide Receptor-like1), receptor kinaz tyrozynowych np. EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), a także kanał receptorowy P_2X_7R , co prowadzi do silnej aktywacji elementów odporności wrodzonej i uruchomienia prozapalnej kaskady sygnałowej [3, 110]. Wykazano, że peptyd LL-37, działając na limfocyty T i B krwi obwodowej, wzmacnia syntezę min. IL-6, IL-10 oraz chemokin CCL2 (CC-chemokine Ligand 2) i CCL7 (CC-chemokine Ligand 7) oraz zwiększa sekrecję IL-1 β , która jest silnym aktywatorem zapalenia [33, 44, 108, 110]. Natomiast indukcja peptydem LL-37 receptorów FPRL-1 w komórkach śródbłonna, prowadzi do podwyższenia ich ilości, a w neutrofilach zwiększa aktywację znaczników FPRL-1 i P_2X_7R . To powoduje zahamowanie apoptozy tych komórek i w efekcie pro-

wadzi do przedłużenia ich czasu życia, czego efektem jest relatywne zwiększanie okresu działania neutrofilii podczas infekcji [12, 67, 108, 110]. Peptyd ten, aktywując czynniki wewnątrzkomórkowe, indukuje autolizę fosfolipazy A2 oraz wzmacnia odporność naturalną [83]. W przypadku komórek nabłonkowych dróg oddechowych, aktywuje on nie tylko receptor EGFR, ale także oddziałuje na wiele elementów molekularnych związanych z błoną. Przykładem może być aktywacja metaloinoproteazy i szlak MAPK/ERK (Mitogen-Activated Protein Kinases/extracellular Signal-regulated Kinases) [110]. Wykazano, że np.: wzrost stężenia chlorku sodu w komórkach nabłonka dróg oddechowych, powoduje czterokrotny lub pięciokrotny spadek aktywności peptydu LL-37, czego efektem jest zmniejszenie aktywności różnych czynników w tych komórkach, co prowadzi m.in. do defektu międzybłonowego regulatora ekspresji CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) [74].

W przypadku infekcji wirusowej na tle dwuniciowego wirusowego RNA, peptyd LL-37 poprzez TLR3, zwiększa prozapalną sygnalizację w komórkach nabłonkowych [20, 50]. Natomiast w czasie infekcji u ludzi wirusem HPV (*Human Papillomavirus*), stwierdza się jego zwiększoną aktywność w naskórku, tak w zakresie procesu rozwoju brodawek zwykłych jak i zakaźnych, co dowodzi, że jest on ważnym elementem odporności w czasie tego zakażenia [72]. Peptyd ten aktywny jest także wobec wirusa HIV1 [104]. W przypadku infekcji grzybiczych na tle *Candida albicans* oraz *Trichophyton (T) mentagrophytes* i *T. rubrum*, zarejestrowano zwiększoną ekspresję LL-37, co prowadzi do hamowania proliferacji komórek naskórka [28, 57, 110]. W schorzeniach nieinfekcyjnych np. w przypadku łuszczycy, kontaktowego zapalenia skóry oraz tocznia rumieniowatego, peptyd LL-37, tak jak w przypadku zakażenia grzybiczego, silnie aktywuje keratynocyty [16]. Udowodniono, że zwiększona ekspresja tego peptydu w przypadku łuszczycy, koreluje z niskim współczynnikiem wtórnych infekcji bakteryjnych [16]. Chociaż u osób z atopowym zapaleniem skóry, będących szczególnie podatnych na tego typu infekcje bakteryjne, a nawet wirusowe, nie dochodzi do infekcji wtórnych [22, 72]. Nadto peptyd LL-37, pełniąc rolę regulatora zapalenia, wzmacnia gojenie się ran i odnowę warstwy powierzchniowej skóry [28, 33], gdyż współdziałając w keranocytach z IL-17 i IL-22, przyczynia się do zwiększonej syntezy IL-8 i IL-6 w tych komórkach, co prowadzi do podwyższenia poziomu odporności lokalnej w skórze [20, 33]. Fizjologiczne stężenie peptydu LL-37 u ludzi wynosi w osoczu 27,2 ng/ml, w ślinie 30,5 ng/ml, w pocie 447 ng/ml, w płwocinie 3,0–5,0 ng/ml, w płynie oskrzelowym – pęcherzykach 4,8 ng/ml, zaś w przypadku takich chorób jak gruźlica i mukowiscydoza, wzrasta on nawet 30–50-krotnie [118].

2.2. Katelicydyny u zwierząt

Peptydy te u małp, zwierząt gospodarskich, mięsożernych, laboratoryjnych, dzikich oraz ptaków, ryb, gadów, płazów i owadów, występują min. w komórkach narządów limfatycznych – szpik kostny (ssaki), czy Torba Fabrycjusza (ptaki), w komórkach układu odpornościowego – neutrofilach, choć także występują one w jelitach, wątrobie, wykazując duże zróżnicowanie strukturalne, w stosunku do katelicydyn u ludzi, choć w zakresie działania biologicznego, są one bardzo zbliżone do tych występujących u człowieka [6, 10, 11, 19, 25, 46, 48, 52, 53, 56, 64, 69, 75, 86, 87, 88, 96, 97, 99, 100, 102, 108, 111, 114, 116, 118, 119].

U małp – rebus, opisano katelicydyny rhLL-37 i rhCAP18 [10] lub rhCAP18 – CAP18 [48], które występują w szczególności w komórkach nabłonkowych przewodu pokarmowego i układu oddechowego, wykazują podobnie jak u człowieka α -helikalną strukturę i są podobne w działaniu biologicznym do ludzkiej katelicydyny LL-37, wykazując działanie antyzarazkowe, w tym wobec LPS bakterii Gram-ujemnych [10, 48]. U zwierząt tych (małpy rebus), opisano także katelicydynę RL-37, posiadającą także strukturę α -helisy, zaś u makaka i u orangutana, zarejestrowano o analogicznej strukturze peptyd ppp RL-37, który także opisano u gibbona, u którego określono go jako peptyd hmd SL-37 [62, 86].

Natomiast u zwierząt gospodarskich (bydło, owce i kozy), peptydy te najczęściej mają także strukturę α -helikalną, choć u świń opisano te substancje nie tylko o strukturze α -helikalnej np.: katelicydyna PAMP (*Porcine Antimicrobial Peptide*), ale także zarejestrowano protegryny posiadające strukturę β -karkki. U owiec zarejestrowano katelicydyny cykliczne np.: bakteneocynę – Bac oraz katelicydyny bogate w reszty proliny i argininy, analogiczne jak Bac u bydła, owiec i kóz i profeniny (PG1 i 2) u świń, a także peptydy bogate w tryptofan np. indolicydyna u bydła czy protegryny PR 39 u świń [48, 52, 56, 96, 108, 114]. Geny kodujące katelicydyny u bydła, owiec, kóz i u świń, posiadają jednakową organizację i są wielkości 2 kpb. Cechuje je wysoki procent identycznych nukleotydów, co wskazuje na ich pochodzenie z tego samego genu, a co po części potwierdza ich umiejscowienie na chromosomie (u bydła, owiec i świń, są położone blisko siebie) [114].

U bydła najbardziej poznanymi katelicydynami występującymi m.in. w neutrofilach jest bakteneocyna 1 (Bac-1- katelicydyna 1), 5 (Bac5- katelicydyna 2) i 7 (Bac7- katelicydyna 3) – peptydy bogate w prolinę i argininę oraz indolicydyna (katelicydyna 4) bogata w tryptofan [48,96]. Peptydy te wykazują silne działanie antibakteryjne działając na błonę komórkową i na ich organelle wewnątrzkomórkowe, głównie wobec bakterii Gram-ujemnych m.in.: *E. coli*, *S. enterica*, *K. pneumo-*

niae i *P. aeruginosa*, a także u bakterii Gram-dodatnich, choć wobec *Enterobacter cloace*, *Leptospira (L) interrogans* i *L. biflexa*, wykazują działanie bakteriostatyczne [48, 96]. Nadto wspomniana u bydła indolicydyna występująca w ziarnistościach neutrofilii, cechuje się nie tylko działaniem przeciwbakteryjnym, ale także przeciwgrzybicznym np. wobec *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* oraz przeciwpierwotniaczym wobec *Leishmania donovani* i *Giardia lamblia*. Ponadto działa aktywizująco na wydzielanie chemokin, autofagię neutrofilii, co jest bardzo ważne, w szczególności w gruczole mlekowym u bydła w okresie zasuszania, gdzie proces autofagii neutrofilii jest bardzo intensywny [13, 85, 96]. U bydła opisano także katelicydyny w postaci peptydu BMAP (*Bovine Myeloid Antimicrobial Peptides*) 27 (katelicydyna 6), 28 (katelicydyna 5) i 34 (katelicydyna 7) [48, 52, 56, 108], które oddziałują na mezosomy u bakterii i mitochondria u grzybów oraz wpływają na sekrecję TNF- α w komórkach nabłonkowych gruczołu mlekowego, co jest wartościowe przy zapaleniu wymienia u tych zwierząt, choć także działają przeciwnowotworowo [48, 56, 95, 108].

U owiec ważnymi katelicydynami są: cykliczny dodekapeptyd pod nazwą Oa Bac 5, 6, 7.5 i 11, (bakteneocyny 5, 6, 7.5 i 11) oraz katelicydyna 1 (bakteneocyna 1), 2 (bakteneocyna 5) i 3 (bakteneocyna7), a także peptyd SMAP (*Sheep Myeloid Antimicrobial Peptide*) (SC5-Cathelin Related Peptide) i MAP (*Mieloid Antomicrobial Peptides*) 29 i 34, bogate w prolinę i argininę [48, 52]. Wszystkie te peptydy u tych zwierząt cechują się działaniem przeciwbakteryjnym (bakterie Gram-ujemne i Gram-dodatnie) i przeciwgrzybicznym (*Candida albicans*) [48, 52]. Związki te u owiec są syntetyzowane przez neutrofile i komórki nabłonka gruczołu mlekowego, wykazując działanie hamujące wobec *Staphylococcus ureus*, *Streptococcus uberis* i *Mycoplasma agalactiae* – zarazki, które są bardzo powszechną przyczyną infekcji tego gruczołu [23]. Nadto katelicydyny u owiec aktywują komórki PMN w zakresie ich bójczości i powstawania sieci NET i peptyd ten jest specyficznym markerem wskazującym na stan zapalny wymienia [23].

U kóz znane są katelicydyny Bac 7.5, 3, 4 oraz katelicydyna 2 (Bac5) – peptydy bogate w prolinę i argininę, a które są w 50% podobne w strukturze do Bac5 u bydła [48, 52, 108]. Peptydy te u kóz, nawet w niskim i wysokim stężeniu chlorku sodu, wykazują działanie przeciwbakteryjne wobec bakterii Gram-ujemnych np.: *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *P. aeruginosa*) i niektórych Gram-dodatnich np.: *Staphylococcus aureus*, zaś w niskim stężeniu tylko działają bójczo jedynie wobec *C. albicans* [48,52].

Natomiast u świń katelicydyny są reprezentowane przez katelicydynę PAMP (*Porcine Antimicrobial Peptide*), 23, 36 i 37 (struktura α -helikalna), PR-39, profeniny 1 i 2 (PF 1 i 2) (bogate w prolinę i argininę) oraz

protegryny 1–5 (PG 1–5), które wykazują strukturę β kartki i posiadają mostki S-S. Są one syntetyzowane w neutrofilach, szpiku kostnym, a także występują w surfaktancie oskrzelików oraz komórkach języka, jelit cienkich, tchawicy oraz komórkach układu moczowo-płciowego, wykazując aktywujące działanie wobec elementów i zjawisk układu odpornościowego, w tym w szczególności procesu fagocytozy neutrofilii [48, 52, 56, 75, 106, 108]. Te peptydy u świń wykazują także działanie wobec bakterii Gram-ujemnych jak *E. coli*, choć np.: profeniny 1 i 2 (PF 1 i 2) dodatkowo działają bójczo na bakterie Gram-dodatnie np.: *L. monocytogenes*, zaś protegryny 1–5 (PG1-5) łącznie z profeninami 1 i 2 (PF1 i 2), działają bójczo w szczególności wobec *Chlamydia trachomatis*, *C. albicans*, *N. gonorrhoeae* i niektórych wirusów, a także nicieni i robaków płaskich [40, 48, 52, 56, 75, 105, 106]. Nadto protegryna 1 (PG1) u świń działa na *M. tuberculosis* oraz bakterie wywołujące zakażenia przyranne [77]. Zarejestrowano, że oczyszczone LPS bakterii Gram-ujemnych, zwiększa ekspresję katelicydyny PR-39 w komórkach szpiku tych zwierząt [109], a który to peptyd, wpływa na gojenie się ran i oddziałuje hamująco na apoptozę [40, 77].

U koni, wśród katelicydyn znane są peptydy o nazwie eCATH 1,2 i 3, które syntetyzowane są w szpiku kostnym, cechują się strukturą α -helikalną i są bogate w lizynę. Pod względem oddziaływania na zarazki, cechują się silną bójczością wobec bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich oraz grzybów jak np.: *Cryptococcus neoformans* i *Rodotorula rubrum* [25, 48, 56, 88].

Natomiast u zwierząt mięsożernych – psów, opisano katelicydynę K9CATH, zaś u kotów FeCates, które to peptydy, posiadają strukturę α -helikalną, występują w szpiku i neutrofilach i głównie u psów cechują się silnymi właściwościami przeciwbakteryjnymi np.: *N. gonorrhoeae* i *Ureaplasma* sp. Tłumaczy to fakt małej podatności zapadania tych zwierząt na choroby przenoszone drogą płciową [48, 56, 62, 112].

U zwierząt laboratoryjnych katelicydyny stwierdzono u królików, szczurów, myszy oraz świnek morskich [48, 56]. Katelicydyny u królików reprezentuje peptyd CAP 18 oraz białko PI5A i PI5B, występujące w ich neutrofilach i nerkach; u szczurów przez peptyd rCRAMP, a którego miejsce powstania w dostępnej literaturze nie jest wymieniane; u myszy wskazuje się na peptyd Cramp, występujący w jądrach samców, śledzionie, wątrobie i przewodzie pokarmowym; u świnek morskich katelicydyny reprezentowane są przez peptyd CAP11, stwierdzany w neutrofilach i szpiku kostnym [48, 56]. Peptydy te u tych zwierząt laboratoryjnych wykazują działanie przeciwbakteryjne, w tym także hamujące oddziaływanie na LPS bakterii Gram-ujemnych [48, 56].

U zwierząt dzikich katelicydyny opisano u jeleni w postaci baktencyny, która występuje w neutrofilach i nerkach, cechując się działaniem bójczym wobec bak-

terii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich [97]. Opisano także u tych zwierząt, katelicydyny w postaci peptydu P-9, który bogaty jest w prolinę i argininę, a która wykazuje działanie bójcze wobec wielu zarazków [29]. Związki te zarejestrowano także u wołów z rodziny krętorogich (*Bubalus bubalis*) w postaci fragmentu mielo-katelicydyny i fragmentu katelicydyny 4, stwierdzane w szpiku kostnym i drogach rodnych, a których działanie określono jako przeciwarzazkowe [17, 97]. Opisano katelicydyny u osła o nazwie EACATH 1, cechujące się strukturą α -helikalną [37] i u dziobaka w postaci peptydu PA1 i PA2 [29] oraz u pandy w postaci peptydu AM [113]. Katelicydyny te u tych zwierząt, od strony struktury i działania biologicznego nie zostały jeszcze dobrze scharakteryzowane.

Katelicydyny zarejestrowano także u ptaków, w szczególności u kur, u których są reprezentowane przez katelicydynę 1 (CATH 1), 2 (CATH 2), 3 (CATH 3), katelicydynę B-1 (CATH B1) oraz peptyd CMAP 27 (Chicken Myeloid Antimicrobial Peptide- 27). Peptydy te stwierdzono m.in. w ich Torebce Fabrycjusza, w szpiku kostnym, przewodzie pokarmowym, wątrobie, układzie oddechowym, nerkach, śledzionie, mózgu i mięśniach [48, 53, 56, 100, 107, 111]. Wykazują one silne działanie wobec bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich, w tym wobec szczepów opornych na antybiotyki. Przyjmuje się jednak, że u kur głównie to peptyd CMAP 27, warunkuje u nich odporność naturalną. Według Linde i wsp. [56] tak u kur jak i indyków, wyróżnia się te peptydy w szpiku kostnym w postaci protegryny. Podano także [101, 111], że katelinowy region katelicydyn u ptaków, wykazuje małą homologie w porównaniu do tego regionu u kręgowców – ssaków.

Katelicydyny opisano także u ryb (łosoś atlantycki, pstrąg tęczowy, dorsz atlantycki) w postaci peptydu 29 (HFIAP-3) i 37 (HFIAP 1,2) oraz katepsyny H i katelicydyny 2, które występują w komórkach przewodu pokarmowego, wątrobie, nerkach, skórze i które podobne są do niektórych katelicydyn ssaczy, gdyż mają w swojej strukturze prolinę i cysteinę i wykazują w szczególności działanie przeciwbakteryjne [19, 48, 52]. Ponadto przyjmuje się [108], że u łososi występuje katelicydyna o nazwie rtCATH 1 – bogata w glicynę, zaś u dorsza atlantyckiego katelicydyna Cod Cath – bogata w glicynę i serynę.

Katelicydyny zarejestrowano również u węży w postaci peptydu OHCATH – kobra królewska, peptydu NACATH – kobra pospolita oraz peptydu BF-CATH i katelicydynę BF u niemrawca pospolitego [102, 108].

Dane piśmiennictwa [48, 64, 93, 96, 108] wskazują także na istnienie katelicydyn u płazów i owadów, jednakże głównie u płazów, brak szczegółów dotyczących struktury tych peptydów i ich działania biologicznego. Natomiast u owadów wykazano w 1980 roku, że oprócz izolacji cekropin z poczwarki ćmy z gatunku *Hyalophora*

cecropia, zarejestrowano wiele peptydów u różnych przedstawicieli tej gromady [64]. I tak u *Drosophila melanogaster* stwierdzono 8 rodzin AMPs, a u gąsienic *Galleria mellonella* opisano 12 tych peptydów, które syntetyzowane są w ciałku tłuszczowym, hemocytach i komórkach nabłonkowych. Peptydy te działają głównie na bakterie Gram-ujemne, ale i Gram-dodatnie, a także działają wirusobójczo. Wśród peptydów bakteriobójczych wyróżnia się melitynę, cercopinę A, allofero 1 i 2 oraz mirystylowany peptyd wyizolowany z *Heliothis virescens*. Natomiast do peptydów wirusobójczych należą przedstawiciele czterech klas AMPs i są to: peptydy liniowe, α -helikalne, peptydy o strukturze stabilizowanej mostkami dwusiarczkowymi, peptydy zawierające znaczną ilość aminokwasu jednego typu oraz peptydy zawierające rzadkie, modyfikowane aminokwasy [64].

3. Podsumowanie

Katelicydyny są naturalnymi elementami odporności przeciwdrobnoustrojowej, na które patogeny ssaków, w tym człowieka i zwierząt m.in. gospodarskich, laboratoryjnych i dzikich oraz ptaków i ryb, na drodze ewolucji nie wykształciły odporności. Peptydy te, uczestniczą głównie w infekcjach bakteryjnych i wirusowych, choć także grzybiczych i zarażeniach pierwotniaczych, działając bezpośrednio oraz pośrednio, jako że wpływają na szlaki sygnalizacyjne i aktywność komórek odpornościowych, w tym m.in. ekspresję cytokin, chemokin i czynników wzrostu. W rezultacie stają się one bardzo ważnymi składnikami odporności naturalnej ssaków, w tym człowieka, u którego są najbardziej poznane i przyjmuje się, że stanowią pod względem działania bakteriobójczego odnośnik dla innych kręgowców – ssaków.

Piśmiennictwo

- Agerberth B., Gunne H., Odeberg J., Kogner P., Boman H.G., Gudmundsson G.H.: FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 195–199 (1995)
- Agier J., Brzezińska-Błaszczak E.: Katelicydyny i defensyny w regulacji aktywności przeciwdrobnoustrojowej komórek tucznych. *Post. Hig. Med. Dośw.* **70**, 618–636 (2016)
- Agier J., Efenberger M., Brzezińska-Błaszczak E.: Cathelicidin impact on inflammatory cells. *Centr. Eur. J. Immunol.* **40**, 225–235 (2015)
- Albrethsen J., Møller C. H., Olsen J., Raskov H., Gammeltoft S.: Human neutrophil peptides 1, 2 and 3 are biochemical markers for metastatic colorectal cancer. *Eur. J. Cancer*, **42**, 3057–3064 (2006)
- Amer L.S., Bishop B.M., van Hoek M.L.: Antimicrobial and antibiofilm activity of cathelicidins and short, synthetic peptides against *Francisella*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396**, 246–251 (2010)
- Andersson E., Sorensen O.E., Frohm B., Borregaard N., Egesten A., Malm J.: Isolation of human cationic antimicrobial protein-18 from seminal plasma and its association with prostasomes. *Hum. Reprod.* **17**, 2529–2534 (2002)
- Antimicrobial peptid database: <http://aps.unmc.edu/AP/main.php> (6.02.2018r)
- Bagnicka E., Strzałkowska N., Józwick A., Horbańczuk J.O., Krzyżewski J., Zwierzchowski L.: Peptydy przeciwdrobnoustrojowe w zwalczaniu patogenów opornych na powszechnie stosowane antybiotyki. *Medycyna Wet.* **67**, 512–516 (2011)
- Bagnicka E., Strzałkowska N., Józwick A., Krzyżewski J., Horbańczuk J., Zwierzchowski L.: Expression and polymorphism of defensins in farm animals. *Acta Bioch. Pol.* **4**, 487–497 (2010)
- Bals R., Lang C., Weiner D.J., Vogelmeier C., Welsch U., Wilson J.M.: Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) mucosal antibacterial peptides are close homologues of human molecules. *Clin. Diagnost. Lab. Immunol.* **8**, 370–375 (2001)
- Bals R., Wang X., Zasloff M., Wilson J.M.: The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 9541–9546 (1998)
- Barlow P.G., Li Y., Wilkinson T.S., Bowdish D.M.E., Lau Y.E., Cosseau C., Haslett C., Simpson A.J., Hancock R.E., Davidson D.J.: The human cationic host defense peptide LL-37 mediates contrasting effects on apoptotic pathways in different primary cells of the innate immune system. *J. Leuk. Biol.* **80**, 509–520 (2006)
- Benincasa M., Scocchi M., Pacor S., Tossi A., Nobili D., Basaglia G., Busetti M., Gennaro R.: Fungicidal activity of five cathelicidin peptides against clinically isolated yeasts. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**, 950–959 (2006)
- Bergman P., Johansson L., Asp V., Plant L., Gudmundsson G.H., Jonsson A.B., Agerberth B.: *Neisseria gonorrhoeae* downregulates expression of the human antimicrobial peptide LL-37. *Cell. Microbiol.* **7**, 1009–1017 (2005)
- Bowdish D. M., Davidson D.J., Lau Y.E., Lee K., Scott M.G., Hancock R.E., Bowdish D.M.: Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *J. Leuk. Biol.* **77**, 451–459 (2005)
- Braff M.H., Bardan A., Nizet V., Gallo R.L.: Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. *J. Invest. Dermatol.* **125**, 9–13 (2005)
- Brogden K.A., Ackermann M., Mc Cray P.B. jr.: Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *Int. J. Antimicrobial Agents*, **22**, 465–478 (2003)
- Brown K.L., Hancock R.E.W.: Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr. Opin Immunol.* **18**, 24–30 (2006)
- Chang C.I., Zhang Y.A., Zou J., Nie P., Secombes C.J.: Two cathelicidin genes are present in both rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and atlantic salmon (*Salmo salar*). *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 185–195 (2006)
- Chen H., Takai T., Xie Y., Niyonsaba F., Okumura K., Ogawa H.: Human antimicrobial peptide LL-37 modulates proinflammatory responses induced by cytokine milieu and double-stranded RNA in human keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **433**, 532–537 (2013)
- Cole A.M.: Innate host defense of human vaginal and cervical mucosae. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **306**, 199–230 (2006)
- Conner K., Nern K., Rudisill J., O'Grady T., Gallo R.L.: The antimicrobial peptide LL-37 is expressed by keratinocytes in condyloma acuminatum and verruca vulgaris. *J. Am. Acad. Dermatol.* **47**, 347–350 (2002)
- Cubeddu T., Cacciotta C., Pisanu S., Tedde V., Alberti A., Pittau M., Dore S., Cannas A., Uzzau S., Rocca S., Addis M.F.: Cathelicidin production and release by mammary epithelial cells during infectious mastitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **189**, 66–70 (2017)

24. Dean S.N., Bishop B.M., van Hoek M.L.: Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm to alpha-helical peptides: D-enantiomer of LL-37. *Front. Microbiol.* **2**, <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2011.00128> (2011)
25. Di Na, Vitiello A., Gallo R.L.: Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide. *J. Immunol.* **170**, 2274–2278 (2003)
26. Dorschner R.A., Pestonjamas V.K., Tamakuwala S., Ohtake T., Rudisill J., Nizet V., Agerberth B., Gudmundsson G.H., Gallo R.L.: Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A *Streptococcus*. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 91–97 (2001)
27. Dosler S., Karaaslan E.: Inhibition and destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by antibiotics and antimicrobial peptides. *Peptides*, **62**, 32–37 (2014)
28. Dürr U.H.N., Sudheendra U.S., Ramamoorthy A.: LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, **1758**, 1408–1425 (2006)
29. Erdag G.: Interleukin-1 α and interleukin-6 enhance the antibacterial properties of cultured composite keratinocyte grafts. *Ann. Surg.* **235**, 113–124 (2002)
30. Ericksen B., Wu Z., Lu W., Lehrer R.I.: Antibacterial activity and specificity of the six human {alpha}-defensins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 269–275, (2005)
31. Feliucio M.R., Silva O.N., Goncalves S., Santos N.C., Franco O.L.: Peptides with dual antimicrobial and anticancer activities. *Front Chem. Feb*, **21**, 5:5. Doi: 10.3389/fchem.2017.00005. eCollection 2017 (2017)
32. Findlay E.G., Currie S.M., Davidson D.J.: Cationic host defence peptides: potential as antiviral therapeutics. *Biodrugs*, **27**, 479–493 (2013)
33. Frohm N., Sandstedt B., Sorensen O., Weber G., Borregaard N., Stahle-Backdahl M.: The human cationic antimicrobial protein (hCAP-18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6. *Inf. Immunity*, **67**, 2561–2566 (1999)
34. Gallo R.L., Hooper L.V.: Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 503–516 (2012)
35. Gorman S.P., Glimore B.F.: Clinical relevance of the escape pathogens. *Expert Rev. Anti-infect. Ther.* **11**, 297–308 (2013)
36. Hancock R.E.W., Haney E.F., Gill E.E.: The immunology of host defence peptides: Beyond antimicrobial activity. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 321–334 (2016)
37. Hase K., Eckmann L., Leopold J.D., Varki N., Kagnoff M.F.: Cell differentiation is a key determinant of cathelicidin LL-37/human cationic antimicrobial protein 18 expression by human colon epithelium. *Infect. Immunity*, **70**, 953–963 (2002)
38. Hazlett L., Wu M.: Defensins in innate immunity. *Cell Tissue Res.* **343**, 175–188 (2011)
39. Hell É., Giske C.G., Nelson A., Römling U., Marchini G.: Human cathelicidin peptide LL37 inhibits both attachment capability and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Lett. Appl. Microbiol.* **50**, 211–215 (2010)
40. Henning-Pauka J., Jacobsen I., Blecha F.: Differential proteomic analysis reveals increased cathelicidin expression in porcine bronchoalveolar lavage fluid after an *Actinobacillus pleura pneumoniae* infection. *Vet. Res.* **37**, 75–87 (2006)
41. Hu Z., Murakami T., Suzuki K., Tamura H., Kawahara-Arai K., Ilba T., Nagoaka I.: Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 inhibits the LPS/ATP-induced pyroptosis of macrophages by dual mechanism. *PLoS ONE* **9**, p.e85765 (2014)
42. Huang W., Seo J., Willingham S.B., Gonzalgo M.L., Weisman I.L., Barron A.E.: Cationic, amphipathic peptides with potent anticancer activity. *PLoS ONE* **9**, e90397. Doi.org/10.1371/journal.pone.0090397
43. Hurtado P., Peh C. A.: LL-37 promotes rapid sensing of CpG oligodeoxynucleotides by B lymphocytes and plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* **184**, 1425–1435 (2010)
44. Into T., Inomata M., Shibata K., Murakami Y.: Effect of the antimicrobial peptide LL-37 on Toll-like receptors 2-, 3- and 4-triggered expression of IL-6, IL-8 and CXCL10 in human gingival fibroblasts. *Cell. Immunol.* **264**, 104–109 (2010)
45. Jarczak J., Kościuczuk E.M., Lisowski P., Strzałkowska N., Józwick A., Horbańczuk J., Krzyżewski J., Zwierzchowski L., Bagnicka E.: Defensins: natural component of human innate immunity. *Hum. Immunol.* **74**, 1069–1079 (2013)
46. Jones E.A., Cheng Y., O’Meally D., Belov K.: Characterization of the antimicrobial peptide family defensins in the Tasmanian devil (*Sarcophilus harrissi*), koala (*Phascolarctos cinereus*), and tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *Immunogenetics*, **69**, 133–143 (2017)
47. Klotman M.E., Chang T.L.: Defensin in innate antiviral immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 447–456 (2006)
48. Kościuczuk E.M., Lisowski P., Jarczak J., Strzałkowska N., Józwick A., Horbańczuk J., Krzyżewski J., Zwierzchowski L., Bagnicka E.: Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. *Mol. Biol. Rep.* **39**, 10957–10970 (2012)
49. Kurashima Y., Kiyono H.: Mucosal ecological network of epithelium and immune cells for gut homeostasis and tissue healing. *Annu. Res. Immunol.* **35**, 119–241 (2017)
50. Lai Y., Adhikarakunnathu S., Bhardaj K., Ranjith-Kumar C.T., Wen Y., Jordan J.L., Wu L.H., Dragnea B., San Mateo L., Kao C.C.: LL37 and cationic peptides enhance TLR3 signaling by viral double-stranded RNAs. *PLoS ONE*, **6**, e26632 (2011)
51. Larrick J.W., Hirata M., Zhong J., Wright S.C.: Anti-microbial activity of human CAP18 peptides. *Immunotechnology*, **1**, 65–72 (1995)
52. Laube D.M., Yim S., Ryan L.K., Kisich K.O., Diamond G.: Antimicrobial peptides in the airway. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **306**, 153–182 (2006)
53. Lee M.O., Jang H.J., Rengaraj D., Yang S.Y., Han S.Y., Lamont S.J., Womack J.E.: Tissue expression and antibacterial activity of host defense peptides in chicken. *BMC Vet. Res.* **12**, 231–239 (2016)
54. Lehrer R.I.: Primate defensin. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 727–738 (2004)
55. Li J., Koh J.J., Liu S., Lakshminarayanan R., Verma C.S., Beuerman R.W.: Membrane active antimicrobial peptides: translating mechanistic insights to design. *Front. Neurosci.* **11**, 73–98 (2017)
56. Linde A., Ross C.R., Davis E.G., Dib L., Blecha F., Melgarejo T.: Innate Immunity and host defense peptides in veterinary medicine. *J. Vet. Intern. Med.* **22**, 247–265 (2008)
57. Lopez-Garcia B., Lee P.H.A., Gallo R.L.: Expression and potential function of cathelicidin antimicrobial peptides in dermatophytosis and tinea versicolor. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 877–882 (2006)
58. Luo Y., McLean D.T.F., Linden G.J., McAuley D.F., McMullan R., Lundy F.T.: The naturally occurring host defense peptide, LL-37, and its truncated mimetics KE-18 and KR-12 have selected biocidal and antibiofilm activities against *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* in vitro. *Front. Microbiol.* **8**, 1–11 (2017)
59. Coorens M., Schneider V.A.F., de Groot A.M., van Dijk A., Meijerink M., Wells J.M., Scheenstra M.R., Veldhuizen E.J.A., Haagsman H.P.: Cathelicidins inhibit *Escherichia coli*-induced TLR2 and TLR4 activation in a viability-dependent manner. *J. Immunol.* **199**, 1418–1428 (2017)
60. Mansour S.C., Pena O.M., Hancock R.E.W.: Host defense peptides: front-line immunomodulators. *Trends Immunol.* **39**, 443–450 (2014)

61. Marchini G., Lindow S., Brismar H., Stabi B., Berggren V., Ulfgren A.K., Lonne-Rahm S., Agerberth B., Gudmundsson G.H.: The newborn infant is protected by an innate antimicrobial barrier: peptide antibiotics are present in the skin and vernix caseosa. *Br. J. Dermatol.* **147**, 1127–1134 (2002)
62. Midorikawa K., Ouhara K., Komatsuzawa H., Kawai T., Yamada S., Fujiwara T., Yamazaki K., Sayama K., Taubman M.A., Kurihara H., Hashimoto K., Sugai M.: *Staphylococcus aureus* susceptibility to innate antimicrobial peptides, beta-defensins and CAP18, expressed by human keratinocytes. *Inf. Immunity*, **71**, 3730–3739 (2003)
63. Miński T., Gryko R., Bartoszcze M., Bielawska-Drozd A., Tyszkiewicz W.: Peptydy przeciwdrobnoustrojowe – nowe możliwości zwalczania infekcji u ludzi i zwierząt. *Medycyna Wet.* **67**, 517–521 (2011)
64. Mizerska-Dudka M., Andrejko M., Kandafer-Szerszeń M.: Przeciwwirusowe peptydy kationowe człowieka i owadów. *Post. Mikrobiol.* **50**, 209–216 (2011)
65. Murakami M., Ohtake T., Dorschner R.A., Gallo R.L.: Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva. *J. Dent. Res.* **81**, 845–850 (2002)
66. Murakami M., Ohtake T., Dorschner R.A., Schittek B., Garbe C., Gallo R.L.: Cathelicidin anti-microbial peptide expression in sweat, an innate defense system for the skin. *J. Invest. Dermatol.* **119**, 1090–1095 (2002)
67. Nagaoka I., Tamura H., Hirata M.: An antimicrobial cathelicidin peptide, human CAP18/LL-37, suppresses neutrophil apoptosis via the activation of formyl-peptide receptor-like 1 and P2X7. *J. Immunol.* **176**, 3044–3052 (2006)
68. Niedźwiedzka-Rystwek P., Deptuła W.: Defensyny – ważny wrodzony element układu odpornościowego u ssaków. *Post. Hig. Med. Dośw.* **62**, 524–529 (2008)
69. Niedźwiedzka-Rystwek P., Mękal A., Deptuła W.: Peptydy przeciwdrobnoustrojowe – ważny element odporności naturalnej. *Astma Alergia Immunol.* **15**, 35–41 (2010)
70. Nijnik A., Hancock, R.E.W.: The roles of cathelicidin LL-37 in immune defences and novel clinical applications. *Curr. Opin. Hematol.* **16**, 41–47 (2009)
71. Nijnik, A., Pistollic, J., Filewod, N. C. J., Hancock, R. E. W.: Signaling pathways mediating chemokine induction in keratinocytes by cathelicidin LL-37 and flagellin. *J. Innate Immun.* **4**, 377–386 (2012)
72. Ong P.Y., Ohtake T., Brandt C et al.: Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N. Engl. J. Med.* **347**, 1151–1160 (2002)
73. Oppenheim J.J., Yang D.: Alarmins: chemotactic activators of immune response. *Curr. Opin. Immunol.* **17**, 359–365 (2005)
74. Polcyn-Adamczyk M., Niemir Z.I.: Katelicydyna – budowa, funkcja i rola w chorobach autoimmunologicznych. *Post. Biol. Kom.* **41**, 315–330 (2014)
75. Pomorska-Mól M., Markowska-Daniel I.: Katelicydyny i defensyny u świń. *Medycyna Wet.* **67**, 20–24 (2011)
76. Porcelli F., Verardi R., Shi L., Henzler-Wildman K.A., Ramamorthy A., Veglia G.: NMR structure of the cathelicidin-derived human antimicrobial peptide LL-37 in dodecylphosphocholine micelles. *Biochemistry*, **47**, 5565–5572 (2008)
77. Ramanathan B., Davis E.G., Ross C.R., Blecha F.: Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity. *Microbes Infect.* **4**, 361–372 (2002)
78. Ritonja A., Kopitar R., Jerela R., Turk V.: Primary structure of a new cysteine proteinase inhibitor from pig leukocytes. *FEBS Lett.* **255**, 211–214 (1989)
79. Rivas-Santiago B., Hernandez-Pando R., Carranza C., Juarez E., Contreras J.L., Aguilar-Leon D., Torres M., Sada E.: Expression of cathelicidin LL-37 during *Mycobacterium tuberculosis* infection in human alveolar macrophages, monocytes, neutrophils, and epithelial cells. *Infect. Immun.* **76**, 935–941 (2008)
80. Robinson K., Deng Z., Hou Y., Zhang G.: Regulation of the intestinal barrier function by host defense peptides. *Front. Vet. Sci.* doi:0.3389/fvets.2015.00057 (2015)
81. Schaller-Bals S., Schulze A., Bals R.: Increased levels of antimicrobial peptides in tracheal aspirates of newborn infants during infection. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **165**, 992–995 (2002)
82. Scott M.G., Hancock R.E.: Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit. Rev. Immunol.* **20**, 407–431 (2000)
83. Seil M., Nagant C., Dehaye J.P., Vandenbranden M., Lensink M.F.: Spotlight on human LL-37, an immunomodulatory peptide with promising cell-penetrating properties. *Pharmaceuticals*. **3**, 3435–3460 (2010)
84. Selsted M.E., Harwig S.S., Ganz T., Schilling J.W., Lehrer R.I. Primary structures of three human neutrophil defensins. *J. Clin. Invest.* **76**, 1436–1439 (1985)
85. Selsted M.E., Novotny M.J., Morris W.L., Tang Y.Q., Smith W., Cullor J.S.: Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *J. Biol. Chem.* **267**, 4292–4295 (1992)
86. Selsted M.E., Ouellette A.J.: Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat. Immunol.* **6**, 551–557 (2005)
87. Sima P., Trebichavsky I., Sigler K.: Mammalian antibiotic peptides. *Folia Microbiol.* **48**, 123–137 (2003)
88. Skerlavaj B., Scocchi M., Gennaro R., Risso A., Zanetti M.: Structural and functional analysis of horse cathelicidin peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 715–722 (2001)
89. Śliwa-Dominiak J., Witkowska M., Deptuła W.: Biologiczne alternatywy dla antybiotyków. *Przegl. Epidemiol.* **64**, 399–403 (2010)
90. Smeianov V., Scott K., Reid G.: Activity of cecropin P1 and FA-LL-37 against urogenital microflora. *Microbes Infect.* **2**, 773–777 (2000)
91. Sonawane A., Santos J.C., Mishra B.B., Jena P., Progida C., Sorensen O.E., Gallo R., Appelberg R., Groffiths G.: Cathelicidin is involved in the intracellular killing of mycobacteria in macrophages: the role of cathelicidin in mycobacteria killing. *Cell. Microbiol.* **13**, 1601–1617 (2013)
92. Sørensen O.E., Borregaard N., Cole A.M.: Antimicrobial peptides in innate immune responses. *Contrib. Microbiol.* **15**, 61–77 (2008)
93. Steiner H., Hultmark D., Engström Å., Bennich H., Boman H.G. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, **292**, 246–248 (1981)
94. Thomma B.P., Cammue B.P., Thevissen K.: Plant defensins. *Planta*, **216**, 193–202 (2002)
95. Tomasinsig L., Conti G., Skerlavaj B., Piccinini R., Mazzilli M., D'Este F., Tossi A., Zanetti M.: Broad-spectrum activity against bacterial mastitis pathogens and activation of mammary epithelial cells support a protective role of neutrophil cathelicidins in bovine mastitis. *Inf. Immun.* **78**, 1781–1788 (2010)
96. Tomasinsig L., Zanetti M.: The cathelicidins – structure, functions and evolution. *Curr. Protein. Pept. Sci.* **6**, 23–34 (2005)
97. Treffers C., Chen L., Anderson R.C., Yu P.L.: Isolation and characterisation of antimicrobial peptides from deer neutrophils. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **26**, 165–169 (2005)
98. Turner J., Cho Y., Dinh N.N., Waring A.J., Lehrer R.I.: Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 2206–2214 (1998)
99. Uzzell T., Stolzenberg E.D., Shinnar A.E., Zasloff M.: Hagfish intestinal antimicrobial peptides are ancient cathelicidins. *Peptides*, **24**, 1655–1667 (2003)

100. Van Dijk A., Veldhuizen E.J., van Asten A.J., Haagsman H.P.: CMAP27, a novel chicken cathelicidin-B1, an antimicrobial guardian at the mucosal M cell gateway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 15063–15068 (2005)
101. Vandamme D., Landuyt B., Luyten W., Schoofs L.: A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cell Immunol.* **280**, 22–35 (2012)
102. Wang Y., Hong J., Liu X., Yang H., Liu R., Wu J., Wang A., Lin D., Lai R.: Snake cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a potent peptide antibiotics. *PLoS ONE*, **3**, e3217.
103. Wang G., Li X., Wang Z.: APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for reaserch and education. *Nucleic Acids Res.* **44**, 1087–1093 (2016)
104. Wang G, Watson K.M., Buckheit R.W.Jr.: Anti-human immunodeficiency virus type 1 activities of antimicrobial peptides derived from human and bovine cathelicidins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 3438–3440 (2008)
105. Wangl Y., Walter G., Herting E., Agerberth B., Johansson J.: Antibacterial activities of the cathelicidins prophenin (residues 63 to 79) and LL-37 in the presence of a lung surfactant preparation. *Antimicrob. Agents Chemother. J.* **48**, 2097–2100 (2004)
106. Wiechuła B.E., Tustanowski J.P., Martirosian G.: Peptydy antybrobnoustrojowe. *Wiad. Lek.* **59**, 542–547 (2006)
107. Witkowska D., Bartyś A., Gamian A.: Defensyny i katelicydyny jako naturalne antybiotyki peptydowe. *Post. Hig. Med. Dośw.* **62**, 694–707 (2008)
108. Wódcz K., Brzezińska-Błaszczuk E.: Katelicydyny – endogenne peptydy przeciwdrobnoustrojowe. *Post. Biochemii*, **61**, 93–101 (2015)
109. Wu H., Zhang G., Minton J.E., Ross C.R., Blecha F.: Regulation of cathelicidin gene expresie: induction by lipopolysaccharide, interleukin-6, retinoic acid, and *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection. *Infect. Immunity*, **68**, 5552–5558 (2000)
110. Xhindoli D., Pacor S., Benincasa M., Scocchi M., Gennaro R., Tossi A.: The human cathelicidin LL-37 – a pore-forming antibacterial peptide and host-cell modulator. *Biochim. Biophys. Acta*, **1858**, 546–566 (2016)
111. Xiao Y, Cai Y., Bommineni Y.R., Femando S.C., Prakash O., Gilliland S.E., Zhang G.: Identifikation and functional characterization of three chicken cathelicidins with potent antimicrobial activity. *J. Biol. Chem.* **281**, 2858–2867 (2006)
112. Yamasaki K., Schaubert J., Coda A., Lin H., Dorschner R.A., Schechter N.M., Bonnart C., Descargues P., Hovnanian A., Gallo R.L.: Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. *FASEB J.* **20**, 2068–2080 (2006)
113. Yang D., de la Rosa G., Tewary P., Oppenheim J.J.: Alarmins link neutrophils and dendritic cells. *Trends Immunol.* **30**, 531–537 (2009)
114. Zanetti M.: The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals. *Curr. Issues Mol. Biol.* **17**, 179–196 (2005)
115. Zasloff M.: Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, **415**, 389–395 (2002)
116. Zasloff M.: Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5449–5453 (1987)
117. Zea H.I., Spitznagel J.K.: Antibacterial and enzymic basic proteins from leukocyte lysosomes: separation and identifications. *Science*, **142**, 1085–1087 (1963)
118. Żelechowska P., Agier J., Brzezińska-Błaszczak E.: Endogenous antimicrobial factors in the treatment of infectious diseases. *Cent. Europ. J. Immunol.* **41**, 419–425 (2016)
119. Żyłowska M., Wszyńska A., Jagusztyn-Krynicka K.: Defensyny – peptydy o aktywności przeciwbakteryjnej. *Post. Mikrobiol.* **50**, 223–234 (2011)

NOWO POJAWIAJĄCE SIĘ GATUNKI BAKTERII W ZAKAŻENIACH U CZŁOWIEKA

Alicja Sękowska*, Eugenia Gospodarek-Komkowska

Katedra i Zakład Mikrobiologii Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Wpłynęło w październiku, zaakceptowano w grudniu 2018 r.

Streszczenie: W ciągu ostatnich kilku lat w piśmiennictwie zaczęły pojawiać się prace opisujące przypadki kliniczne zakażeń bakteriami dotychczas uznawanymi za niepatogenne. Dotychczas bakterie te powszechnie izolowano ze środowiska naturalnego: wody, gleby, roślin, a izolacja z próbki materiału klinicznego uznawana była często za zanieczyszczenie. Stąd, celem pracy było zwrócenie uwagi na nowo pojawiające się gatunki bakterii, ich cechy charakterystyczne, właściwości biochemiczne, czynniki wirulencji oraz predyspozycję do wybranych postaci zakażeń w grupach chorych z określonymi czynnikami ryzyka. Wpływ na częstszą izolację gatunków bakterii dotychczas uznawanych za niechorobotwórcze ma kilka aspektów: wiarygodne metody diagnostyczne, w tym prawidłowa identyfikacja do gatunku, pozwalająca na różnicowanie blisko spokrewnionych bakterii, rosnąca grupa osób z obniżoną odpornością i czynnikami ryzyka zakażeń (takimi jak podeszły wiek, cukrzyca, nowotwory, przeszczepienie narządów), bardziej podatnych na zakażenie, także drobnoustrojami o mniejszej chorobotwórczości. Nie bez znaczenia są również większe zdolności adaptacyjne bakterii do nowych warunków środowiskowych, w tym w organizmie człowieka. Wpływ ma także chorobotwórczość tych bakterii, głównie związana z wytwarzaniem biofilmu oraz czynników warunkujących adhezję do komórek gospodarza, czy biomateriałów, umożliwiając kolonizację i późniejsze zakażenie.

Postęp medycyny, jaki dokonał się w ostatnich latach korzystnie wpłynął na długość życia pacjentów z niektórymi chorobami i w wielu sytuacjach przyczynił się do poprawy jego jakości. Niestety, umożliwił także zakażenia bakteriami dotychczas uważanymi za mało lub niechorobotwórcze.

1. Wprowadzenie. 2. Pałeczki Gram-dodatnie. 3. Paciorkowce o szczególnych wymaganiach odżywczych. 4. Pałeczki Gram-ujemne. 5. Podsumowanie

NEW SPECIES OF BACTERIA IN HUMAN INFECTIONS

Abstract: In the last few years, there have been works in the literature describing clinical cases of infections with bacteria previously considered to be non-pathogenic. So far, these bacteria have been commonly isolated from the natural environment: water, soil, plants, and isolation from a sample of clinical material has often been considered an impurity. Therefore, the aim of the paper was to draw attention to newly emerging bacterial species, their characteristics, biochemical properties, virulence factors and predisposition to selected forms of infection in groups of patients with specific risk factors. The impact on the more frequent isolation of species of bacteria previously considered to be non-pathogenic has several aspects: reliable diagnostic methods, including correct identification to the species, allowing for differentiation of closely related bacteria, growing group of immune-compromised patients and with infectious risk factors (such as older age, diabetes, tumors, organ transplantation), more susceptible to infection, also with less pathogenic microorganisms. Greater adaptability of bacteria to new environmental conditions, including human body, are also worth mentioning. The pathogenic effect of these bacteria, mainly related to the production of biofilms and factors conditioning adhesion to host cells or biomaterials, allowing colonization and subsequent infection, is also important.

The progress in medicine that has taken place in recent years has positively influenced the life expectancy of patients with certain diseases and in many situations, it contributed to the improvement of its quality. Unfortunately, it also made it possible to infect with bacteria that were previously considered to be low or non-pathogenic.

1. Introduction. 2. Gram-positive rods 3. Streptococci with special nutritional requirements. 4. Gram-negative rods. 5. Summary

Słowa kluczowe: *Arcanobacterium*, *Delftia*, *Granulicatella*, *Pantoea*

Key words: *Arcanobacterium*, *Delftia*, *Granulicatella*, *Pantoea*

1. Wprowadzenie

Coraz częstsze i szersze zastosowanie w diagnostyce mikrobiologicznej szybkich metod identyfikacji drobnoustrojów opartych o nowe technologie spowodowało pojawianie się w piśmiennictwie opisów przypadków zakażeń bakteriami dotąd pomijanymi z braku

możliwości ich identyfikacji, bądź uważanymi za mało zjadliwe lub niepatogenne. Do nowych metod należą m.in., spektrometria mas, czy spektrometria w podczerwieni. Metody te są wysoko czułe i swoiste, a także proste w wykonaniu. Ponadto, czas oczekiwania na wynik identyfikacji od nastawienia próby, w przypadku spektrometrii mas, wynosi 15 minut, lub nawet krócej.

* Autor korespondencyjny: dr Alicja Sękowska, Katedra i Zakład Mikrobiologii, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz; e-mail: asekowska@cm.umk.pl

Ma to istotną wartość w procesie diagnostycznym i terapeutycznym, jak i w aspekcie ekonomicznym. Zaletą tych metod jest także możliwość różnicowania drobnoustrojów blisko spokrewnionych filogenetycznie. Również rozwój metod biologii molekularnej, umożliwiające badanie podobieństwa bakterii, spowodował zmiany w systematyce i reklasyfikacje w obrębie dotychczas znanych rodzin i rodzajów. Bakterie te powszechnie występują w środowisku naturalnym: w wodzie, glebie, na roślinach, w powietrzu. Izolowane były także od zwierząt.

Celem pracy było zwrócenie uwagi na nowo pojawiające się gatunki bakterii, które coraz częściej izolowane są z zakażeń u ludzi. W pracy zawarto dane z własnej praktyki diagnostycznej oraz z dostępnego piśmiennictwa.

2. Pałeczki Gram-dodatnie

Nowo pojawiające się gatunki bakterii należą do różnych morfologicznie grup bakterii. Wśród pałeczek Gram-dodatnich coraz częściej izolowane są rodzaje: *Arcanobacterium* i *Brevibacterium*. *Arcanobacterium* spp. to nieruchliwe, nieprzetrwalnikujące, pleomorficzne pałeczki. Rodzaj ten został reklasyfikowany z rodzaju *Corynebacterium* w 1982 roku [13]. Bakterie te posiadają charakterystyczne kwasy tłuszczowe w ścianie komórkowej, nie wytwarzają katalazy i należą do fakultatywnych beztlenowców. W obrazie mikroskopowym przyjmują postać nieregularnych komórek, układających się po dwie, trzy przypominających litery T, V, L, X, Y. Do rodzaju *Arcanobacterium* należy gatunek *Arcanobacterium haemolyticum* [47]. Na podłożach stałych bakteria ta może tworzyć dwa typy morfologii kolonii: gładkie i szorstkie. Większość szczepów tworzy kolonie gładkie. Szczepy o takim wyglądzie kolonii wywołują beta-hemolizę, nie wytwarzają β -glukuronidazy oraz fermentują sacharozę i trehalozę. Szczepy o koloniach szorstkich nie wywołują hemolizy, wytwarzają β -glukuronidazę oraz nie fermentują sacharozę i trehalozę. Szczepy o koloniach gładkich częściej wywołują zakażenia skóry, natomiast szorstkie w większości przypadków zakażeń są izolowane z materiału pochodzącego z dróg oddechowych [46, 57]. niewiele wiadomo o czynnikach wirulencji tych bakterii. *A. haemolyticum* wytwarza fosfolipazę D i neuraminidazę. Fosfolipaza D rozkłada sfingomielinę wywołując nekrozę skóry i tkanki podskórnej oraz umożliwia wnikanie bakterii w głąb tkanek. Fosfolipaza D rozpoznaje także związki lipidowe w komórkach gospodarza prowadząc do zwiększenia adhezji bakterii do tych komórek [22]. Fosfolipaza D należy do cytolizyn zależnych od cholesterolu i u bakterii tego gatunku określana jest mianem arkanolizyny. W budowie chemicznej tego

enzymu zamiast cysteiny występuje alanina. Arkanolizyna wykazuje swoistość wobec erytrocytów ludzkich, króliczych, owczych i bydłych [18]. *A. haemolyticum* często opisywany jest jako „tajemnicza bakteria”, gdyż może być uznawana za zanieczyszczenie czy składnik mikrobioty i pomijana jako czynnik etiologiczny zakażenia [40, 57]. Najczęstszą postacią zakażenia *A. haemolyticum* jest zapalenie gardła i migdałków. Szacuje się, że nawet 0,5–2,5% przypadków zapalenia gardła może być wywołanych przez ten gatunek, a w 20–50% przypadków zapalenia gardła o tej etiologii występuje wysypka [32, 40]. Rzadziej bakterie te mogą wywoływać zapalenie kości [5, 50], martwicze zapalenie powięzi [44, 50], zapalenie skóry, tkanek miękkich i tkanki łącznej [23, 36]. Bakterie te zazwyczaj pozostają wrażliwe na antybiotyki takie jak: penicyliny, cefalosporyny, karbapenemy, makrolidy, fluororchinolony, tetracykliny, rifampicynę i wankomycynę. Potwierdzają to wyniki badań (dane niepublikowane, Sękowska). W leczeniu głębokich zakażeń zastosowanie ma penicylina w wysokich dawkach w monoterapii lub podawana w skojarzeniu z gentamycyną. W naszym szpitalu szczepy *A. haemolyticum* izolowane były głównie od pacjentów z cukrzycą z zakażeń skóry i tkanki podskórnej, owrzodzeń kończyn dolnych, a także z kikuta po amputacji kończyny.

Brevibacterium spp. to katalazo-dodatnie, obligatoryjne tlenowce, zdolne do wzrostu w szerokim zakresie pH (5,5–9,5) i w podłożu zawierającym chlorek sodu w stężeniu 6,5% (w/v). W ścianie komórkowej tych bakterii obecne są kwasy tłuszczowe: pentadekanowy, heptadekanowy i mesodiaminopimelinowy. *Brevibacterium* spp. wytwarzają metanotiol (merkaptan metylowy) z L-metioniny, co warunkuje ich charakterystyczny zapach. Rodzaj ten powszechnie występuje w glebie i wodzie, a także na skórze człowieka. Izolowano je również ze świeżego mleka i dojrzałych serów, a ze względu na specyficzny zapach są one wykorzystywane w przemyśle serowarskim do wyrobu serów Liverat, Relette, Limburger i Näsäl. Najczęściej opisywane przypadki zakażeń gatunkami *Brevibacterium casei* i *Brevibacterium otitidis* dotyczą zapalenia otrzewnej [3, 11, 19, 34, 39]. Opisano również przypadki zakażeń: krwi [6, 34], ropni mózgu [28], zapalenia gałki ocznej [7], czy ośrodkowego układu nerwowego [16, 28]. W naszym szpitalu szczepy *Brevibacterium* spp. izolowano z krwi i biomateriałów od pacjentów z zakażeniem uogólnionym i zakażeniem odcewnikowym. Odnotowano także jeden przypadek izolacji *B. casei* z płynu konserwującego nerkę, ale najprawdopodobniej była to kontaminacja próbki ze środowiska zewnętrznego. Wszystkie hodowane szczepy były wrażliwe na imipenem i wankomycynę. Natomiast wrażliwość na penicylinę, cefotaksym, klindamycynę i ciprofloksacynę była zróżnicowana, od szczepów w pełni wrażliwych przez obniżoną wrażliwość po szczepy całkowicie odporne.

3. Paciorkowce o szczególnych wymaganiach odżywczych

Inne bakterie, które coraz częściej są izolowane z próbek materiału klinicznego to paciorkowce o szczególnych wymaganiach odżywczych, należące do rodzajów *Granulicatella* i *Abiotrophia*. Bakterie te wymagają do wzrostu pirydoksalu, cysteiny i witaminy B6. Są katalazo-ujemne, fakultatywnie beztlenowe. Wchodzą w skład mikrobioty górnych dróg oddechowych, przewodu pokarmowego i układu moczowo-płciowego. W zależności od dostępności wyżej wymienionych związków w środowisku mogą one tworzyć formy od typowych ziarenkowców, poprzez ziarniako-pałeczki do regularnych form cylindrycznych z tendencją do tworzenia łańcuszków. Również morfologia kolonii na podłożach stałych zależy od dostępności związków odżywczych w podłożu. Wokół kolonii może występować hemoliza typu α lub γ .

Z przypadków zakażeń najczęściej izolowane są następujące gatunki: *G. adiacens*, *G. elegans*, *G. paradiacens*. Do czynników ryzyka zakażeń *Granulicatella* spp. należą: sterydoterapia, leczenie dożylnie, zaburzenia odżywiania (w tym anoreksja, bulimia, ale także zmiana diety), zaburzenia krążenia, cukrzyca. Najczęściej bakterie te wywołują infekcyjne zapalenie wsierdza (IZW) na zastawkach naturalnych i sztucznych. *Granulicatella* spp. mogą być czynnikiem etiologicznym nawet w 5% IZW [1, 37, 55, 56]. Częstość IZW o tej etiologii wynosi 44% na zastawce aortalnej, 38% mitralnej, 13% trójdziałowej, a w 13% jest to IZW wielozastawkowe [43, 48, 56]. *G. adiacens* obok *Streptococcus mutans* i *Veillonella atypica* jest najczęściej izolowanym drobnoustrojem z biofilmu tworzonego na protezach [37]. Bakterie z rodzaju *Granulicatella* mogą być przyczyną nawet 2% bakteriemii, a ponadto zakażeń narządu wzroku [27, 53], zapalenia kości [59], czyraków [51]. Wyniki naszych badań potwierdzają udział *Granulicatella* spp. w zakażeniach ran, w obrębie jamy brzusznej i ropni (dane niepublikowane, Sękowska). Izolowane szczepy *Granulicatella* spp. w większości były wielolekowrażliwe, ale hodowano także szczep z zachowaną wrażliwością tylko na cefotaksym. Wyniki badań Prasadithrathsint i Fisher [41] sugerują, że wrażliwość na penicylinę i ceftriakson może być związana z gatunkiem. Szczepy *G. elegans* były wrażliwe na wyżej wymienione antybiotyki, odpowiednio w 80% i 90%, a *G. adiacens* w 39,4% i 47,2%. Ponad 90% szczepów z obu gatunków było wrażliwych na meropenem, lewofloksacynę i wankomycynę. Renz i wsp. [45] opisali związek między obecnością *Granulicatella* spp. a rozwojem próchnicy i chorób przyzębia.

Abiotrophia spp. w odróżnieniu od *Granulicatella* spp. wytwarzają β - i α -galaktozydazę. Do rodzaju należy jeden gatunek *Abiotrophia defectiva*, który może wywoływać bakteriemie, zapalenie rogówki [38], zapalenie

błony śluzowej jamy ustnej i dziąseł [58], zakażenie układu moczowego [17], infekcyjne zapalenie wsierdza [15, 17]. Częściej zakażenia *Abiotrophia* spp. są opisywane w grupie pacjentów z neutropenią. W leczeniu IZW o tej etiologii lekami z wyboru są penicyliny w skojarzeniu z gentamycyną [15]. Szczepy te pozostają wrażliwe na ceftriakson, klindamycynę, lewofloksacynę i wankomycynę [41].

4. Pałeczki Gram-ujemne

Kolejną grupą bakterii, w której zaszły zmiany systematyczne i pojawiły się nowe gatunki są pałeczki Gram-ujemne z rodzaju *Pantoea* należące do rodziny *Erwiniaceae* [2]. Gatunek *Pantoea agglomerans* został reklasyfikowany z rodzaju *Enterobacter*. Są to urzęsione bakterie, wytwarzające żółty barwnik, zdolne do wzrostu w temperaturze 40°C. Często określane jako „bakteria rolnicza”, z uwagi na powszechne występowanie w środowisku naturalnym (owoce, warzywa, rośliny, woda, gleba). Izolowano je także z odchodów zwierząt. Istotną grupę ryzyka zakażeń tymi pałeczkami stanowią ogrodnicy, a w warunkach szpitalnych wcześniaki, noworodki z wadami wrodzonymi, a także pacjenci, u których stosowane są biomateriały. Wrota zakażenia najczęściej stanowi przerwanie ciągłości skóry [11], a źródłem zakażeń mogą być preparaty podawane pozajelitowo, produkty krwiopochodne, krwiozastępcze, bandaże i opatrunki. Z dostępnego piśmiennictwa wynika, że zakażenia tymi bakteriami najczęściej dotyczą krwi [4, 8, 10, 29, 49, 54] i układu oddechowego [4, 8, 14, 54]. Opisano również przypadki zapalenia otrzewnej [25], zapalenia gałki ocznej [31], czy pozabiegowego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych [49]. W badaniach szczepy *Pantoea* spp. izolowano z ran, krwi, biomateriałów oraz moczu głównie od pacjentów szpitalnych onkologicznych i z cukrzycą. Izolowano także szczepy wielolekooporne z płynu z jamy ciała od pacjenta z ostrą niewydolnością oddechową oraz szczep ESBL-dodatni od dziecka z białaczką. Odnotowano kilka szczepów pochodzących ze środowiska szpitalnego (wózka zabiegowego i syfonu umywalki) (dane niepublikowane, Sękowska).

W grupie pałeczek Gram-ujemnych niefermentujących w rodzinie *Comamonadaceae* utworzono nowy rodzaj *Delftia*, do którego należy gatunek *Delftia acidovorans* (dawniej *Comamonas acidovorans*). Reklasyfikacja nastąpiła w oparciu o sekwencję 16S rRNA [33]. Są to pałeczki tlenowe, wytwarzające oksydazę i indol z tryptofanu. Bakterie te powszechnie są izolowane ze środowiska szpitalnego i przez wiele lat uważane były za niepatogenne. Cechą charakterystyczną tych bakterii jest delftibaktyna. Jest to substancja, która neutralizuje jony złota przekształcając je w nieszkodliwe złote

nanocząstki. Gromadzą się one poza komórkami bakterii tworząc zabarwiony na czerwono roztwór koloidalny [21]. Stąd, bakterie te często nazywane są „bakteriami Króla Midasa”. Na podłożach stałych *D. acidovorans* rośnie w postaci kolonii złotych lub ze złotym połyskiem. Bakterie te izolowano także z mleka termizowanego i ścieków. Wśród czynników ryzyka wymienia się obecność biomateriałów oraz choroby: AIDS i nowotwory [9]. Z uwagi na zdolność do tworzenia biofilmu najczęściej opisywane są przypadki bakteriemii związanej z cewnikiem [12, 20, 24, 30, 42, 52]. Potwierdzają to także obserwacje z naszego ośrodka, chociaż najczęściej szczepy *Delftia* spp. izolowano z wymazów z ran przewlekłych i z zakażeń miejsca operowanego (dane niepublikowane, Sękowska). Pojawiły się także opisy przypadków ropniaka [26], zapalenia płuc [9], IZW [35] oraz zakażeń układu moczowego [25]. Pałeczki *D. acidovorans* są wrażliwe na cefalosporyny o szerokim zakresie działania, ureidopenicyliny, kotrimoksazol, fluorochinolony i tetracyklinę [35, dane niepublikowane Sękowska].

5. Podsumowanie

Coraz częstsza izolacja z zakażeń gatunków bakterii dotychczas określanych jako „niechorobotwórcze” wiąże się także z powiększającą się grupą osób z obniżoną odpornością (angiopatią, obniżoną aktywnością limfocytów T w odpowiedzi immunologicznej, obniżoną funkcją neutrofilów, niskim poziomem wydzielania cytokin prozapalnych), chorobami cywilizacyjnymi, czy wyniszczającymi. Z drugiej strony wpływ na taką sytuację mają także same bakterie łatwo adaptujące się do nowych warunków życia. Często są to gatunki rosnące w szerokim zakresie temperatur i pH, a także o niskich wymaganiach odżywczych (oligotrofy). Wirulencja tych bakterii jest silniej wyrażona w wytwarzaniu czynników ułatwiających adhezję do komórek gospodarza, kolonizację szczególnie przewodu pokarmowego i ewentualnie późniejsze zakażenie.

Postęp medycyny, jaki dokonał się w ostatnich latach niewątpliwie korzystnie wpłynął na długość życia pacjentów z niektórymi chorobami (cukrzycą, miażdżycą, chorobami układu krążenia) i w wielu sytuacjach przyczynił się do poprawy jego jakości. Niestety, umożliwił także zakażenia bakteriami dotychczas uważanymi za niepatogenne i prawdopodobnie takich przypadków będzie coraz więcej.

Piśmiennictwo

- Adam E.L., Siciliano R.F., Gualandro D.M., Calderaro D., Issa V.S., Rossi F., Caramelli B., Mansur A.J., Strabelli T.M.: Case series of infective endocarditis caused by *Granulicatella* species. *Int. J. Infect. Dis.* **31**, 56–58 (2015)
- Aldeolu M., Alnajjar S., Naushad S., Gupta R.: Genome-based phylogeny and taxonomy of the *Enterobacteriales*: proposal for *Enterobacteriales* ord nov divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., *Budviviaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**, 5575–5599 (2016)
- Althaf M.M., Abdelsalam M.S., Alsunaid M.S., Hussein M.H.: *Brevibacterium casei* isolated as a cause of relapsing peritonitis. *BMJ Case Rep.* DOI:10.1136/bcr-2014-203611 (2014)
- Aly N.Y., Salmeen H.N., Lila R.A., Nagaraja P.A.: *Pantoea agglomerans* bloodstream infection in preterm neonates. *Med. Princ. Pract.* **17**, 500–503 (2008)
- Bae S.Y., Choi S.M., Kang S.J., Jang H.C., Park K.H., Jung S.I., Shin J.H.: A case of *Arcanobacterium haemolyticum* bacteremia and osteomyelitis diagnosed by 16s rRNA sequencing. *Infect. Chemother.* **42**, 241–243 (2010)
- Bal Z.S., Sen S., Karapınor D.Y., Aydemir S., Vardar F.: The first reported catheter-related *Brevibacterium casei* bloodstream infection in a child with acute leukemia and review of the literature. *Braz. J. Infect. Dis.* **19**, 213–215 (2015)
- Banu A., Ks S., M V., Er N.: Post-traumatic endophthalmitis due to *Brevibacterium casei*: A case report. *Australas Med. J.* **6**, 70–72 (2013)
- Bergman K.A., Arends J.P., Scholvinck J.K.: *Pantoea agglomerans* septicemia in three newborn infants. *Paediatric. Inf. Dis. J.* **26**, 453–454 (2007)
- Bilgin H., Sarmis A., Tigen E., Soyletir G., Mulazimoglu L.: *Delftia acidovorans*: A rare pathogen in immunocompetent and immunocompromised patients. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **26**, 277–279 (2015)
- Cheng A., Liu C.Y., Tsai H.Y., Hsu M.S., Yang C.J., Hyang Y.T., Liao C.H., Hsueh P.R.: Bacteremia caused by *Pantoea agglomerans* at a medical center in Taiwan, 2000–2010. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **46**, 187–194 (2013)
- Choi J.S., Kim C.S., Park J.W., Bae E.H., Ma S.K., Kim S.W.: Consecutive episodes of peritonitis in a patient undergoing peritoneal dialysis caused by unusual organisms: *Brevibacterium* and *Pantoea agglomerans*. *Kidney Res. Clin. Pract.* **31**, 121–123 (2012)
- Chotikanatis K., Backer M., Rosas-Garcia G., Hammerschlag M.R.: Recurrent intravascular-catheter-related bacteremia caused by *Delftia acidovorans* in a hemodialysis patient. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 3418–3421 (2011)
- Collins M.D., Jones D., Schofield G.M.: Reclassification of *Corynebacterium haemolyticum* (MacLean, Liebow & Rosenberg) in the genus *Arcanobacterium* gen. nov. as *Arcanobacterium haemolyticum* nom. rev. comb. nov. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 1279–1281 (1982)
- Cruz AT, Cazacu AC, Allen CH.: *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 1989–1999 (2007)
- Escarcega E., Trovato C., Idahosa O., Gillard J., Stankevicz H.: *Abiotrophia defectiva* endocarditis: an easy miss. *Clin. Pract. Cases Emerg. Med.* **1**, 229–231 (2017)
- Fe Talento A., Malnick H., Cotter M., Brady A., McGowan D., Smith E., Fitzpatrick F.: *Brevibacterium otitidis*: an elusive cause of neurosurgical infection. *J. Med. Microbiol.* **62**, 486–488 (2013)
- Foley E.D., Omran M.B., Bora V., Castresana M.R.: Cardiogenic and septic shock associated with aortic and mitral valve infective endocarditis caused by *Abiotrophia defectiva* from a urinary tract infection. *SAGE. Open Med. Case Rep.* **6**, 1–4 (2018)
- Gellings P.S., McGee D.J.: *Arcanobacterium haemolyticum* phospholipase D enzymatic activity promotes the hemolytic

- activity of the cholesterol-dependent cytolysin arcanolysin. *Toxins*, DOI:10.3390/toxins10060213 (2018)
19. Gruner E., Pfyffer G.E., von Graevenitz A.: Characterization of *Brevibacterium* spp. from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 1408–1412 (1993)
 20. Hagya H., Murase T., Sugiyama J., Kuroe Y., Nojima H., Naito H., Hagioka S., Morimoto N.: *Delftia acidovorans* bacteremia caused by bacterial translocation after organophosphorus poisoning in an immunocompetent adult patient. *J. Infect. Chemother.* **19**, 338–341 (2013)
 21. Johnston C.W., Wyatt M.A., Ibrahim A., Shuster J., Southam G., Magarvey N.A.: Gold biomineralization by a metallophore from a gold-associated microbe. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 241–243 (2013)
 22. Jost B.H., Lucas E.A., Billington S.J., Ratner A.J., McGee D.J.: Arcanolysin is a cholesterol-dependent cytolysin of the human pathogen *Arcanobacterium haemolyticum*. *BMC Microbiology*, **11**, 239 (2011)
 23. Kang H., Park G., Kim H., Hang K.: Haemolytic differential identification of *Arcanobacterium haemolyticum* isolated from a patient with diabetic foot ulcers. *JMM Case Rep.* **12**, e005016 (2016)
 24. Kawamura I., Yagi T., Hatakeyama K., Ohkura T., Ohkusu K., Takahashi Y., Kojima S., Hasegawa Y.: Recurrent vascular catheter-related bacteremia caused by *Delftia acidovorans* with different antimicrobial susceptibility profiles. *J. Infect. Chemother.* **1**, 111–113 (2011)
 25. Kazancioglu R., Buyukaidin B., Iraz M., Alay M., Erkoç M.: An unusual cause of peritonitis in peritoneal dialysis patients: *Pantoea agglomerans*. *J. Infect. Dev. Ctries.* **14**, 919–922 (2014)
 26. Khan S., Sistla S., Dhodapkar R., Parija S.C.: Fatal *Delftia acidovorans* in an immunocompetent patient with empyema. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2**, 923–924 (2012)
 27. Ku C.A., Forcina B., LaSala P.R., Nguyen J.: *Granulicatella adiacens*, an unusual causative agent in chronic dacryocystitis. *J. Ophthalmic. Inflamm. Infect.* DOI:10.1186/s12348-015-0043-2 (2015)
 28. Kumar V.A., Augustine D., Panikar D., Nandakumar A., Dinesh K.R., Karim S., Philip R.: *Brevibacterium casei* as a cause of brain abscess in an immunocompetent patient. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 4374–4376 (2011)
 29. Lalas K.M., Erichsen D.: Sporadic *Pantoea agglomerans* bacteremia in a near-term female: case report and review of literature. *Jpn. J. Inf. Dis.* **63**, 290–291 (2010)
 30. Lang K.J., Chinzowu T., Cann K.J.: *Delftia acidovorans* as an unusual causative organism in line-related sepsis. *Indian J. Microbiol.* **52**, 102–103 (2012)
 31. Lee N.E., Chung I.Y., Park J.M.: A case of *Pantoea* endophthalmitis. *Korean J. Ophthalmol.* **24**, 318–321 (2010)
 32. Linder R.: *Rhodococcus equi* and *Arcanobacterium haemolyticum*: two coryneform bacteria increasingly recognized as agents of human infection. *Emerg. Infect. Dis.* **3**, 145–153 (1997)
 33. Lipuma J.J., Currie B.J., Peacock S.J., Vandamme P., Whittier S.: *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Pandoraea*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Delftia*, and *Acidovorax* in Versalovic J., et al., editors. (ed), *Manual of Clinical Microbiology*, 10th ed. ASM Press, Washington, 2011, s. 693–713
 34. Magi B., Migliorini L., Santoni A., Cusi M.G.: *Brevibacterium casei* bacteraemia in a port-a-cath cartier patient: a case report and literature review. *Infez. Med.* **3**, 263–265 (2018)
 35. Mahmood S., Taylor K.E., Overman T.L., McCormick M.I.: Acute infective endocarditis caused by *Delftia acidovorans*, a rare pathogen complicating intravenous drug use. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 3799–3800 (2012)
 36. Miyamoto H., Suzuki T., Murakami S., Fukuoka M., Tanaka Y., Kondo T., Nishimiya T., Suemori K., Tauchi H., Osawa H.: Bacteriological characteristics of *Arcanobacterium haemolyticum* isolated from seven patients with skin and soft-tissue infections. *J. Med. Microbiol.* **64**, 369–374 (2015)
 37. Nedumgottil B.M.: Relative presence of *Streptococcus mutans*, *Veilonella atypica* and *Granulicatella adiacens* in biofilm of complete dentures. *J. Ind. Prostodont. Soc.* **18**, 24–28 (2018)
 38. Paulus Y.M., Cockerham G.C.: *Abiotrophia defectiva* causing infectious crystalline keratopathy and corneal ulcer after penetrating keratoplasty: a case report. *J. Ophthalmic. Inflamm. Infect.* DOI:10.1186/1869-5760-3-20 (2013)
 39. Poesen K., Meeus G., Boudewijns M., Colgert J., Doubel P.: Relapsing *Brevibacterium casei* peritonitis: value of 16S rRNA gene sequencing in accurate species identification. *Perit. Dial. Int.* **3293**, 341–344 (2012)
 40. Poplin V., McKinsey D.S.: *Arcanobacterium* brain abscesses, subdural emphyema and bacteremia complicating Epstein-Barr virus mononucleosis. *Kansas J. Med.* **11**, 11–14 (2018)
 41. Prasadthratsint K., Fisher M.A.: Antimicrobial susceptibility patterns among a large, nationwide cohort of *Abiotrophia* and *Granulicatella* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* **55**, 1025–1031 (2017)
 42. Preiswerk B., Ullrich S., Speich R., Bloemberg G.V., Hombach M.: Human infection with *Delftia tsuruhatensis* isolated from a central venous catheter. *J. Med. Microbiol.* **60**, 246–248 (2011)
 43. Quiroga B., Arroyo D., Verde E., Eworo A., Luno J.: Infective endocarditis on a percutaneous prosthetic aortic valve with associated glomerulopathy due to *Granulicatella adiacens*. *Braz. J. Infect. Dis.* **16**, 601–602 (2012)
 44. Ramey N.A., Burkat C.N.: Re: „Orbital necrotizing fasciitis and osteomyelitis caused by *Arcanobacterium haemolyticum*: a case report?”. *Ophthal. Plast. Reconstr. Surg.* DOI:10.1097/IOP.0000000000000413 (2015)
 45. Renz N., Chevaux F., Borens O., Ttrampuj A.: Successful treatment of periprosthetic joint infection caused by *Granulicatella para-adiacens* with prosthesis retention: a case report. *BMC Musculoskelet Disord.* **12**, 156 (2016)
 46. Ruther H.S., Philips K., Ross D., Crawford A., Weidner M.P., Sammra O., Lamler M.C., McGee D.J.: Smooth and rough biotypes of *Arcanobacterium haemolyticum* can be genetically distinguished at the arcanolysin locus. *Plos One*, **18**, e0137346 (2015)
 47. Sammra O., Friis-Møller A., Balbutskaya A., Hijazin M., Nagib S., Alber J.: Phenotypic and genotypic characteristics of *Arcanobacterium haemolyticum* isolated from clinical samples in a Danish hospital. *Folia Microbiol.* **59**, 369–374 (2014)
 48. Sim B.W., Koo R.M., Hawkins C., Bowden F., Watson A.: *Granulicatella adiacens* subacute bacterial endocarditis as the underlying cause of type II mixed cryoglobulinaemia. *BMJ Case Rep.* DOI:10.1136/bcr-2014-206091 (2015)
 49. Siwakoti S., Sah R., Rajbhandari R.S., Khanal B.: *Pantoea agglomerans* infections in children: report of two cases. *Case Rep. Pediatr.* DOI:10.1155/2018/4158734 (2018)
 50. Stone L.A., Harshbarger R.J. 3rd.: Orbital necrotizing fasciitis and osteomyelitis caused by *Arcanobacterium haemolyticum*: a case report. *Ophthal. Plast. Reconstr. Surg.* **31**, e 31–33 (2015)
 51. Swain B., Otta S.: *Granulicatella adiacens* an unusual causative agent for carbuncle. *Indian J. Pathol. Microbiol.* **55**, 609–610 (2012)
 52. Tabak O., Mete B., Aydin T., Mandel M.N., Oltu B., Ozaras R., Tabak F.: Port-related *Delftia tsuruhatensis* bacteremia in a patient with breast cancer. *New. Microbiol.* **36**, 199–201 (2013)
 53. Teo L., Looi A., Seah L.L.: An unusual causative agent for an orbital abscess: *Granulicatella adiacens*. *Orbit*, **30**, 162–164 (2011)

54. Tiwari S., Beriha S.S.: *Pantoea* species causing early onset neonatal sepsis: a case report. *J. Med. Case Rep.* DOI:10.1186/s13256-015-0670-0 (2015)
55. Vandana K.E., Mukhopadyay C., Ray N.R., Ajith V., Rajath P.: Native valve endocarditis and femoral embolism due to *Granulicatella adiacens*: a rare case report. *Braz. J. Infect. Dis.* **14**, 634–636 (2010)
56. Wang R., Kaplan A., Guo L., Shi W., Zhou X., Lux R., Zhe X.: The influence of iron availability on human salivary microbial community composition. *Microb. Ecol.* **64**, 152–161 (2012)
57. Wong V., Turmezei T., Cartmill M., Soo S.: Infective endocarditis caused by *Arcanobacterium haemolyticum*: a case report. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* DOI:10.1186/1476-0711-10-17 (2011)
58. Yacoub A.T., Krishnan J., Acevedo I.M., Halliday J., Grene JN.: Nutritionally variant streptococci bacteremia in cancer patients: a retrospective study, 1999–2014. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* **71**, e2015030 (2015)
59. York J., Fisahn C., Chapman J.: Vertebral osteomyelitis due to *Granulicatella adiacens*, a nutritionally variant streptococci. *Cureus*, **28**, e808 (2016)

ANALIZA WYBRANYCH CECH GENETYCZNYCH, FENOTYPÓW I ZAGROŻENIA EPIDEMIOLOGICZNEGO BAKTERIAMI Z RODZAJU *ENTEROCOCCUS* OPORNymi NA WANKOMYCYNĘ

Wojciech Rogóż, Daniel Sypniewski*, Ilona Bednarek

Zakład Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej, Wydział Farmaceutyczny
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Wpłynęło w styczniu, zaakceptowano w listopadzie 2018 r.

Streszczenie: Enterokoki to bakterie Gram-dodatnie, należące do względnie beztlenowych ziarniaków. Gatunki należące do rodzaju *Enterococcus* na ogół mają niewielki potencjał infekcyjny, jednak mogą wywoływać groźne zakażenia szpitalne. Do grupy podwyższonego ryzyka zalicza się pacjentów z chorobami rozrostowymi, z przewlekłymi chorobami wątroby oraz po przeszczepach. Od lat osiemdziesiątych XX w. obserwuje się pojawiające się coraz częściej zakażenia enterokokami opornymi na liczne antybiotyki. Istnieją dwie, niezależne od siebie drogi rozwoju oporności na wankomycynę, związane z powszechnym leczeniem MRSA przy pomocy wankomycyny oraz jej zastosowaniem pozamedycznym. Wśród opornych na wankomycynę szczepów enterokoków można wyróżnić 9 fenotypów: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM, VanN. Wszystkie te fenotypy różnią się między sobą w większym lub mniejszym stopniu na poziomie molekularnym. Obecnie lekami stosowanymi w leczeniu infekcji wywołanych enterokokami są m. in. linezolid, chinuprystyna/dalfoprystyna, daptomycyna, tigecyklina i chloramfenikol. Posiadane obecnie dane, zarówno z terenu Europy, jak i całego świata wskazują na stały wzrost ilości pojawiających się izolatów VRE, jak również opornych na antybiotyki inne niż wankomycyna.

1. Wprowadzenie. 2. Zakażenia enterokokami. 3. Leczenie zakażeń enterokokami i antybiotykooporność. 4. Rozwój zjawiska oporności na wankomycynę. 5. Leki stosowane w zwalczaniu zakażeń szczepami opornymi na wankomycynę. 6. Drogi powstawania oporności na wankomycynę. 7. Fenotypy szczepów opornych na wankomycynę. 8. Charakterystyka molekularna fenotypów szczepów opornych na wankomycynę. 9. Sytuacja epidemiologiczna na świecie. 10. Sytuacja epidemiologiczna w Polsce. 11. Sytuacja epidemiologiczna w Europie. 12. Podsumowanie

ANALYSIS OF SELECTED GENETIC TRAITS, PHENOTYPES, AND EPIDEMIOLOGICAL THREAT OF *ENTEROCOCCUS* BACTERIA RESISTANT TO VANCOMYCIN

Abstract: Enterococci are Gram-positive bacteria that belong to facultative anaerobic cocci. Species belonging to the genus *Enterococcus* generally display little infectious potential, however, they can cause serious nosocomial infections. The groups of high risk include patients with proliferative diseases, chronic liver diseases, and graft recipients. Since 1980s more and more frequently infections with enterococci resistant to numerous antibiotics are being observed. There are two independent ways of development resistance to vancomycin, connected with common use of vancomycin for MRSA treatment and non-medical use of this antibiotic. Nine phenotypes of vancomycin-resistant enterococcal strains can be distinguished: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM, VanN. These phenotypes differ to a different extent at the molecular level. Current treatments of enterococcal infections usually include drugs such as linezolid, quinupristin/dalfopristin, daptomycin, tigecycline, and chloramphenicol. Data available from Europe and other parts of the world indicate a constant increase in the number of emerging VRE isolates, as well as strains resistant to antibiotics other than vancomycin.

1. Introduction. 2. Infections with enterococci. 3. Treatment of enterococcal infections and antimicrobial resistance. 4. Development of VRE phenomenon. 5. Drugs used to control infections with VRE strains. 6. Routes of VRE spread. 7. VRE phenotypes. 8. Molecular characteristics of VRE phenotypes. 9. Epidemiological situation in the world. 10. Epidemiological situation in Poland. 11. Epidemiological situation in Europe. 12. Summary

Słowa kluczowe: antybiotykooporność, *Enterococcus*, VRE, wankomycyna
Key words: antimicrobial resistance, *Enterococcus*, vancomycin, VRE

1. Wprowadzenie

Enterokoki to bakterie Gram-dodatnie, należące do względnie beztlenowych ziarniaków. Występują głównie w jelitach, gdzie stanowią naturalną mikroflorę, chroniącą przed patogenami. Na ogół mają postać dwoinek

lub krótkich łańcuchów. Rodzaj *Enterococcus* tworzy 38 gatunków, ale tylko niektóre z nich są istotne z klinicznego punktu widzenia – należą do nich *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum* oraz *E. casseliflavus* [1, 2]. Pierwszy z gatunków jest bardzo często izolowany z układu pokarmowego, zwłaszcza jelita rubego,

* Autor korespondencyjny: dr n. farm. Daniel Sypniewski, Zakład Biotechnologii i Inżynierii Genetycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, ul. Jedności 8, 41-200 Sosnowiec; tel. 32 364 12 74; e-mail: dsypniewski@sum.edu.pl

i układu moczowo-płciowego (ok. 39–95% prób klinicznych), podobnie jak *E. faecium*, który jednak można wyizolować zdecydowanie rzadziej (ok. 3–47% prób klinicznych) [1]. Oba te gatunki mogą być patogenami człowieka. Dwa pozostałe, *E. gallinarum* i *E. casseliflavus*, mimo że wykazują naturalną oporność na wankomycynę, pojawiają się sporadycznie (łącznie około 5% próbek klinicznych) i na ogół nie są patogenne [3, 4].

Enterokoki w warunkach laboratoryjnych można hodować na powszechnie dostępnych, nieselektywnych podłożach wzbogaconych, takich jak agar czekoladowy czy agar krwawy. Wzrastają również w warunkach wysokiego stężenia chlorku sodu i soli żółciowych. Charakteryzują się dużą tolerancją temperaturową – mogą wzrastać w zakresie 10–45°C. Wokół kolonii enterokoków na agarze z krwią baranią można zaobserwować obszary hemolizy. W analizie mikroskopowej praktycznie nie da się ich odróżnić od pneumokoków (*Streptococcus pneumoniae*), dlatego konieczne jest zastosowanie testów biochemicznych. Wykazują oporność na optochinę, która aktywna jest wobec pneumokoków, a ponadto nie rozpuszczają się w solach kwasów żółciowych, a wynik testu PYR (obecność L-pirolidonyloaryloamidazy) jest pozytywny [4].

Pomimo ogólnie niewielkiego potencjału infekcyjnego gatunki zaliczane do rodzaju *Enterococcus* mogą być przyczyną niebezpiecznych zakażeń szpitalnych [4]. W Stanach Zjednoczonych stanowią jeden z najczęściej izolowanych mikroorganizmów z przewodu pokarmowego i ran [3]. Nie tworzą silnych toksyn bakteryjnych, ale posiadają wiele innych czynników zjadliwości, do których zalicza się:

i adhezyny powierzchniowe, takie jak:

- a) białko ESP (enterokokowe białko powierzchniowe), którego zadanie polega na wiązaniu kolagenu do powierzchni komórki bakteryjnej. Występuje u *E. faecalis* i *E. raffinosus*. U pierwszego z gatunków zbudowane jest z 1972 aminokwasów, a u drugiego z 2311; kodowane jest przez gen *esp* [1, 4–6]. Stanowi też potencjalny czynnik wirulencji u *E. faecium* [1];
- b) glikokaliks polisacharydowy, pośredniczący w wiązaniu do komórek gospodarza, takich jak komórki nabłonka wyściełającego powierzchnię pochwy lub jelita [4];
- c) substancja agregująca (AS), obecna w błonie komórkowej. Umożliwia komórkom bakteryjnym agregację, wiązanie do komórek gospodarza, a także udział w horyzontalnym transferze plazmidowego DNA [4]. Jest kodowana np. przez gen *agg* lub gen *asa1* [7; 8].

ii białka wydzielane poza komórkę, takie jak:

- a) żelatynaza i proteaza serynowa, które wykazują aktywność proteolityczną względem żelatyny, hemoglobiny, kolagenu i innych białek [4];

- b) cytolizyna wykazująca aktywność hemolityczną i hamująca wzrost bakterii Gram-dodatnich; może się też przyczyniać do lokalnego uszkodzenia tkanki [4]; zbudowana jest z podjednostek większej i mniejszej, kodowanych przez odpowiednio geny *cyl-L* i *cyl-S* [7];

- c) hialuronidaza, wydzielana przez szczepy *E. faecium* z kompleksu klonalnego CC17, występującego na całym świecie (w tym w Polsce); kodowana jest przez gen *hyl_{Efm}* [1];

Dla *E. faecalis* charakterystycznymi czynnikami zjadliwości są: cytolizyna, żelatynaza, hialuronidaza, podtlenki, substancja agregująca oraz adhezyny powierzchniowe, takie jak białko Esp [9]. W genomie *E. faecalis* zdecydowanie częściej występują geny *asa1* i *gelE* niż w *E. faecium*. *E. faecalis* dużo częściej niż *E. faecium* wytwarza cząsteczki umożliwiające tworzenie biofilmu [8].

2. Zakażenia enterokokami

Wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia zakażenia omawianymi patogenami wiąże się przede wszystkim ze stosowaniem terapii antybiotykami o szerokim spektrum działania [4]. Do grupy podwyższonego ryzyka zalicza się pacjentów z chorobami rozrostowymi, z przewlekłymi chorobami wątroby oraz biorców przeszczepionych narządów. Z uwagi na wysoką oporność enterokoków na środki dezynfekcyjne i antyseptyczne najczęściej dochodzi do przenoszenia tych bakterii na powierzchni dłoni personelu medycznego w szpitalach [1]. Bardzo istotny jest fakt, iż bakterie *Enterococcus* mogą przetrwać na dłoniach nawet przez 60 minut [10]. Możliwy jest również transfer bakterii niosących geny warunkujące oporność na wankomycynę między zwierzętami a ludźmi. Takie zjawisko udokumentowano zarówno w przypadku szczepów *E. faecium*, jak i *E. faecalis* [11]. W specyficznych okolicznościach enterokoki mogą rozwijać się w innych miejscach w organizmie niż ich typowe lokalizacje, na przykład w układzie oddechowym [4].

Bakterie z rodzaju *Enterococcus* są czynnikami etiologicznymi takich chorób jak zapalenie wsierdzia, sepsa, zapalenie otrzewnej, ropnie wewnątrzbrzuszne, zapalenia dróg żółciowych czy ran oparzeniowych [1]. Bakterie z rodzaju *Enterococcus*, które wykazują obecność istotnych czynników zjadliwości, umożliwiających wywoływanie trudnych do wyleczenia zakażeń (głównie szpitalnych), mogą zostać zaklasyfikowane jako przedstawiciele zupełnie różnych kompleksów klonalnych. Kompleksem klonalnym (CC – Clonal Complexes) jest grupa klonów bakteryjnych, której przedstawiciele wywodzą się od wspólnego przodka i wykazują wzajemne podobieństwo na poziomie molekularnym, a niekiedy także pod względem określonych cech fenotypowych.

typowych, np. posiadanych czynników zjadliwości [12]. Kompleksy klonalne są rozróżniane przy pomocy techniki molekularnej MLST (MultiLocus Sequence Typing), w której analizuje się sekwencje kilku alleli genów, kodujących białka metabolizmu podstawowego. Geny te ulegają ekspresji u wszystkich przedstawicieli danego gatunku na podobnym poziomie – dlatego nazywane są genami konstytutywnymi. W analizie *E. faecium* przeprowadzonej przez Homana i wsp. [13] brano pod uwagę następujące geny: *adk* (gen kodujący kinazę adenylanową), *atpA* (gen kodujący podjednostkę alfa syntazy ATP), *ddl* (gen kodujący ligazę D-alanina: D-alanina), *gyd* (gen kodujący dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego), *gdh* (gen kodujący dehydrogenazę glukozo-6-fosforanu), *pstS* (gen kodujący transporter z rodziny ABC) oraz gen kodujący podjednostkę ATPazy fosforybozyloaminoimidazolowej [10, 12, 13].

Podstawowym kompleksem klonalnym gatunku *E. faecium* jest, popularny w Europie, jak i na całym świecie, CC-17. Przedstawiciele kompleksu CC-17 w zdecydowanej większości wykazują oporność na wankomycynę (VRE – Vancomycin-Resistant *Enterococcus*) [10]. Szczepy tego kompleksu wykazują obecność białka Esp oraz zdolność do produkcji hialuronidazy i białka Acm wiążącego kolagen. Są również odporne nie tylko na wankomycynę, ale także na ampicylinę oraz chinolony, takie jak ciprofloksacyna [14, 15]. Z uwagi na częstość występowania CC-17 stanowią istotny problem zarówno w Polsce czy w USA oraz globalnie. Z analizy przeprowadzonej przez Top i wsp. [16] wynika, że na 217 izolatów VR *E. faecium* 97% (czyli 211 izolatów) stanowili przedstawiciele tego kompleksu klonalnego. Do innych kompleksów klonalnych gatunku *E. faecium* należy popularny w Europie CC-5, a w przypadku *E. faecalis* jest to CC-2 i CC-9 [11, 17]. Zespół badaczy pod kierunkiem M. Kawalec, badający kompleksy klonalne izolatów pozyskanych z polskich szpitali do 2007 roku, ustalił, że poza powszechnie znanymi na świecie CC-2 i CC-9, pojawiły się też nowe grupy klonów: CC-87 i CC-21. Pierwszy z nich był odpowiedzialny za powstanie czterech ognisk VRE, z czego trzy były związane z fenotypem VanA, a jedno z VanB. Szczepy należące do tego klonu wykazywały zdolność do przeprowadzania procesu hemolizy, natomiast nie były zdolne do produkcji żelatynazy [17].

3. Leczenie zakażeń enterokokami i antybiotykooporność

Standardowe leczenie zakażeń enterokokami polega na zastosowaniu skojarzonego połączenia aminoglikozydu z wankomycyną lub ampicyliną [4]. Podstawowym problemem w terapii zakażeń enterokokami jest jednak wysoka oporność tych bakterii na antybiotyki

[18]. Może być ona zarówno wrodzona, jak i nabyta. *E. faecium* wykazuje naturalną oporność na cefalosporyny, linkozamidy (np. klindamycynę), trimetoprim z sulfametoksazolem, a także na niskie stężenia aminoglikozydów [1, 4, 18]. Przyczyną tego zjawiska jest niski poziom wnikania aminoglikozydów do komórek. Stanowi to przyczynę łączenia przedstawicieli tej grupy antybiotyków z lekami hamującymi syntezę ściany komórkowej – głównie ampicyliną [19]. Dodatkowo, enterokoki mają naturalnie podwyższoną oporność na penicyliny – w porównaniu z paciorkowcami są od 10 do nawet 100 razy mniej wrażliwe na antybiotyki β-laktamowe (*E. faecalis*), natomiast *E. faecium* jest 4–16-krotnie mniej wrażliwy niż *E. faecalis* [1, 4, 19]. Związane jest to z bardzo często spotykaną u *E. faecium*, oraz dużo rzadziej w przypadku *E. faecalis*, nadekspresją białek PBP5 (białka wiążące penicyliny), natomiast w dużo mniejszym stopniu z wytwarzaniem β-laktamaz – ten mechanizm (warunkowany przez gen plazmidowy) występuje z kolei u enterokoków bardzo rzadko [19]. Obecnie przyjmuje się, że 25% szczepów enterokoków, zarówno *E. faecium*, jak i *E. faecalis*, cechuje się opornością na wysokie stężenia aminoglikozydów – takie szczepy nazywane są HLAR (High Level Aminoglycoside Resistance) [1, 4]. Oporność na gentamycynę pierwszy raz zaobserwowano w Stanach Zjednoczonych w 1979 roku zarówno u *E. faecium*, jak i *E. faecalis*, zaś na gentamycynę, tobramycynę, amikacynę, kanamycynę i streptomycynę w 1983 roku [20, 21]. Przyczyna tej oporności może wynikać bądź z enzymatycznej modyfikacji lub degradacji antybiotyku (w toku badań nad wspomnianymi próbkami z 1983 r. wykryto liczne enzymy, na przykład 3'-fosfotransferazę, 2'-fosfotransferazę czy 6'-acetylotransferazę [18, 21]), bądź też ze zmiany struktury miejsca przyłączenia antybiotyku do rybosomów [17]. Zdecydowana większość szczepów *E. faecium* jest oporna na ampicylinę [4, 18].

4. Rozwój zjawiska oporności na wankomycynę

Pierwsze doniesienia o pojawieniu się oporności na wankomycynę w zakażeniach bakteriami z rodzaju *Enterococcus*, czyli występowania szczepów VRE, pojawiły się w Europie, w Wielkiej Brytanii w 1988 roku (*E. faecalis* i *E. faecium*), a rok później w Stanach Zjednoczonych [1, 22]. Bardzo istotny z epidemiologicznego punktu widzenia był też rok 2002, w którym zanotowano pierwszy w historii przypadek, w którym na drodze horyzontalnego transferu genów nastąpiło przemieszczenie operonu *vanA* między przedstawicielem rodzaju *Enterococcus* o fenotypie VanA, a bakterią z gatunku *Staphylococcus aureus*, oporną na metycylinę, czyli pomiędzy szczepami VRE i MRSA, w wyniku czego powstał metycylineooporny szczep gronkowca

złocistego, niewrażliwy zarówno na metycylinę, jak i na teikoplaninę, czyli szczep VRSA [1]. Istotne jest to, iż szczepy zaliczane do VRE są klasyfikowane jako XDR (eXtensively Drug Resistant). Przynależność do tej grupy oznacza, że bakteria pozostaje obecnie wrażliwa wyłącznie na jeden antybiotyk z jednej lub dwóch grup, które są przeznaczone do zwalczania przedstawicieli jej gatunku [23].

5. Leki stosowane w zwalczaniu zakażeń szczepami opornymi na wankomycynę

Aby móc wyleczyć przypadki VRE konieczne jest stosowanie najnowszych leków przeciwbakteryjnych, które nie są niestety pozbawione wad. Do podstawowych leków stosowanych w leczeniu VRE zalicza się linezolid. Antybiotyk ten zaliczany jest do pochodnych oksazolidynonu. FDA zaleca jego zastosowanie w razie zakażenia VRE *E. faecium*, ale również m.in. do zwalczania MRSA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*) lub wrażliwych na penicylinę szczepów *S. pneumoniae*. Mechanizm działania linezolidu polega na hamowaniu syntezy białek na drodze oddziaływania z kompleksem mRNA-tRNA i rybosomem. Zaburza tworzenie kompleksu inicjacyjnego przez związanie podjednostki 50S rybosomu i uniemożliwienie przyłączenia tRNA [4]. Antybiotyk ten jest skuteczny głównie wobec Gram-dodatnich bakterii tlenowych i beztlenowych [24]. Oporność na linezolid występuje wprawdzie dość rzadko, ale wśród VRE jest dostrzegalna. Pierwsze jej przypadki odnotowano już w 2001 roku u 5 pacjentów leczonych linezolidem [25]. Również w 2001 roku odnotowano pierwsze przypadki oporności na wspomniany antybiotyk w Wielkiej Brytanii (dwa izolaty *E. faecium* i jeden *E. faecalis*) [26]. Wykryto mutację punktową w genie kodującym 23S rDNA (mutacja G2576T w nukleotydzie 2576), której występowanie wykazuje korelację z nieskutecznością terapii, może zatem stanowić jeden z markerów oporności na linezolid o nieznanym mechanizmie [27].

Kolejnym lekiem traktowanym jako tzw. lek „ostatniej szansy” jest mieszanina chinuprystyna/dalfoprystyna. Jest jednak nieskuteczna w przypadku zakażeń *E. faecalis*. Stosowane są także hamujące syntezę kwasów nukleinowych fluorochinolony, które niestety nie są zbyt aktywne w stosunku do szczepów wankomycynopornych [4]. Według Leavis i wsp., za oporność szczepów VRE na fluorochinolony, takie jak ciprofloksacyna, odpowiadają geny *parC*, *gyrA*, *parB* i *GyrE*. Szczególnie mutacje w dwóch pierwszych genach sprawiają, że bakterie stają się wysoce odporne na ciprofloksacynę [28]. W dalszej kolejności warto zwrócić uwagę na daptomycynę. Jest to cykliczny antybiotyk peptydowy, stosowany w terapii w USA od 2003 roku [29]. Jednakże już

w 2005 roku pojawiło się pierwsze doniesienie o występowaniu zakażenia szczepem VRE *E. faecium*, który był niewrażliwy również na ten antybiotyk. Dopiero zastąpienie go skojarzonym podaniem linezolidu i doksycykliny doprowadziło do wyleczenia pacjenta [29–30].

Kolejnym przykładem leku stosowanym w leczeniu VRE jest tigecyklina. Ten półsyntetyczny antybiotyk, zaliczany do grupy glicylcyklin, wykazuje aktywność bakteriostatyczną poprzez zaburzenie wiązania aminocylo-tRNA do miejsca A rybosomu bakteryjnego, w wyniku związania z podjednostką 30S. Mimo że jest dalece zmodyfikowaną pochodną tetracyklin, tigecyklina jest również aktywna względem szczepów na nie opornych [31]. Tigecyklina jest również na ogół skuteczna w zwalczaniu zarówno MRSA, VRE, jak i wobec wielu *Enterobacteriaceae*, które produkują karbapenemazę [32]. Wykorzystywana jest, zgodnie z rekomendacją KORLD (Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów), do leczenia ciężkich zakażeń skóry, tkanek podskórnych i jamy brzusznej [33]. Jak na wszystkie dostępne leki, również przeciwko temu wykształciła się oporność. W 2008 roku pojawiło się doniesienie o pacjencie z oddziału intensywnej terapii ze szpitala w Niemczech, od którego wyizolowano szczep *E. faecalis* oporny na tigecylinę [31].

Inne źródła sugerują, że do zwalczania zakażeń szczepami VRE można zastosować chloramfenikol [34]. Lek ten wywołuje zahamowanie transpeptydacji na rybosomach bakteryjnych, w wyniku związania z ich podjednostką 50S. Jego spektrum działania obejmuje tlenowe i beztlenowe bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne, a także riketsje. Na ogół wykazuje aktywność bakteriostatyczną. Zaleca się, aby był stosowany jedynie w najcięższych przypadkach, ze względu na liczne, silne działania niepożądane. Wywołuje silną supresję szpiku kostnego, a u noworodków może przyczynić się do wystąpienia „zespołu szarego dziecka”. Wpływa również bardzo niekorzystnie na prawidłową mikroflorę jelitową [35]. W latach 2006–2007 w Szpitalu Uniwersyteckim w Bydgoszczy wyizolowano od trzech pacjentów szczepy VRE odporne na ten lek [36].

6. Drogi powstawania oporności na wankomycynę

Można wyróżnić dwa różne i niezależne od siebie schematy, zgodnie z którymi kształtowała się oporność na wankomycynę wśród bakterii z rodzaju *Enterococcus*. Jeden ze schematów miał miejsce w USA, gdzie wankomycyna była antybiotykiem powszechnie stosowanym w leczeniu zakażeń gronkowcem złocistym opornym na metycylinę (MRSA), jak również w leczeniu poantybiotykowych biegunek wywoływanych przez *Clostridium difficile*. Drugi schemat zaobserwowano w Europie, gdzie na skutek karmienia zwierząt hodowlanych paszą

wzbogaconą glikopeptydem awoparcyną, miał miejsce transfer VRE między zwierzętami a człowiekiem [1]. USA i Kanada były jedynymi większymi krajami, które nie wprowadziły do używania awoparcyny w rolnictwie. Jest to najprawdopodobniej przyczyną faktu, iż do 2008 roku z żadnej z analizowanych prób pochodzących od zwierząt gospodarskich w tych krajach nie wyizolowano szczepu VRE. Natomiast w Europie, w latach 90-tych, w mikroflorze jelitowej zwierząt hodowlanych obecność *Enterococcus* opornych na wankomycynę była powszechna. Stosowanie tego antybiotyku jako stymulatora wzrostu rozpoczęło się w 1975 roku. Najczęściej podawano ją świniom, indykom i cielętom. Skalę zjawiska najlepiej uwidacznia fakt, iż w 1994 roku, w samej tylko Danii, w terapii ludzi zastosowano ok. 24 kg wankomycyny, a w rolnictwie ok 24 000 kg awoparcyny jako stymulatora wzrostu. Pierwszym krajem, który zabronił stosowania wspomnianego antybiotyku była Szwecja. Pociągnęło to za sobą lawinę podobnych decyzji, zakończoną dyrektywą Unii Europejskiej 97/6/WE, zakazującą używania awoparcyny w rolnictwie [14]. Niestety tego typu wypadki nie zakończyły się na incydencie z awoparcyną. Jeszcze w 2000 roku donoszono o powszechnym stosowaniu w rolnictwie w Rosji antybiotyków identycznych z tymi, jakie używa się w terapii klinicznej. W bardzo wielu krajach na świecie antybiotyki są używane w sposób zupełnie niekontrolowany. Najlepszym przykładem są hodowle kreketek w Azji [37]. Na uwagę zasługuje zjawisko zwane „paradoksem szwedzkim”. Przejawia się ono tym, że pomimo bardzo krótkiego (zwłaszcza w porównaniu z innymi krajami europejskimi) czasu stosowania awoparcyny w tym kraju – przez niecałe 10 lat, do roku 1984 – częstość występowania tam VRE była bardzo wysoka. Utrzymywała się równie długo po zakończeniu jej stosowania, mimo że w innych krajach ilość izolowanych VRE spadła [14]. Na obu kontynentach występowały inne rezerwuary VRE. W Stanach Zjednoczonych były to szpitale i nie zaobserwowano tam szczepów poza-szpitalnych, natomiast w Europie rezerwuarem były zwierzęta [1].

7. Fenotypy szczepów opornych na wankomycynę

Wśród opornych na wankomycynę szczepów enterokoków można wyróżnić dziewięć fenotypów. Są to: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM, VanN [1]. Jeden z nich, VanC, jest przykładem naturalnej oporności (gatunkowej). Stanowi cechę charakterystyczną niezbyt groźnych klinicznie gatunków *E. gallinarum* (vanC1), *E. casseliflavus* (vanC2 i vanC4) i *E. flavescens* (vanC3). Na ogół związany jest z konstytutywnym mechanizmem oporności. Bakterie posiadające fenotyp VanC wykazują niski stopień oporności na wankomycynę i równocześnie są wrażliwe na teikoplaninę.

Geny warunkujące ten fenotyp są zlokalizowane DNA chromosomalnym bakterii i nigdy nie ulegają horyzontalnemu transferowi [38–40]. Pozostałe fenotypy są przykładem nabytej oporności na glikopeptydy [1]. Fenotypy VanA, VanB, VanD i VanM charakteryzują się zmodyfikowaną budową prekursora mureiny, w której sekwencja D-Ala-D-Ala w końcowym pentapeptydzie zastąpiona jest depsi-peptydem D-Ala-D-Lac [40]. W pozostałych fenotypach, czyli VanC, VanE, VanG, VanL i VanN, sekwencja końcowa pentapeptydu ma postać: D-Ala-D-Ser [40]. Ze względu na to, że zespoły genów warunkujące fenotypy VanA i VanB są zlokalizowane na ruchomych elementach genomu, takich jak transpozony czy plazmidy, są one najistotniejsze pod względem klinicznym. Najbardziej wyraźna różnica pomiędzy tymi fenotypami polega na tym, że szczepy VanA są odporne zarówno na wankomycynę, jak i na teikoplaninę, a w przypadku VanB tylko na wankomycynę. Wyróżnia się w nim 3 podtypy – VanB1, VanB2 i VanB3 – ze względu na istniejące między nimi różnice genetyczne. Z kolei jedynie kilka szczepów *E. faecalis*, u których udało się opisać fenotypy VanG i VanE, wykazywały pełną wrażliwość na teikoplaninę oraz oporność na wankomycynę jedynie w niskich stężeniach [38]. W większości krajów świata, w tym zwłaszcza Europy, w USA i w Korei Południowej dominuje fenotyp VanA, natomiast VanB jest popularniejszy w Australii i Singapurze [10]. W Polsce nie wykryto obecności fenotypów innych niż VanA, VanB i VanC, a najczęściej izolowane szczepy wykazywały fenotyp VanA [1, 10]. W tabeli I przedstawiono podsumowanie najważniejszych cech różniących poszczególne fenotypy enterokoków opornych na wankomycynę.

8. Charakterystyka molekularna fenotypów szczepów opornych na wankomycynę

Istnieje zespół genów, które warunkują fenotyp VanA. Są wśród nich: *vanY*, *vanZ*, *ORF1*, *ORF2* (dwa ostatnie nie są związane z opornością, ale umożliwiają zajście zjawiska transpozycji) oraz geny tworzące operon *van*: *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanR* i *vanS* [3, 41]. Występują one w transpozonie Tn1546, zlokalizowanym w plazmidach pIP816. Geny związane z fenotypem VanA można też znaleźć na bardzo wielu innych plazmidach, na przykład na pRUM, pS177, pWZ909, pLG1, Inc18, pSL1, pSL2, pIP816 [42–46]. Geny *vanY* i *vanZ* nie są niezbędne do wystąpienia oporności, jednak bądź zwiększają jej poziom (*vanY*), bądź też wpływają na oporność na niskie stężenia teikoplaniny (*vanZ*). Operon *van* z kolei tworzony jest przez geny struktury (*vanH*, *vanA* i *vanX* – nazywane genami białek VanHAX) i geny regulatorowe (*vanR* i *vanS*). Gen *vanA* koduje ligazę D-dipeptydową, która katalizuje

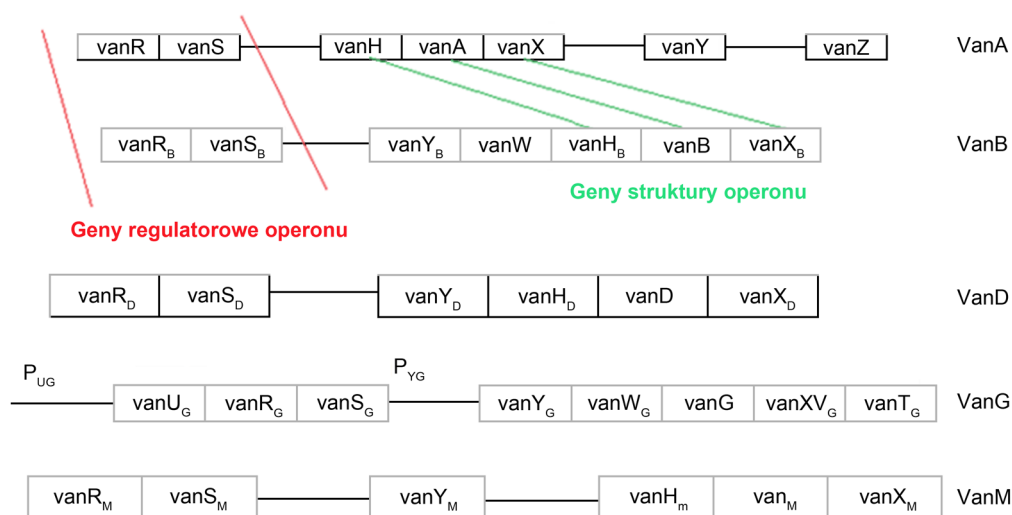
Tabela I
Charakterystyka fenotypów *Enterococcus* opornych na wankomycynę

Fenotyp	Wankomycyna MIC (mg/L)	Teikoplanina MIC (mg/L)	Modyfikacja	Lokalizacja	Zdolność do transferu	Ekspresja	Główne gatunki
VanA	64–1000	16–512	d-Ala-d-Lac	plazmid lub chromosom	tak	indukowana	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>
VanB	4–1000	0,5–1	d-Ala-d-Lac	plazmid lub chromosom	tak	indukowana	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>
VanC	2–32	0,5–1	d-Ala-d-Ser	chromosom	nie	konstytutywna lub indukowana	<i>E. casseliflavus</i> <i>E. casseliflavus</i>
VanD	64–128	4–64	d-Ala-d-Lac	plazmid lub chromosom	nie	konstytutywna lub indukowana	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>
VanE	8–32	0,5	d-Ala-d-Ser	chromosom	nie	indukowana	<i>E. faecalis</i>
VanG	≤ 16	wrażliwy	d-Ala-d-Ser	chromosom	tak	indukowana	<i>E. faecalis</i>
VanL	8	≤ 0,5	d-Ala-d-Ser	chromosom	nie	indukowana	<i>E. faecalis</i>
VanM	> 256	96	d-Ala-d-Lac	plazmid lub chromosom	tak	indukowana	<i>E. faecium</i>
VanN	16	≤ 0,5	d-Ala-d-Ser	plazmid	tak	konstytutywna	<i>E. faecium</i>

tworzenie dipeptydu D-Ala-D-Lac. Zostaje on później wbudowany do prekursorów mureiny w cytoplazmie zamiast D-Ala-D-Ala. Aby to było możliwe, konieczne jest jednak wytworzenie D-mleczanu (D-Lac) – umożliwia to dehydrogenaza D-hydroksykwasów, kodowana przez gen *vanH*. Aby w komórce nie powstawały równoległe do D-Ala-D-Lac ugrupowania D-Ala-D-Ala, konieczna jest hydroliza występującego w nich wiązania amidowego. Reakcję tę katalizuje DD-dipeptydaza kodowana przez gen *vanX* [3, 41, 47]. Geny regulatorowe, obecne w operonie, odpowiadają za inicjację transkrypcji zespołu białek VanHAX, zgodnie z mechanizmem indukowanym. Pojawienie się w środowisku wankomycyny lub teikoplaniny stymuluje autofosforylację kinazy histydynowej (fosforylacja reszty His164), będącej białkiem błony komórkowej, które z kolei jest produktem ekspresji genu *vanS* [48].

Wspomniany enzym, po autofosforylacji, katalizuje fosforylację Asp53 drugiego elementu systemu regulacji, czyli białka VanR. Jest ono obecnym w cytoplazmie czynnikiem transkrypcyjnym, który w formie ufosforylowanej wiąże się z promotorem operonu *van*, aktywując jego transkrypcję [3, 48]. Na ryc. 1 przedstawiono schemat struktury genów tworzących operony VanA, VanB, VanD, VanG i VanM.

U szczepów zaliczanych do fenotypu VanB występuje zespół genów o analogicznych jak w przypadku VanA funkcjach. Dlatego geny struktury operonu zostały opisane jako *vanB* i *vanX_B*, a geny regulatorowe *vanR_B* i *vanS_B*. Występują też geny *vanY_B* i *vanW* – ostatni z wymienionych jako jedyny nie posiada odpowiednika w przypadku fenotypu VanA [47]. Geny warunkujące fenotyp VanB mogą być zlokalizowane w transpozonach Tn1549, Tn1547 i Tn5382 (ten ostatni



Ryc. 1. Schemat struktury zespołu genów warunkujących fenotypy VanA, VanB, VanD, VanG i VanM
Na podstawie [41, 47, 49, 52].

zwiera też gen kodujący enzym zwany Ant(3^{''})-la, warunkujący oporność na aminoglikozydy u enterokoków). Może następować ich przemieszczanie się między chromosomami bakteryjnymi [38].

Fenotypy VanC i VanE są pod względem genetycznym bardzo do siebie podobne. Zawierają operony zbudowane odpowiednio z *vanC* lub *vanE* (kodujące ligazę D-dipeptydową, która tworzy D-Ala-D-Ser) oraz *vanXY* (kodujący D,D-dipeptydazo-D,D-karboksypeptydazę), *vanT* (kodujący racemazę serynową, która pozwala na przekształcenie dostępnej w komórce L-seryny do D-seryny) *vanR* i *vanS* kodujące, odpowiednio, białko regulatorowe operonu i kinazę histydynową. Fenotyp VanD wiąże się ze średnim poziomem oporności na wankomycynę i teikoplaninę. Geny warunkujące ten fenotyp występują w chromosomalnym DNA i jak dotąd nie ma doniesień mówiących, że mogą ulegać transferowi [38]. W operonie tego fenotypu również występują analogiczne do wyżej wymienianych geny: *vanR_D*, *vanS_D*, *vanY_D*, *vanH_D*, *vanD* i *vanX_D*. Potwierdzono, że geny warunkujące fenotyp VanD mogą być zlokalizowane m.in. na transpozonie Tn1546 [49–50].

Pewne różnice występują w operonie fenotypu VanG, gdzie całość struktury poprzedza trójelementowa sekwencja regulatorowa (*vanU*). W dalszej kolejności znajdują się *vanR_G*, *vanS_G* (kodujące białka wspomniane wyżej), *vanY_G* (kodujący D,D-karboksypeptydazę), *vanW* (o nieznannej funkcji), a następnie *vanG*, *vanXY_G* i *vanT_G* [51].

Niedawno opisany dokładniej fenotyp VanL ma bardzo wiele cech wspólnych z fenotypami VanC i VanE, ale jego racemaza serynowa kodowana jest przez dwa geny: *vanTm_L* i *vanTr_L*. Ich podobieństwo z *vanT* w fenotypie VanC wynosi odpowiednio 51 i 49%. Fenotyp

VanN, podobnie jak dwa powyższe, wykazuje podatność na niskie stężenia wankomycyny i wrażliwość na teikoplaninę. Występuje w nim operon zawierający charakterystyczny dla niego gen *vanN* kodujący ligazę oraz geny *vanXY_N*, *vanT_N*, *vanR_N* i *vanS_N* o funkcjach analogicznych, jak w fenotypach VanC i VanE [50]. Szczególnie ciekawy jest fenotyp VanM, odkryty u *E. faecium* w 2010 roku [52]. Charakterystyczne dla tego fenotypu jest występowanie ligazy VanM zbudowanej z 343 aminokwasów i warunkującej oporność na wankomycynę oraz teikoplaninę. Podobieństwo produktu białkowego genu *vanM* do produktów ekspresji genów *vanA*, *vanB*, *vanD* i *vanF* jest na poziomie, kolejno: 79,9; 70,8; 66,3 i 78,8%. W dalszej kolejności operon tworzony jest przez geny *vanR_M*, *vanS_M*, *vanY_M*, *vanH_M*, *vanM* i *vanX_M*. Ogólnie struktura operonu jest najbardziej podobna do tego, który można znaleźć w fenotypie VanD [52].

9. Sytuacja epidemiologiczna na świecie

W 2003 roku badacze z Teksasu pod kierunkiem J.H. Jorgensena podjęli badania nad skutecznością kolejnych, stosowanych w walce z VRE antybiotyków. Zgromadzono 156 izolatów z 7 różnych placówek. Znalazło się wśród nich 126 izolatów *E. faecium* (fenotypy VanA i VanB kolejno w liczbie 109 i 17), 5 izolatów *E. faecalis* (3 vanA i 2 vanV), 2 izolaty *E. avium* (vanA), 1 izolat *E. durans* (vanA), 10 izolatów *E. gallinarum* (vanC1) oraz 12 izolatów *E. casseliflavus* (vanC2) [53]. Wyniki badań zespołu podsumowano w tabeli II.

Jak prezentuje tabela II, spośród przebadanych szczepów VRE o istotnych klinicznie fenotypach, największą prób wykazywało oporność na ampicylinę i doksycylinę,

Tabela II
Oporność izolatów VRE na wybrane antybiotyki, pozyskanych z 7 różnych placówek medycznych

Szczepy enterokoków	Zastosowany lek	MIC (µg/ml)		% izolatów opornych
		50%	90%	
Szczepy VanA i VanB	Daptomycyna	4	8	nie ustalono
	Linezolid	2	2	1,5
	Chinuprystyna-dalfoprystyna	0,5	1	6,0
	Ampicylina	64	128	93,2
	Doksycyklina	4	16	14,2
	Wankomycyna	> 128	> 128	100
Szczepy VanC1 i VanC2	Daptomycyna	1	2	nie ustalono
	Linezolid	2	2	0
	Chinuprystyna-dalfoprystyna	2	2	0
	Ampicylina	0,5	1	0
	Doksycyklina	≤ 0,25	≤ 0,25	4,5
	Wankomycyna	4	4	0

Na podstawie [53].

a najmniej na chinuprystynę/dalfoprystynę i linezolid. Dla tych leków również wielkości zarówno MIC50%, jak i MIC90% były najniższe. Wśród szczepów VRE mniej istotnych klinicznie poziom oporności jest znacznie niższy. Co ciekawe, w toku analizy wpływu daptomycyny na VRE stwierdzono, że występowanie fenotypu VanA lub VanB nie wpływa w istotny sposób na skuteczność działania antybiotyku [53].

Simner i wsp. przeanalizowali 2927 izolatów enterokoków zebranych w Kanadzie na przestrzeni 6 lat, do 2013 r. Tylko 4,2% wykazywało oporność na wankomycynę. Wszystkie przebadane VRE należały do *E. faecium*, a 90% z nich wykazywało fenotyp VanA. W ciągu analizowanego okresu częstość występowania w szpitalach zakażeń VRE uległa potrojeniu [54]. Ogólnie, w Stanach Zjednoczonych poziom oporności na wankomycynę wśród enterokoków jest dużo wyższy (ok. 33% przebadanych izolatów *Enterococcus* nie wykazuje wrażliwości na wankomycynę) niż w Kanadzie (gdzie VRE stanowią poniżej 10%) [55].

Warto też zwrócić uwagę na sytuację epidemiologiczną w innych regionach świata. Zespół D. Ravi przeprowadził analizę izolatów *Enterococcus* pozyskanych ze szpitala w Chennai w Indiach między lutym 2013, a styczniem 2014 roku, od pacjentów z różnych oddziałów i grup wiekowych [56]. Na 200 uwzględnionych prób większość stanowili przedstawiciele *E. faecalis* (55%). W zdecydowanej mniejszości były inne gatunki: *E. faecium*, *E. avium*, *E. hirae*, *E. casseliflavus*, *E. durans* i *E. gallinarum*, stanowiące kolejno 29%; 10,5%; 3%; 1%; 1% i 0,5%. Jedynie 2,5% izolatów wykazywało oporność na wankomycynę. Identyczna ilość wykazywała oporność na teikoplaninę. Co zaskakujące, aż 5% szczepów enterokoków było opornych na linezolid. Zdecydowanie najwięcej z nich było opornych na tetracyklinę i ciprofloksacynę (po 47% szczepów) oraz erytromycynę (73% szczepów) [56].

Japonia jest krajem, w którym VRE stanowią bardzo niewielki odsetek wszystkich enterokoków. Z analizy Suzuki i wsp. wynika, że w szpitalu Uniwersytetu Tokijskiego w ciągu 20 lat do 2010 roku pojawiło się zaledwie dwadzieścia przypadków VRE. Natomiast między rokiem 2011, a 2012 wykryto w tej placówce aż dziewięć izolatów, z czego wszystkie wykazywały fenotyp VanB. W analizowanym materiale odkryto obecność transpozonu Tn5382, zawierającego geny warunkujące ten fenotyp [57].

Interesujące są wyniki analizy zanieczyszczenia wody źródlanej i mineralnej, jaką przeprowadzono między styczniem 2013, a lutym 2014 w Chinach. Przebadano 314 pobranych próbek pochodzących ze 101 fabryk wód butelkowanych z dziesięciu różnych prowincji Państwa Środka. 48 z nich było zanieczyszczonych *E. faecalis*, ale żaden z wykrytych szczepów nie był oporny na wankomycynę, jak również na żaden z pozostałych 11 antybio-

tyków, które wzięto po uwagę. Wykryto natomiast u analizowanych bakterii kilka genów wirulencji: *asa1* (79,3% szczepów; kodujący czynnik umożliwiający doczepianie się do komórek eukariotycznych), *ace* (39,3% szczepów; koduje białko adhezyjne, wiążące kolagen, przez co może ograniczać skuteczność działania układu immunologicznego), czy też *gelE*, który posiadały wszystkie przebadane szczepy [58]. Jak wynika z badań Sun i wsp., na terenie Chin dominującym gatunkiem VRE jest *E. faecium*, a fenotypem VanA. Ze 101 przeanalizowanych próbek, pochodzących z 12 różnych szpitali, *E. faecium* stanowił aż 96, a pozostałe 5 *E. faecalis*. Prawie wszystkie izolaty (z wyjątkiem pojedynczych przypadków) wykazywały fenotyp VanA. Wśród *E. faecium* zdecydowaną większość stanowił kompleks klonalny CC17, z kolei wśród *E. faecalis* był to CC4 [59]. Lai i wsp. wykazali, że istnieje ścisła, pozytywna korelacja między stosowaniem teikoplaniny i tygocykliny, a częstością występowania infekcji VRE związanych z opieką zdrowotną na Tajwanie [60].

Naukowcy z Brazylii przebadali 93 izolaty VRE (*E. faecium*) pochodzące z 13 różnych szpitali. Wszystkie szczepy zidentyfikowano jako posiadające fenotyp VanA, ze względu na wykryty gen *vanA*. Jedynie 6,5% izolatów wykazywało zdolność do tworzenia biofilmu [61]. W innym badaniu prowadzonym w tym samym kraju w Szpitalu Uniwersyteckim Londrina sprawdzano obecność czterech potencjalnych genów zjadliwości, obecnych u izolowanych szczepów VRE. Przebadano 40 izolatów pod kątem występowania genów: *esp* (gen kodujący białko Esp), *gelE*, *efaA* i *cylA*. Wszystkie szczepy wykazywały oporność na wankomycynę i teikoplaninę. U każdego ze szczepów potwierdzono obecność przynajmniej jednego z wymienionych wyżej genów wirulencji. Najczęściej stwierdzano obecność genu *esp* (87,5% szczepów) oraz genu *efaA*, (82,5% szczepów); rzadziej wykrywano gen *gelE* (70% szczepów) i *cylA* (65% szczepów). W 32,5% izolatów stwierdzono obecność wszystkich 4 genów. Ciekawy jest fakt, iż zawsze, gdy w szczepie wykrywano obecność genu *efaA*, posiadał on też gen *esp* [62].

Biorąc pod uwagę udział zwierząt hodowlanych w przenoszeniu lekoopornych szczepów drobnoustrojów, niepokojące doniesienia pochodzą z RPA. W 2014 roku poddano tam analizie 400 prób kału krów pochodzących z dwóch, oddalonych od siebie farm. Na uwagę zasługuje fakt, iż wszystkie zwierzęta miały częsty kontakt z antybiotykami z grupy penicylin (ampicylina, penicylina G), makrolidów (tylozyna: powszechnie stosowany antybiotyk do leczenia m.in. kur i bydła, dostępny również w Polsce), jak również z chinolonami (danofloksacyna, stosowana w rolnictwie do leczenia bydła jako Advocin [63]). W 341 próbkach wykryto szczepy z rodzaju *Enterococcus*. Większość z nich stanowił *E. faecium* (52,94% izolatów) i *E. durans* (23,53%

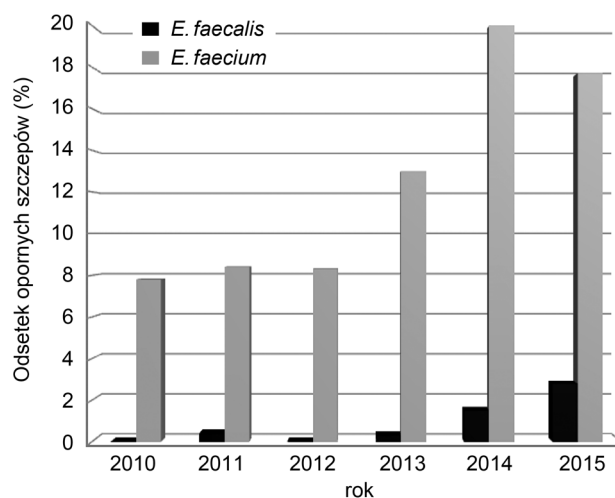
izolatów). Pozostałe gatunki były w zdecydowanej mniejszości. Wszystkie wykryte szczepy enterokoków były odporne na wankomycynę (VRE) i kloksacylinę. Na pozostałe antybiotyki: amikacynę, cefalotynę, streptomycynę, penicylinę G, klindamycynę, neomycynę i erytromycynę odsetek szczepów opornych stanowił, odpowiednio: 74%, 88%, 94%, 91%, 97%, 91% i 99%. Antybiotykami, na które oporność była najmniejsza, były kolejno: ciprofloksacyna (12% szczepów), amoksylicylina/kwas klawulanowy (8% szczepów) i imipenem (0,6% szczepów). Nie stwierdzono szczepu wrażliwego na wszystkie antybiotyki, natomiast dwa spośród wyizolowanych szczepów były odporne na wszystkie 12 przebadanych leków, a kolejne 7 szczepów było wrażliwe na tylko jeden z nich. Analiza molekularna wykazała obecność następujących genów wirulencji: *gelE* (97% szczepów), *asa1* (94,11% szczepów) i *esp* (79,4% szczepów). Równocześnie odkryto, że 65,29% szczepów wykazywało obecność genów *vanC*, a 19,7% szczepów obecność genów *vanB*. Nie wykryto obecności genu *vanA* [64].

Kolejnym regionem objętym badaniami VRE były Karaiby. Akpaka i wsp. zgromadzili 45 próbek VRE ze szpitali na terenie Trynidadu i Tobago. Wszystkie izolaty pochodziły od pacjentów długo hospitalizowanych, z zakażeniami szpitalnymi. 84% szczepów stanowił *E. faecium* zawierający gen *vanA*, a pozostałe 16% to *E. faecalis*, w którego DNA wykryto obecność genu *vanB*. Wszystkie szczepy były wrażliwe na linezolid, ale równocześnie 100% *E. faecalis* było opornych na lewofloksacynę, ciprofloksacynę, erytromycynę i chinuprystynę/dalfoprystynę. Podobnie wszystkie szczepy *E. faecium* były odporne na lewofloksacynę, ciprofloksacynę i erytromycynę, ale aż 82% szczepów tego gatunku było wrażliwych na chinuprystynę/dalfoprystynę. Analizowanymi czynnikami zjadliwości u badanych bakterii były geny: *esp*, wykryty u wszystkich izolatów, który obecny jest często u bakterii izolowanych od zdrowych nosicieli, oraz gen *hyl* kodujący hialuronidazę, którego obecność znacząco zwiększa inwazyjność enterokoków [65].

Natomiast z badań Somily i wsp., badających częstość występowania VRE w Arabii Saudyjskiej, wynika, że spośród 378 izolatów enterokoków, tylko 17 wykazywało oporność na wankomycynę. 76% z nich wykazywało przynależność do gatunku *E. faecium*, a pozostałe 24% do *E. gallinarum*. Fenotyp VanA wykazywały wszystkie VRE z gatunku *E. gallinarum* oraz większość z *E. faecium* [66].

10. Sytuacja epidemiologiczna w Polsce

Jak widać na wykresie przedstawionym na ryc. 2 w Polsce na przestrzeni lat 2010–2015 występuje niepokojąca tendencja wzrostu zarówno ilości szczepów *E. faecium* i *E. faecalis* opornych na wankomycynę, izo-



Ryc. 2. Oporność na wankomycynę w Polsce. Oporność wśród szczepów *E. faecium* i *E. faecalis* izolowanych z krwi pacjentów na przestrzeni lat 2010–2015 [67].

lowanych z krwi pacjentów (dane pochodzą z doniesień KORLD [67]). Zdecydowanie większy jest odsetek opornych szczepów *E. faecium* (w 2014 roku stanowiły prawie 20% wszystkich izolatów tego gatunku) niż wankomycynoopornych *E. faecalis*, których największy odsetek miał miejsce w 2015 roku (2,8%) [67]. Podsumowując powyższe dane można wysnuć wniosek, iż pomimo dużo rzadszego występowania *E. faecium* w populacji w porównaniu z *E. faecalis*, to właśnie *E. faecium* stanowi kluczowy problem, ze względu na często występujące jego szczepy odporne na wankomycynę [1, 67].

W badaniu Talaga i wsp. uwzględniono 154 próbki enterokoków z 4 różnych szpitali z Małopolski, zebrane na przestrzeni jednego roku. Z badań zespołu wynika, że *Enterococcus* odporne na wankomycynę mają niewielki udział w całkowitej puli przebadanych bakterii. Wszystkie *E. faecalis* wykazywały wrażliwość na analizowane antybiotyki, w tym wankomycynę. Ustalono, że pomimo utrzymywania się ogólnej tendencji dominacji fenotypu VanA, w Małopolsce *E. faecium* o fenotypie VanB ma większy udział procentowy w populacji VRE niż *E. faecium* o fenotypie VanA. Wszystkie izolaty *E. faecium*, w tym VRE, były wrażliwe na chinuprystynę/dalfoprystynę [68].

Po raz pierwszy w Polsce szczepy VRE pojawiły się w 1999 roku w Gdańsku. Był to *E. faecium* o fenotypie VanA. W tym samym roku po raz pierwszy pojawił się też izolat VRE o fenotypie VanB (w Warszawie). Od tego czasu co roku notowane są pojedyncze przypadki lokalnych ognisk epidemicznych. Wśród wszystkich czynników alarmowych, jakie są zgłaszane w polskich szpitalach, odsetek VRE jest stosunkowo niewielki – na przestrzeni 2012–2014 oscylował w okolicach 1–2% [1]. Mimo, że na terenie Polski występują VRE zarówno o fenotypie VanA, jak i VanB, to zdecydowanie częściej spotyka się przypadki VanA [1, 7, 66, 67].

Tabela III
Zestawienie ilości izolatów VRE i odsetka wszystkich czynników alarmowych na przestrzeni lat 2012–2016

Rok	Ilość izolatów	Odsetek wszystkich czynników alarmowych
2016	50	1,14%
2015	34	0,81%
2014	b.d.	b.d.
2013	18	0,44%
2012	11	0,33%

Dane ze 195 szpitali w Polsce, na podstawie [71].

Badania z tego zakresu prowadziły m.in. zespoły Grzybowski i wsp., z Instytutu Transplantologii [69], oraz Talaga-Ćwiertnia i wsp. [70]. Jak prezentuje tabela III, przypadków VRE jest stosunkowo niewiele w porównaniu z innymi czynnikami alarmowymi. Ich liczba w kolejnych latach sukcesywnie wzrasta. Równocześnie w 2014 r. zanotowano, iż za zakażenia miejsc operowanych w szpitalach tylko w 4,5% odpowiadały trzy grupy czynników alarmowych: MRSA, VRE i ESBP [71].

Mimo dominacji bakterii fenotypu VanA, dużym zagrożeniem mogą się stać patogeny o fenotypie VanB. Sadowy i wsp. przeanalizowali 278 izolatów VRE o fenotypie VanB, zebranych na przestrzeni 11 lat (1999–2010) w 22 polskich miastach. Stwierdzono, że geny warunkujące ten fenotyp są najczęściej zlokalizowane w transpozonie Tn1549 – w obrębie chromosomu bakteryjnego (81,65%) lub w plazmidzie (18%). Tylko w jednym przypadku zaobserwowano, że plazmid zawierający Tn1549 został zintegrowany z chromosomem bakteryjnym. Do roku 2006 geny warunkujące fenotyp VanB lokalizowano w plazmidach, a w kolejnych latach znajdowano je głównie w chromosomie bakteryjnym [72]. Interesujące badania przeprowadzono na próbach zaklasyfikowanych jako VRE, pozyskanych od pacjentów Szpitala Uniwersyteckiego w Bydgoszczy w latach 2005–2009. Kozusko i wsp. przeanalizowali skład gatunkowy VRE i skuteczność różnych antybiotyków w ich zwalczaniu. Ustalono, że na 159 szczepów opornych na wankomycynę, aż 133 stanowił *E. faecium*, a jedynie 26 *E. faecalis*. W każdym kolejnym roku liczba takich izolatów była większa. Żaden z izolatów nie wykazał oporności na linezolid, a tylko bardzo niewielka ich liczba na chloramfenikol (3) i chinuprystynę/dalfoprystynę (1). Niemal wszystkie szczepy wykazywały oporność na ryfampicynę i ciprofloksacynę, a poziom oporności na gentamycynę, ampicylinę i penicylinę był również bardzo wysoki (w żadnym z przypadków nie był niższy niż 74%). Liczba szczepów opornych na streptomycynę w kolejnych latach malała, sięgając w 2009 poziomu 25,8%, a na tetracykliny oscylowała między 20–30%. W kolejnych latach silnie wzrastał poziom oporności na teikoplaninę (o 20% na przestrzeni 4 lat), co świad-

czy o stałym zwiększaniu się udziału w populacji VRE szczepów o fenotypie VanA [36].

Istotnych danych na temat genetycznych cech VRE *E. faecalis* dostarcza praca zespołu Łysakowskiej [7]. Autorzy badali występowanie genów zjadliwości wśród 161 szczepów z oddziałów zabiegowych dwóch szpitali w Łodzi w latach 2005–2006. Przynależność szczepów do analizowanego gatunku potwierdzano, wykrywając w reakcji PCR gen ligazy D-alaninowo-D-alaninowej. Poszukiwanymi genami zjadliwości były: *agg*, *cyl-L* i *cyl-S*, *esp*, *gelE* i gen *sprE*. Tylko 3 szczepy nie wykazywały obecności analizowanych genów zjadliwości. Gen *cyl-L* zidentyfikowano u 52,2% szczepów, gen *agg* u 62,73%, a gen *esp* u 71,2% szczepów *E. faecalis*. Ponad 80% szczepów posiadało geny *gelE* i *sprE* (odpowiednio 85,1% i 82,6%). Były to geny z badanej puli obecne najczęściej w analizowanych szczepach. Niezwykle istotny jest fakt, iż szczepy, które były odporne na działanie ampicyliny (tylko 6,8%), miały jednocześnie m.in. trzy geny zjadliwości. Aż 99 szczepów (czyli 61,49%) posiadało cztery lub więcej genów zjadliwości [7].

Celem badań przeprowadzonych przez Młynarczyk i wsp. było zbadanie poziomu podobieństwa genetycznego 20 szczepów VRE wyizolowanych w latach 2005–2008 z próbek pacjentów z trzech oddziałów Szpitala Dzieciątka Jezus w Warszawie. Fenotyp badanych szczepów VRE *E. faecium* określono za pomocą reakcji PCR, w której użyto starterów komplementarnych do DNA genów kodujących ligazę D-dipeptydową: *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE* i *vanG*. Ich obecność potwierdza występowanie odpowiedniego fenotypu (VanA, VanB, VanD, VanE i VanG). Zaobserwowano, że wszystkie izolaty *E. faecium* posiadały gen ligazy *vanA*, a żaden nie posiadał innych, poszukiwanych genów. Potwierdziło to, że wszystkie szczepy VRE wykazywały fenotyp VanA. Analizowane szczepy wykazywały wysoką różnorodność na poziomie genomu. 12 z nich pochodziło od pacjentów leczonych na tym samym Oddziale Intensywnej Terapii [40]. W tym samym szpitalu przeanalizowano liczbę zakażeń VRE w latach 1998–2005, czyli na samym początku historii obecności VRE w Polsce. Na przestrzeni tych lat stale wzrastała liczba zakażeń bakteriami z rodzaju *Enterococcus* (z 293 izolatów w 1998 do 1185 izolatów w 2005), ale przypadki VRE zaczęły się pojawiać od 2003, gdy uzyskano 11 izolatów, w kolejnym roku 13, a w 2005 aż 64 izolaty. Oznacza to stale utrzymującą się tendencję wzrostową [40, 73].

Przebadano także 195 izolatów bakterii z rodzaju *Enterococcus*, pochodzących z przemysłowych hodowli świń, na terenie województwa Kujawsko-Pomorskiego. Skowron i wsp. ustalili, że dominującym gatunkiem był *E. hirae* (68%), natomiast pozostałe gatunki miały zdecydowanie mniejszy udział w populacji (*E. faecalis* 21%, *E. faecium* 3%). Tylko 2 izolaty wykazywały oporność na wankomycynę, posiadając fenotyp VanC [74].

11. Sytuacja epidemiologiczna w Europie

Z badań Orsi i wsp. wynika, że różnorodność częstości występowania VRE w Europie jest bardzo wysoka. Zdecydowanie częściej VRE pojawiają się na południu Europy, niż na północy [75]. Schouten i wsp. przeprowadzili analizę przypadków VRE w Europie. Dzięki współpracy 49 laboratoriów z 27 krajów europejskich udało się zebrać 4208 izolatów *Enterococcus* z prób klinicznych. Ustalono, że wśród nich znalazło się 18 przypadków VRE posiadających fenotyp VanA i 5 o fenotypie VanB. Z kolei izolatów cechujących się fenotypem VanC było 71. Fenotyp VanA najczęściej występował w próbach z Wielkiej Brytanii (2,7%), a VanB w izolatach ze Słowenii (2%). Fenotyp VanC był najpopularniejszy w izolatach z Łotwy (14,3%) i Turcji (11,7%). Wśród tych prób *E. gallinarum* dominował nad *E. casseliflavus*. Na podstawie tych danych można wysnuć wnioski, że w Europie częstość występowania VRE posiadających najgroźniejsze fenotypy jest stosunkowo niska [76]. Analizując poziom zagrożenia antybiotykoopornymi szczepami bakterii na Starym Kontynencie warto zwrócić uwagę na raporty sieci EARS-Net. Z jej danych wynika, że we wszystkich krajach, poza Grecją, zakażenia VRE *E. faecalis* nie są istotnym klinicznie problemem, w przeciwieństwie do VRE *E. faecium*. Do 2009 roku Polska na tle innych krajów Europy wyglądała bardzo korzystnie, gdyż infekcje o etiologii VRE *E. faecium* stanowiły nie więcej niż 5% wszystkich wywołanych tą bakterią. Niestety w 2012 roku Polska została zaliczona do grupy, gdzie wielkość ta mieści się między 5 a 10%, a w 2015 była już w grupie, w której parametr ten sięga od 10 do 25% [1, 77] (Tab. IV).

Przyczyną tych zatrważających zmian może być fakt, iż Polska graniczy bezpośrednio z państwami,

w których wspomniany wyżej wskaźnik dużo wcześniej był wysoki (Czechy, Niemcy, Litwa). Nie bez znaczenia jest również jego poziom w krajach, które Polacy uważają za interesujące kurorty wakacyjne (Grecja, Włochy), albo są miejscem ich emigracji zarobkowej (Irlandia, Wielka Brytania) [77]. Jedną z przyczyn zaobserwowanego rozmieszczenia zakażeń VRE w Europie mogą być różne wytyczne dotyczące stosowania antybiotyków, czy też kampanie informacyjne oraz poziom edukacji społeczeństwa. Wektorem dla enterokoków mogą być też zwierzęta, np. psy. Kubašová i wsp. przeanalizowali 160 prób enterokoków pochodzących od 105 zwierząt we wschodniej Słowacji. *E. faecium* stanowił 57,5%, *E. faecalis* 21,9%, *E. hirae* 17,5%, a pozostałe gatunki były bardzo nieliczne. Aż 71,9% szczepów wykazywało oporność na teikoplaninę. Najbardziej jednak zastanawiający jest fakt, iż 9 szczepów *E. faecium* posiadało marker specyficzny dla zakażeń szpitalnych [78].

Z analizy Remschmidt i wsp. wynika, że na terenie Niemiec zagrożenie ze strony VRE stale wzrasta. Procentowy udział VRE wśród enterokoków jest bardzo zróżnicowany między poszczególnymi krajami związkowymi: najwyższy jest w środkowych Niemczech (Berlin, Nadrenia Północna-Westfalia, Hesja, Saarland, Saksonia-Anhalt, Saksonia i Turyngia), gdzie VRE stanowią powyżej 10% wszystkich enterokoków, a najniższy na północy. Tendencja ta nie uległa zmianie w latach 2007–2016. Zarejestrowano 12659 izolatów enterokoków pochodzących z próbek szpitalnych, a 833 z nich wykazywało oporność na wankomycynę [79]. Z kolei Gastmeier i wsp. wykazali, że w Niemczech w latach 2007–2012 odsetek zakażeń VRE wzrósł z 0,87% do 4,58% w przypadku ran pooperacyjnych oraz z 4,91% do 12,99% w przypadku zakażeń krwi [80].

Tabela IV

Zestawienie odsetka izolatów *Enterococcus faecium* opornych na wankomycynę z krajami, w których był zanotowany w latach 2012 i 2015

Odsetek izolatów <i>Enterococcus faecium</i> opornych na wankomycynę	2012	2015
poniżej 1%	Islandia, Norwegia, Szwecja, Finlandia, Estonia, Francja, Holandia, Słowenia, Chorwacja, Bułgaria	Islandia, Norwegia, Szwecja, Finlandia, Estonia, Francja, Belgia
od 1% do 5%	Hiszpania, Belgia, Dania, Austria, Słowacja, Węgry, Rumunia	Hiszpania, Dania, Holandia, Austria, Słowenia
od 5% do 10%	Łotwa, Litwa, Polska, Włochy	Czechy
od 10% do 25%	Wielka Brytania, Portugalia, Niemcy, Czechy, Grecja, Cypr	Portugalia, Wielka Brytania, Niemcy, Polska, Litwa, Łotwa, Słowacja, Węgry, Włochy, Bułgaria, Grecja
od 25% do 50%	Irlandia	Irlandia, Chorwacja, Rumunia, Cypr
powyżej 50%	brak	brak

Dane na podstawie [77].

Ciekawą analizę szczepów VRE z gatunku *E. faecium* przeprowadzili badacze z Turcji. Przebadano 55 izolatów, zawierających bakterie odporne na wankomycynę. Wszystkie szczepy były odporne na penicylinę G, ampicylinę i gentamycynę. Równocześnie były wrażliwe na linezolid i chinuprystynę/dalfoprystynę. 22 izolaty, które pozyskano od pacjentów wykazujących objawy zakażenia, uznano za inwazyjne, a pozostałe 33, które pochodziły ze skolonizowanej odbytnicy pacjentów bez objawów zakażenia bakteryjnego, uznano za nieinwazyjne. U wszystkich szczepów wykazano obecność genu *vanA*. W 14 izolatach nie wykryto genów wirulencji. Jeden taki gen, *esp*, obecny był w 39 izolatach, dwa geny w jednym izolacie (*esp* i *ebpA*; drugi z nich koduje podjednostkę A pilusa związanego z tworzeniem biofilmu przy zapaleniu wsierdza [81]) – podobnie jak 5 dodatkowych genów: *esp*; *ebpA*; *asa1*; *gelE* i *cpd*. Dostrzegalna była tendencja, iż wśród szczepów uznanych za inwazyjne, częstość występowania genów wirulencji była niewielka [82].

Pinholt i wsp. przeanalizowali 495 próbek VRE *E. faecium* kilku szpitali w Danii na przestrzeni lat 2012–2014. Ustalono, że na początku badania większość populacji VRE stanowiły cztery liczne grupy bakterii o bliskim pokrewieństwie filogenetycznym w obrębie grup. W miarę upływu czasu następował stały wzrost różnicowania mikroorganizmów, tworzyły się nowe, mniej liczne grupy. Niektóre z nich wywoływały epidemię i zanikały, inne przez cały czas trwania badania były obecne w kilku różnych lokalizacjach [83].

12. Podsumowanie

Oporność na antybiotyki wśród bakterii będących przedstawicielami rodzaju *Enterococcus* staje się coraz bardziej istotnym problemem dla współczesnej służby zdrowia. Lata zaniedbań związanych z lekkomyślnym stosowaniem antybiotyków sprawiły, że coraz częściej pojawiają się szczepy odporne nie tylko na standardowe środki farmakologiczne, przeznaczone do ich zwalczania, ale i na leki „ostatniej szansy”. Poznanie molekularnych uwarunkowań mechanizmów oporności może być jednym ze sposobów zmniejszenia zagrożenia ze strony antybiotykoopornych enterokoków.

„Praca finansowana ze środków Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach (KNW-1-182/N/8/B)”.

Piśmiennictwo

1. Talaga K., Bulanda M.: Czy enterokoki odporne na wankomycynę stanowią problem w polskich szpitalach? *Przegl. Epidemiol.* **69**, 861–864 (2015)
2. Mutters N.T., Mersch-Sundermann V., Mutters R., Brandt C., Schneider-Brachert W., Frank U.: Control of the spread of vancomycin-resistant enterococci in hospitals: epidemiology and clinical relevance. *Dtsch. Arztebl. Int.* **110**, 725–731 (2013)
3. Cetinkaya Y., Falk P., Mayhall C.G.: Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 686–707 (2000)
4. Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A.: Mikrobiologia. Elsevier Urban & Partner, Wrocław, 2011, s. 237–240.
5. Surface protein ESP [*Enterococcus faecium*], https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_016252734.1 (29.12.2017)
6. Surface protein ESP [*Enterococcus raffinosus*], https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_016250137.1 (29.12.2017)
7. Łysakowska M.E., Śmigieński J., Denys A.: Występowanie genów zjadliwości wśród szczepów *Enterococcus faecalis* izolowanych od pacjentów i ze środowiska szpitalnego. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **61**, 125–132 (2009)
8. Comerlato C.B., de Resende M.C.C., Caierão J., d' Azevedo P.A.: Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, **108**, 590–595 (2013)
9. Kayaoglu G., Ørstavik D.: Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **15**, 308–320 (2004)
10. Szczypta A., Talaga K., Bulanda M.: Enterokoki odporne na wankomycynę jako czynniki etiologiczne zakażeń związanych z opieką zdrowotną – chorobotwórczość i metody kontroli. *Hygeia Public Health*, **51**, 134–140 (2016)
11. Freitas A.R., Peixe L. i wsp.: Human and swine hosts share vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* CC17 and CC5 and *Enterococcus faecalis* CC2 clonal clusters harboring Tn1546 on indistinguishable plasmids. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 925–931 (2011)
12. Szczypa K., Wilemska J., Hryniewicz W., Sitkiewicz I.: Epidemiologia zakażeń *Streptococcus pyogenes*, struktura klonalna populacji, antybiotykooporność. *Post. Mikrobiol.* **52**, 223–232 (2013)
13. Homan W.L., Tribe D., Poznanski S., Li M., Hogg G., Spalburg E., van Embden J.D., Willems R.J.: Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 1963–1971 (2002)
14. Nilsson O.: Vancomycin resistant enterococci in farm animals – occurrence and importance. *Infect. Ecol. Epidemiol.* DOI: 10.3402/iee.v2i0.16959 (2012)
15. Top J., Willems R., van der Velden S., Asbroek M., Bonten M.: Emergence of clonal complex 17 *Enterococcus faecium* in the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 214–219 (2008)
16. Top J., Willems R., Blok H., de Regt M., Jalink K., Troelstra A., Goorhuis B., Bonten M.: Ecological replacement of *Enterococcus faecalis* by multiresistant clonal complex 17 *Enterococcus faecium*. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 316–319 (2007)
17. Kawalec M., Pietras Z., Daniłowicz E., Jakubczak A., Gniadkowski M., Hryniewicz W., Willems R.J.: Clonal structure of *Enterococcus faecalis* isolated from Polish hospitals: characterization of epidemic clones. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 147–153 (2007)
18. Miller W.R., Munita J.M., Arias C.A.: Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **12**, 1221–1236 (2014)
19. O'Driscoll T., Crank C.W.: Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infect. Drug Resist.* **8**, 217–230 (2015)
20. Horodniceanu T., Bougueleret L., El-Solh N., Bieth G., Delbos F.: High-level, plasmid-borne resistance to gentamicin in *Streptococcus faecalis* subsp. *zymogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **16**, 686–689 (1979)
21. Mederski-Samoraj B.D., Murray B.E.: High-level resistance to gentamicin in clinical isolates of enterococci. *J. Infect. Dis.* **147**, 751–757 (1983)

22. Uttley A.H., Collins C.H., Naidoo J., George R.C.: Vancomycin-resistant Enterococci. *Lancet*, **332**, 57–58 (1988)
23. Żabicka D., Literacka E., Bojarska K.: MDR, XDR, PDR – jednolite, międzynarodowe definicje nabytej oporności drobnoustrojów na antybiotyki. Aktualności Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków, 3 (2012), http://www.antybiotyki.edu.pl/pdf/biuletyn/biuletyn_npoa_3-2012.pdf (29.12.2017)
24. Tomczak S., Dettlaff K., Jelińska A.: Linezolid i jego analogi – perspektywy i ograniczenia terapii. *Farm. Współcz.* **8**, 227–234 (2015)
25. Gonzales R.D., DaPaul M., Schreckenberger C., Graham M.B., Swathi-Kelkar D., Besten K.D., Quinn J.P.: Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. *Lancet*, **357**, 1179 (2001)
26. Auckland C., Teare L., Cooke F., Kaufmann M.E., Warner M., Jones G., Bamford K., Ayles H., Johnson A.P.: Linezolid-resistant Enterococci: report of the first isolates in the United Kingdom. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, 743–746 (2002)
27. Herrero I.A., Inmaculada A., Issa N.C., Patel R.: Nosocomial spread of linezolid-resistant, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *New Engl. J. Med.* **346**, 867–869 (2002)
28. Leavis H.L., Willems R.J., Top J., Bonten M.J.: High-level ciprofloxacin resistance from point mutations in *gyrA* and *parC* confined to global hospital-adapted clonal lineage CC17 of *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 1059–1064 (2006)
29. Lewis J.S., Owens A., Cadena J., Sabol K., Patterson J.E., Jorgensen J.H.: Emergence of daptomycin resistance in *Enterococcus faecium* during daptomycin therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 1664–1665 (2005)
30. Montero C.I., Stock F., Murray P.R.: Mechanisms of resistance to daptomycin in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 1167–1170 (2008)
31. Guido W., Gfrörer S., Fleige C., Witte W., Klare I.: Tigecycline-resistant *Enterococcus faecalis* strain isolated from a German intensive care unit patient. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, 1182–1183 (2008)
32. Cordina C., Hill R., Deshpande A., Hood J., Inkster T.: Tigecycline-resistant *Enterococcus faecalis* associated with omeprazole use in a surgical patient. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 1806–1807 (2012)
33. Żabicka D., Stefaniuk E., Hryniewicz W.: Tigecyklina – aktywność wobec *Acinetobacter* spp. http://www.korld.edu.pl/pdf/TIGECYKLINA_opracowanie_wer_ost.pdf (29.12.2017)
34. Ricaurte J.C., Boucher H.W., Turett G.S., Moellering R.C., Labombardi V.J., Kislak J.W.: Chloramphenicol treatment for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**, 17–21 (2001)
35. Eliakim-Raz N., Lador A., Leibovici-Weissman Y., Elbaz M., Paul M., Leibovici L.: Efficacy and safety of chloramphenicol: joining the revival of old antibiotics? Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Antimicrob. Chemother.* **70**, 979–996 (2015)
36. Kożuszek S., Bogiel T., Gospodarek E.: *Enterococcus* sp. odporne na wankomycynę. *Dośw. Mikrobiol.* **61**, 351–357 (2009)
37. Holmström K., Gräslund S., Wahlström A., Pongshompoo S., Bengtsson B., Kautsky N.: Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental and human health. *Int. J. Food Sci. Technol.* **38**, 255–266 (2003).
38. Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A., Łaniewska-Trokenheim Ł.: Oporność na antybiotyki bakterii z rodzaju *Enterococcus* występujących w żywności. *Kosmos*, **66**, 67–79 (2017)
39. Kuch A., Żabicka D., Hryniewicz W.: Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki 2009. Oznaczanie wrażliwości *Enterococcus* spp. Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów. <http://www.korld.edu.pl/pdf/04-Rek2009-Enterokoki.pdf> (29.12.2017)
40. Młynarczyk A., Grzybowska W., Mrówka A., Tyski S., Młynarczyk G.: Genetyczne podobieństwo opornych na wankomycynę szczepów *Enterococcus faecium* izolowanych z materiału klinicznego. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **62**, 297–302 (2010)
41. Lebreton F., Depardieu F., Bourdon N., Fines-Guyon M., Berger P., Camiade S., Leclercq R., Courvalin P., Cattoir V.: d-Ala-d-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 4606–4612 (2011)
42. Zhu W., Murray P.R., Huskins W.C., Jernigan J.A., McDonald L.C., Clark N.C., Anderson K.F., McDougal L.K., Hageman J.C., Olsen-Rasmussen M., Frace M., Alangaden G.J., Chenoweth C., Zervos M.J., Robinson-Dunn B., Schreckenberger P.C., Reller L.B., Rudrik J.T., Patell J.B.: Dissemination of an *Enterococcus* Inc18-Like vanA Plasmid Associated with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 4314–4320 (2010)
43. Wardal E., Markowska K., Żabicka D., Wróblewska M., Giemza M., Mik E., Połowniak-Pracka H., Woźniak A., Hryniewicz W., Sadowy E.: Molecular Analysis of VanA Outbreak of *Enterococcus faecium* in Two Warsaw Hospitals: The Importance of Mobile Genetic Elements. *Biomed Res Int.* 2014: 575367 (2014)
44. Freitas A.R., Novais C., Tedim A.P., Francia M.V., Baquero F., Peixe L., Coque T.M.: Microevolutionary Events Involving Narrow Host Plasmids Influences Local Fixation of Vancomycin-Resistance in *Enterococcus* Populations. *PLoS One*. **8**, e60589 (2013)
45. Lim S.K., Tanimoto K., Tomita H., Ike Y.: Pheromone-responsive conjugative vancomycin resistance plasmids in *Enterococcus faecalis* isolates from humans and chicken feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 6544–53 (2006)
46. Kelli L. Palmer K.L., Veronica N. Kos V.N., Gilmore M.S.: Horizontal Gene Transfer and the Genomics of Enterococcal Antibiotic Resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 632–639 (2010)
47. Faron M.L., Ledebor N.A., Buchana B.W.: Resistance mechanisms, epidemiology, and approaches to screening for vancomycin-resistant *Enterococcus* in the health care setting. *J. Clin. Microbiol.* **54**, 2436–2447 (2016)
48. Hasman H., Aarestrup F.M., Dalsgaard A., Guardabassi L.: Heterologous expression of glycopeptide resistance vanHAX gene cluster from soil bacteria in *Enterococcus faecalis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 648–653 (2006)
49. Depardieu F., Reynolds P.E., Courvalin P.: VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* 10/96A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 7–18 (2003)
50. Lebel S., Bouttier S., Lambert T.: The *cme* gene of *Clostridium difficile* confers multidrug resistance in *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **238**, 93–100 (2004)
51. Boyd D.A., Willey B.M., Fawcett D., Gillani N., Mulvey M.R.: Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel d-Ala-d-Ser gene cluster, vanL. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 2667–2672 (2008)
52. Xu X., Wang M. i wsp.: vanM, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 4643–4647 (2010)
53. Jorgensen J.H., Crawford S.A., Kelly C.C., Patterson J.E.: In vitro activity of daptomycin against vancomycin-resistant enterococci of various Van types and comparison of susceptibility testing methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 3760–3763 (2003)
54. Simmer P.J., Zhanel G.G. i wsp.: Epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in Canadian hospitals (CANWARD study, 2007 to 2013). *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 4315–4317 (2015)

55. Zhanel G.G., Hoban D.J. i wsp.: Antimicrobial-resistant pathogens in intensive care units in Canada: results of the Canadian National Intensive Care Unit (CAN-ICU) study, 2005–2006. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 1430–1437 (2008)
56. Ravi D., Rompicherla V., Govindan G., Shanmugam P.: Speciation of enterococcal isolates in a tertiary care hospital and molecular characterisation of vancomycin resistant enterococci (VRE). *Ind. J. Microbiol. Res.* **3**, 77–81 (2016)
57. Suzuki M., Koyano S., Okugawa S., Okazaki M., Seki G., Moriya K.: Diversity of vancomycin-resistant enterococci in a low endemicity area. *J. Glob. Antimicrob. Res.* **2**, 115–118 (2014)
58. Wei L., Wu Q., Jumei Z., Weipeng G., Moutong C., Liang X., Juan W., Lianying M.: Prevalence and genetic diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from mineral water and spring water in China. *Front. Microbiol.* DOI: 10.3389/fmicb.2017.01109 (2017)
59. Sun H., Wang H., Xu Y., Jones R.N., Costello A.J., Liu Y., Li G., Chen M., Mendes R.E.: Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. clinical isolates recovered from hospitalized patients among several medical institutions in China. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **74**, 399–403 (2012)
60. Lai Ch.Ch., Chub Ch-Ch., Chengc A., Huang Y.T., Hsueh P.R.: Correlation between antimicrobial consumption and incidence of health-care-associated infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci at a university hospital in Taiwan from 2000 to 2010. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **48**, 431–436 (2015)
61. Alves G.D.S., Pereira M.F., Bride L.L., Nunes A.P.F., Schuenck R.P.: Clonal dissemination of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* ST412 in a Brazilian region. *Braz. J. Infect. Dis.* DOI: 10.1016/j.bjid.2017.07.001 (2017)
62. Ruzon F.I., de Paula S.B., Kanoshiki R.L., Pereira-Santos J., Kerbauy G., Kobayashi R.K., Yamada-Ogatta S.F.: Virulence determinants in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* vanA isolated from different sources at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil. *J. Microbiol.* **48**, 814–821 (2010)
63. Charakterystyka produktu leczniczego weterynaryjnego (Advocin 180), http://www.zoetis.com.pl/global-assets/private/zoetis_com_pl_advocin_180_2013_06.pdf (29.12.2017)
64. Iweriebor B.C., Obi L.C., Okoh A.I.: Macrolide, glycopeptide resistance and virulence genes in *Enterococcus* species isolates from dairy cattle. *J. Med. Microbiol.* **65**, 641–648 (2016)
65. Akpaka P.E., Kisson S., Jayaratne P.: Molecular analysis of vancomycin-resistant enterococci isolated from regional hospitals in Trinidad and Tobago. *Adv. Med.* DOI: 10.1155/2016/8762691 (2016)
66. Somily A.M., Al-Mohizea M.M., Absar M.M., Fatani A.J., Ridha A.M., Al-Ahdal M.N., Senok A.C., Al-Qahtani A.A.: Molecular epidemiology of vancomycin resistant enterococci in a tertiary care hospital in Saudi Arabia. *Microb. Pathog.* **97**, 79–83 (2016)
67. Żabicka D.: Monitorowanie oporności w Polsce – dane sieci EARS-Net. http://www.korid.edu.pl/pdf/Monitorowanie_dane_2016_strona_KORLD.pdf (29.12.2017)
68. Talaga K., Odrowąż-Konduracka D., Paradowska B., Jagiencarz-Starzec B., Wolak Z., Bulanda M., Szczypta A.: Typing of *Enterococcus* spp. strains in 4 hospitals in the Małopolska region in Poland. *Adv. Clin. Exp. Med.* **27**, 111–117 (2018)
69. Grzybowska W., Młynarczyk G. i wsp.: Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* among patients of transplantology wards. *Transplant. Proceed.* **41**, 3256–3257 (2009)
70. Talaga-Ćwiertnia K., Bulanda M.: Analiza sytuacji epidemiologicznej zakażeń wankomycynoopornymi *Enterococcus faecium* na świecie, z uwzględnieniem obecnej sytuacji w Polsce *Przegl. Epidemiol.* **72**, 3–15 (2018)
71. Kucharska I., Rychlewska A.: Szpitalne ogniska epidemiczne w Polsce w 2014 roku. Warszawa 21 września 2015 r., <http://www.antybiotyki.edu.pl/pdf/ogniskaepid3.pdf> (29.12.2017)
72. Sadowy E., Gawryszewska I., Kuch A., Żabicka D., Hryniewicz W.: The changing epidemiology of VanB *Enterococcus faecium* in Poland. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **37**, 927–936 (2018)
73. Młynarczyk G., Młynarczyk A., Brzuszkiewicz E., Łuczak M.: Oporność na antybiotyki glikopeptydowe szczepów z rodzaju *Enterococcus* izolowanych w latach 1997–2000 w szpitalu klinicznym w Warszawie. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **53**, 321–330 (2001)
74. Skowron K., Jeleńska A., Paluszak Z., Szala B.: Prevalence and distribution of VRE (vancomycin resistant enterococci) and VSE (vancomycin susceptible enterococci) strains in the breeding environment *Ann. Agric. Environ. Med.* **23**, 231–236 (2016)
75. Orsi G.B., Ciorba V.: Vancomycin resistant enterococci health-care associated infections. *Ann. Ig.* **25**, 485–492 (2013)
76. Schouten M.A., Hoogkamp-Korstanje J.A., Meis J.F., Voss A., European VRE Study Group: Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**, 816–822 (2000)
77. Summary of the latest data on antibiotic resistance in the European Union, EARS-Net surveillance data, November 2016, https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/antibiotics-EARS-Net-summary-2016_0.pdf (29.12.2017)
78. Kubašová I., Strompfová V., Lauková A.: Safety assessment of commensal enterococci from dogs. *Folia Microbiol. (Praha)*, DOI: 10.1007/s12223-017-0521-z (2017).
79. Remschmidt C., Schröder C., Behnke M., Gastmeier P., Geffers C., Kramer T.S.: Continuous increase of vancomycin resistance in enterococci causing nosocomial infections in Germany – 10 years of surveillance. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* **7**, 54 (2018)
80. Gastmeier P., Schro C., Behnke M., Meyer E., Geffers C.: Dramatic increase in vancomycin-resistant enterococci in Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* **69**, 1660–1664 (2014)
81. Endocarditis and biofilm-associated pilus subunit A [*Enterococcus faecalis* 62], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/323480330> (29.12.2017)
82. Gozalan A., Durmaz R. i wsp.: Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains isolated from carriage and clinical samples in a tertiary hospital, Turkey. *J. Med. Microbiol.* **64**, 759–766 (2015)
83. Pinholt M., Gumpert H., Bayliss S., Nielsen J.B., Vorobieva V., Pedersen M., Feiln E., Worning P., Westh H.: Genomic analysis of 495 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* reveals broad dissemination of a vanA plasmid in more than 19 clones from Copenhagen, Denmark. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**, 40–47 (2017)

TAKSONOMIA DERMATOFITÓW – SYSTEMY KLASYFIKACYJNE ZMIENIAJĄ SIĘ, PROBLEMY IDENTYFIKACYJNE POZOSTAJĄ TE SAME

Sebastian Gnat^{1,*}, Aneta Nowakiewicz¹, Przemysław Zięba²

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

²Zakład Higieny Weterynaryjnej w Lublinie

Wpłynęło w sierpniu, zaakceptowano w listopadzie 2018 r.

Streszczenie: Infekcje grzybicze skóry, włosów i paznokci cechuje najwyższa prevalencja wśród wszystkich grzybic dotykając obecnie ponad 20–25% populacji ludzi i zwierząt na świecie. Czynniki etiologicznymi większości grzybiczych infekcji powierzchniowych są dermatofity. Spośród innych patogennych grzybów strzępkowych wyróżnia je unikalna właściwość rozkładu keratyny. Ogromna zdolność przetrwania w różnych ekosystemach grzybów tej grupy wynika z ich różnorodności morfologicznej, ekologicznej, jak również możliwości adaptacji do zmieniających się warunków środowiska. Dermatofity chociaż stanowią jedną z najstarszych grup mikroorganizmów długo nie doczekały się stabilnego systemu taksonomicznego. Co najważniejsze z klinicznego punktu widzenia, dermatofity wciąż przysparzają problemów diagnostycznych, co skutkuje błędami terapeutycznymi. Rosnąca liczba zakażeń, w tym również odzwierzęcych, brak stabilności taksonomicznej i niejednoznaczny obraz kliniczny niektórych przypadków dermatomykoz powodują konieczność poszukiwania nowych metod szybkiej, taniej i powtarzalnej identyfikacji gatunkowej tych grzybów. Z kolei identyfikacja gatunkowa determinowana jest jasnością kryteriów klasyfikacyjnych uwzględniających poglądy klinicystów, epidemiologów i mykologów. W niniejszej pracy Autorzy przedstawiają ewolucję systemów taksonomicznych dermatofitów na przestrzeni dziejów rozwoju mikrobiologii. Odkrywanie nowych faktów z zakresu biologii i ekologii dermatofitów, jak również rozwój technik możliwych do zastosowania w laboratorium diagnostyki mykologicznej skutkowało opracowaniem nowych strategii identyfikacyjnych. Współczesny system klasyfikacyjny tych patogenów oparty na badaniach molekularnych wydaje się być stabilny i szeroko akceptowany, czy jednak zakończy wiekowe zamieszanie klasyfikacyjne i okres setek zmian nomenklatury, będących koszmarem diagnostów? Można wnioskować, że taksonomia dermatofitów, zwłaszcza gatunków antropofilnych, jest już wystarczająco dojrzała, aby ustabilizować się z korzyścią zarówno dla klinicystów, jak i naukowców.

1. Wprowadzenie. 2. Pierwsze systemy klasyfikacji dermatofitów. 3. Fenotypowe systemy klasyfikacyjne. 4. „Biologiczna” era w klasyfikacji. 5. Ekologiczny podział dermatofitów. 6. Molekularna rewolucja w taksonomii dermatofitów. 7. Problemy taksonomiczne w mykologii. 8. Kliniczny aspekt taksonomii dermatofitów. 9. Obecnie obowiązujący system klasyfikacyjny. 10. Nierozróżnialne „kompleksy gatunków”. 11. Podsumowanie

TAXONOMY OF DERMATOPHYTES – CLASSIFICATION SYSTEMS CHANGE, IDENTIFICATION PROBLEMS REMAIN THE SAME

Abstract: Fungal infections of the skin, hair, and nails is characterized by the highest prevalence among all fungal infections currently affecting over 20–25% of the world’s human and animal populations. Dermatophytes are the etiological factors of the most superficial fungal infections. Among other pathogenic filamentous fungi distinguishes them a unique attribute to degrade keratin. The remarkable ability of this group of fungi to survive in different ecosystems results from their morphological and ecological diversity as well as high adaptability to changing environmental conditions. Dermatophytes, although they are one of the oldest groups of microorganisms recognised as pathogens, nevertheless they have not been classified in a stable taxonomic system for a long time. In terms of diagnostics, dermatophytes still pose a serious problem in the identification procedure, which is often related to therapeutic errors. The increasing number of infections including zoonoses, lack of taxonomic stability, and ambiguous clinical picture of dermatomycosis cases necessitate a search for new methods for rapid, cheap, and reproducible species identification of these fungi. In turn, the species identification is determined by the clarity of classification criteria combined with the taxonomic division generally accepted by microbiologists and referring to the views expressed by clinicians, epidemiologists, and scientists. In this paper, the authors present the evolution of taxonomic systems for dermatophytes over the history of microbiology development. Discovery of new facts about the biology and ecology of dermatophytes and the development of techniques applicable applied in a mycological diagnosis laboratory facilitated development of new identification strategies at various points in the history. The modern molecular classification system of these pathogens seems to be stable and widely accepted. However, will it end the long-standing classification confusion and the period of hundreds of nomenclatural changes, which are diagnosticians’ nightmare? It can be argued that the taxonomy of dermatophytes, in particular that of anthropophilic species, is sufficiently established to be stabilised for the benefit of both clinicians and scientists.

1. Introduction. 2. First dermatophyte classification systems. 3. Phenotypic classification systems. 4. “Biological” era in the classification. 5. Ecological division of dermatophytes. 6. Molecular revolution in the taxonomy of dermatophytes. 7. Taxonomic problems in mycology. 8. Clinical aspect of the taxonomy of dermatophytes. 9. Current classification system. 10. Indistinguishable “species complexes”. 11. Summary

Słowa kluczowe: dermatofity, taksonomia, metody identyfikacji, system klasyfikacyjny, nomenklatura

Key words: dermatophytes, taxonomy, identification methods, classification system, nomenclature

* 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

1. Wprowadzenie

Infekcje grzybicze skóry, włosów i paznokci stanowią najliczniejszą i najbardziej rozpowszechnioną grupę wszystkich grzybic. Częstość występowania powierzchniowych infekcji grzybiczych wzrosła w ostatnich dziesięcioleciach do takiego poziomu, że grzybice skóry dotykają obecnie ponad 20–25% światowej populacji, przez co są jedną z najczęstszych infekcji grzybiczych [4, 16, 17, 27, 45]. Czynniki etiologicznymi większości grzybiczych infekcji powierzchniowych są dermatofity [7, 11, 12, 22, 46, 60, 65, 66].

Chociaż nazwa dermatofity jest powszechnie stosowana, to nie ma jednej uniwersalnej i akceptowalnej przez środowisko mikrobiologów definicji, a jej używanie ma charakter raczej intencjonalny, do określania gatunków grzybów patogennych, posiadających zdolność rozkładu keratyny [28, 37, 65]. Howard i wsp. [28] dermatofitami określają liczną w gatunki grupę blisko spokrewnionych keratynofilnych grzybów z rodzaju *Epidermophyton* (Sabour. 1907), *Microsporium* (Gruby 1843) i *Trichophyton* (Malmsten 1848), które powodują infekcje skóry, włosów, paznokci i innych wytworów naskórka i skóry właściwej. Wszystkie gatunki dermatofitów należą do rodziny *Arthrodermataceae* (Locq. ex Currah 1985) i rzędu *Onygenales* (Cif. ex Benny i Kimbr. 1980). W tak ujętej definicji wątpliwości budzi nazywanie dermatofitami niepatogennych, saprofitycznych gatunków z wymienionych rodzajów, np. *Epidermophyton stockdaleae* (Prochacki i Eng.-Zas. 1974), *Microsporium boullardi* (Dominik i Majchr. 1965), *Trichophyton ajelloi* (Ajello 1968), *T. terrestre* (Durie i D. Frey 1957). Dla odróżnienia tych niepatogennych gatunków od właściwych patogenów, a jednocześnie wskazania ich biologicznego powiązania zaproponowano dla nich termin „dermatofitoidy” [32, 34].

2. Pierwsze systemy klasyfikacji dermatofitów

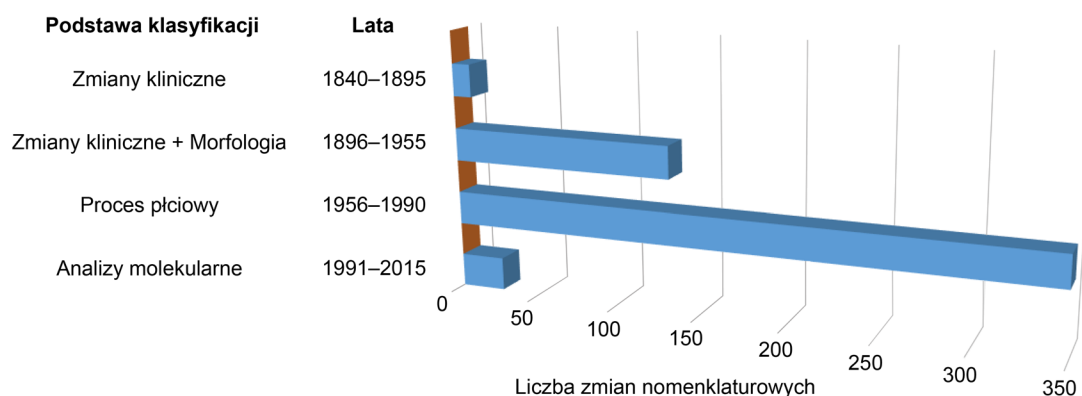
Dermatofity jako jedne z pierwszych mikroorganizmów zostały opisane jako czynniki chorobotwórcze ówczesnie obserwowanych zmian skórnych u ludzi i zwierząt [34]. Badania taksonomiczne tych grzybów zostały zapoczątkowane w 1841 roku przez Roberta Remaka i Davida Gruby'ego [26]. Pięć głównych gatunków dermatofitów uznawanych w dzisiejszych czasach za najistotniejsze epidemiologicznie, a mianowicie *Microsporium audouinii* (Gruby 1843), *Epidermophyton floccosum* (Langeron i Miloch. 1930), *Trichophyton schoenleinii* (Langeron i Miloch. ex Nann. 1934), *T. tonsurans* (Malmsten 1848) i *T. mentagrophytes* (Sabour. 1895) zostało opisanych w latach 1841–1875 [51]. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że pierwsza klasyfikacja dermatofitów powstała kilka dekad przed opra-

cowaniem przez Ludwika Pasteura metody uzyskiwania czystych kultur, co wskazuje na istotną zauważalność problematyki dermatomykoz w tamtych czasach [51]. Jedynym współcześnie znanym gatunkiem dermatofita, którego brakuje na liście R. Remaka i D. Gruby'ego jest *Trichophyton rubrum* (Sabour. 1911), a który został sklasyfikowany dopiero w XX wieku [49].

Hodowla i opis czystych kultur dermatofitów wprowadziły mykologię w swoistą epokę renesansu. Nowo klasyfikowane dermatofity były określane na podstawie połączonych obserwacji zróżnicowanych zmian klinicznych liszaju obrączkowego (ringworm) powodowanego przez różne grupy ekologiczne dermatofitów i opisów morfologii kolonii przeprowadzanych *in vitro* [50]. Posługując się metodologią Sabourauda jako standardem [50], w latach 1870–1920 wyodrębniono kolejnych szesnaście gatunków dermatofitów, przede wszystkim związanych z infekcjami u ludzi. Stosowanie tego samego standardu metodologicznego klasyfikacji dermatofitów doprowadziło w następnych dziesięcioleciach do wzrostu liczby opisów nowych gatunków i zamieszania nomenklaturowego. Ogólna koncepcja określania przynależności do dermatofitów została wówczas zaburzona, a reguły taksonomiczne stały się niespójne, co skutkowało wielokrotnymi zmianami w nomenklaturze. Zaowocowało to łącznie około 350 zmianami w nazwach gatunkowych w 1950 roku (Ryc. 1) [12]. Zasady klasyfikacyjne dermatofitów i jednolita nomenklatura anamorf zostały ustabilizowane dopiero po szerokich konsultacjach w środowisku mykologów, a rodzaje *Epidermophyton*, *Microsporium* i *Trichophyton* stały się taksonami skupiającymi wszystkie dotąd poznane gatunki dermatofitów [11, 12, 60].

3. Fenotypowe systemy klasyfikacyjne

Pasterowska metoda otrzymywania czystych kultur została szybko implementowana do mykologii i taksonomii dermatofitów [51]. Morfologia pojedynczej kolonii grzyba, w połączeniu z jego obrazem mikroskopowym, stanowiły dobre parametry diagnostyczne [11]. Wątpliwości dotyczące możliwości wykorzystywania w identyfikacji dermatofitów opisów makro- i mikromorfologii czystych kultur pojawiły się dopiero w momencie badania powtarzalności tych cech [22, 34, 60]. Udowodniono, że izolaty pochodzące bezpośrednio ze zmian klinicznych cechuje charakterystyczna morfologia, która jest diagnostycznie użyteczna, ale jednocześnie morfologia ta zmienia się w wyniku pasażowania kultur [11, 12, 18]. Standaryzacja szczepów referencyjnych była zatem trudna, co w konsekwencji doprowadziło do wprowadzenia licznych taksonów, które jednak obecnie uważane są za synonimy wcześniej opisanych gatunków [12, 64]. Obecnie, już tylko historycznie, można wskazać



Ryc. 1. Liczba zmian nomenklaturowych gatunków dermatofitów z uwzględnieniem kryterium klasyfikacji i okresu rozwoju taksonomii

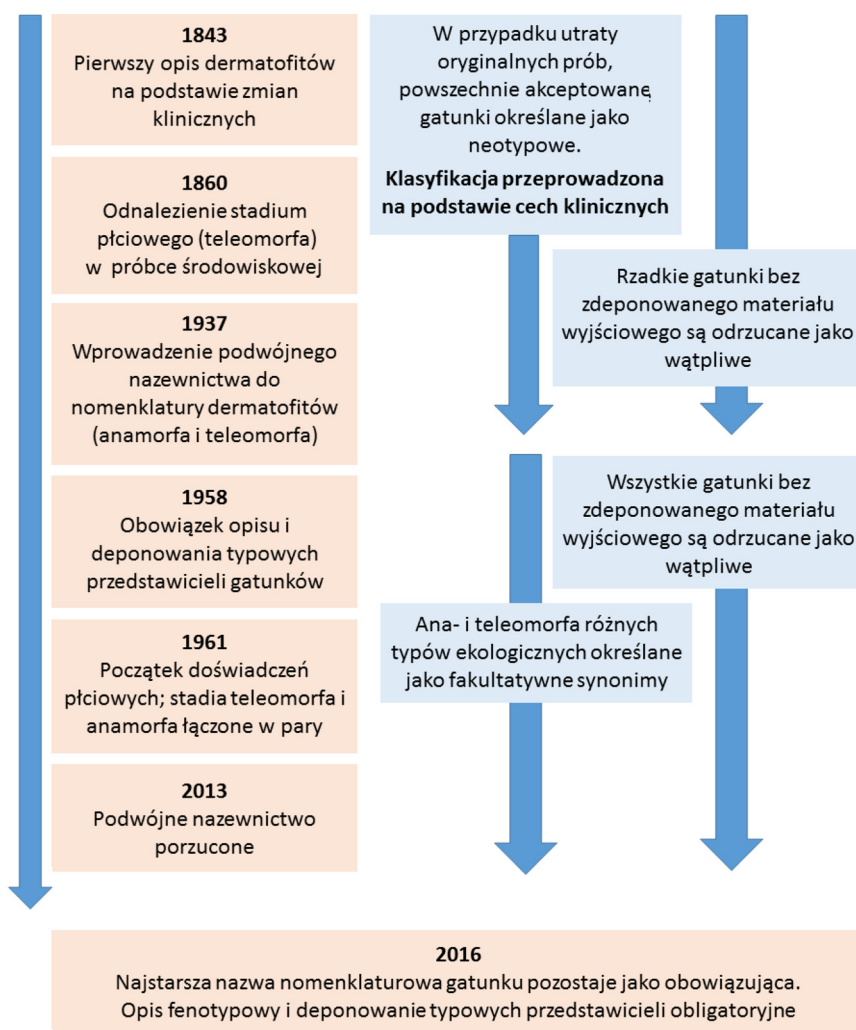
przynajmniej dwadzieścia różnych gatunkowych nazw synonimicznych *T. mentagrophytes*, sześć *T. verrucosum* (E. Bodin 1902) i po trzy dla *M. canis* oraz *E. floccosum*. Ponadto, różne rodzaje odmian morfologicznych opisywano jako osobne taksony, np. *Keratinomyces longifusus* (Flórián i Galgoczy 1964), będący w rzeczywistości *Microsporum fulvum* (Uriburu 1909) cechujący się silnie koherentnymi konidiami [41].

Błędna klasyfikacja była zatem nieuniknioną konsekwencją systemu diagnostycznego opartego wyłącznie na fenotypie [16, 17, 22, 66]. Co więcej, znanych jest obecnie co najmniej kilka gatunków dermatofitów, które zupełnie nie wykazują sporulacji lub bardzo słabo sporulują w hodowli *in vitro*. Do takich gatunków z pewnością można zaliczyć *Trichophyton concentricum* (R. Blanch. 1895) i *T. schoenleinii* (Langeron i Miloch. ex Nann. 1934), które ze względu na brak swoistych cech fenotypowych w hodowlach *in vitro* często są identyfikowane w oparciu o charakterystyczny obraz i lokalizację zmian klinicznych [12, 29].

W ostatnich dziesięcioleciach XX wieku stało się oczywiste, że identyfikacja gatunkowa oparta na morfologii ma swoje ograniczenia i nie może być dalej wykorzystywana. Uwzględniając te problemy, Weitzman i wsp. [59] wprowadzili do diagnostyki dermatofitów dodatkowy zestaw testów fizjologicznych. Zastosowanie między innymi tak zwanych „*Trichophyton*-agarów” pozwoliło wykazać zróżnicowanie zdolności poszczególnych szczepów do asymilacji panelu witamin. Ponadto, zdolność wzrostu w różnych temperaturach i możliwość upłynniania żelatyny pozwoliły wprowadzić dodatkowe kryteria w różnicowaniu izolatów. Nowe „konwencjonalne podejście” stosowane przy opisie gatunków dermatofitów stanowiło połączenie obrazu klinicznego infekcji, cech makroskopowych i mikroskopowych czystych kultur oraz ich fizjologii. Jedynym nieuwzględnionym aspektem w tym podejściu była serologia szczepów, która nigdy tak naprawdę nie została wprowadzona do diagnostyki dermatofitów [11, 15, 32].

4. „Biologiczna” era w klasyfikacji

Opisy stadiów teleomorficznych dermatofitów autorstwa Christine Dawson i Jeremy Gentles’a [9] oraz Phyllis Stockdale [52] pozwoliły wprowadzić do mykologii biologiczną koncepcję gatunku. Owi badacze stwierdzili, że niektóre geofilne i zoofilne dermatofity, jak również pokrewne im niepatogenne gatunki, takie jak *Trichophyton terrestre* i *T. ajelloi*, rozmnażają się w procesie płciowym. Do określenia stadiów doskonałych (teleomorficznych) tych grzybów zostały wprowadzone nazwy rodzajowe *Arthroderma* (Curr. 1860) i *Nannizzia* (Stockdale 1961) [9, 11, 52, 53]. W konsekwencji wzrosła liczba taksonów, a klasyfikacja i identyfikacja skomplikowały się przez wprowadzenie podwójnej nomenklatury dla tych grzybów (Ryc. 2). Określenie typów płciowych dermatofitów zaczęło się w niezwykle sposób, gdy Stockdale [53] odkrył, że u przedstawicieli wielu, pozornie niezwiązanych ze sobą gatunków, można indukować proces płciowy w obecności szczepu testowego *Arthroderma simii* (Stockdale, D.W.R. Mack. i Austwick 1965). Większość gatunków dermatofitów, dla których znane są stadia doskonałe (teleomorficzne) może być identyfikowana tą metodą. W toku prowadzonych badań okazało się, że *Trichophyton rubrum* posiada typ płciowy określanej jako (-), podczas gdy gatunek blisko spokrewniony *T. megninii* (R. Blanch. 1895), obecnie uważany za synonim pierwszego z wymienionych, jest typu płciowego (+) [52, 53]. Tylko dla kilku ważnych epidemiologicznie gatunków dermatofitów, takich jak *Epidermophyton floccosum* (Langeron i Miloch. 193) i *T. soudanense* (Joyeux 1912) nie opisano do tej pory ich stadiów teleomorficznych [11]. Summerbell [55] zwrócił uwagę na oczywisty czynnik ekologiczny łączący gatunki o nieznanym stadiach teleomorficznych, mianowicie, wszystkie były zdolne do wywoływania infekcji u zwierząt i/lub człowieka. Natomiast do tej pory nie odnaleziono żadnych struktur rozrodczych pozostawianych na keratynowych szczątkach



Ryc. 2. Typowi przedstawiciele gatunków i ich miejsce w historii taksonomii dermatofitów

roślinnych bądź zwierzęcych, które umożliwiałyby im późniejsze procesy płciowe.

Znajomość sekwencji genomowych wielu gatunków dermatofitów pozwoliła określić *loci* odpowiedzialne za typy płciowe [36]. Stosując częściową amplifikację każdego *locus*, Kano i wsp. [31] potwierdzili molekularnie, że 22 badane przez nich szczepy *T. verrucosum* wykazują tylko jeden typ płciowy. Inne doniesienia naukowe [11, 12, 25] ujawniły, że pojedynczy typ płciowy występuje u wielu gatunków, m. in.: *T. tonsurans* (Malmsten 1848), *T. equinum* (Geddoelst 1902), *T. interdigitale* (Priestley 1917), *T. schoenleinii* (Langeron & Miloch. ex Nann. 1934), *T. rubrum*, *T. violaceum* (Sabour. ex E. Bodin 1902), *T. erinacei* (A.A. Padhye i J.W. Carmich. 1969), *T. concentricum*, *M. audouinii* i *M. ferrugineum* (M. Ota 1921). Potwierdza to pogląd, że dominującym sposobem rozmnażania tych grzybów jest bezpłciowa reprodukcja klonalna, która pojawiła się w konsekwencji utraty jednego z typów płciowych (+) lub (-) na poziomie gatunku [12, 31, 36]. Wyjątek stanowią tu gatunki zoofilne, takie jak *T. benhamiae* (Y. Gräser i de Hoog 2016) i *T. mentagrophytes*, gdzie obydwa typy

płciowe były obecne, ale w różnych proporcjach [56, 57]. Na podstawie tych badań można wnioskować, że klonalne procesy bezpłciowe są dominującym sposobem rozmnażania się wszystkich dermatofitów antropofilnych i większości zoofilnych [12, 36]. Podkreślenia wymaga też różnica w typach propagul rozmnażania bezpłciowego (konidiów) zależna od stadium życiowego, w którym znajduje się grzyb [16, 19]. W czasie rozwoju w obrębie struktur włosa lub naskórka strzępki grzyba ulegają fragmentacji w celu wytworzenia licznych przetrwalnych, małych artrokonidii, stanowiących zarazem elementy infekcyjne [40]. Z kolei bezpłciowe rozmnażanie grzybów *in vitro* daje zupełnie inne pokolenie zarodników, określanymi makro- i mikrokonidiami [11, 16, 17, 21, 22].

Ciekawych obserwacji dokonali Anzawa i wsp., [2] którzy wykazali możliwość zachodzenia procesu płciowego pomiędzy wysoce kompetentnym szczepem testowym *A. simii*, wytwarzającym płodne pokolenie, a szczepem *T. rubrum*. W wyniku krzyżowania tych szczepów uzyskano 35 askospor, z których jedna okazała się hybrydą obydwu krzyżowanych szcze-

pów tych dwóch gatunków. Wydaje się, że dermatofity posiadły atawistyczną zdolność wymiany materiału genetycznego w wyniku rozmnażania płciowego w odpowiedzi na niekorzystne warunki, np. stresujące warunki nowo zasiedlonego (kolonizowanego) środowiska [12]. W rzeczywistości różne nisze ekologiczne w przypadku gatunków antropofilnych (*T. rubrum*) i zoofilnych (*A. simii*) ograniczają możliwości spotkania się w naturze szczepów o różnych preferencjach ekologicznych [2].

5. Ekologiczny podział dermatofitów

Duże różnice między gatunkami dermatofitów można dostrzec w odniesieniu do ich naturalnego środowiska występowania. Dotychczas opisano trzy grupy ekologiczne dermatofitów: antropofilne, zoofilne i geofilne (Tabela I). Niejednokrotnie zaklasyfikowanie poszczególnych gatunków do typu ekologicznego jest niemożliwe z powodu niewystarczających różnic fenotypowych i braku molekularnego wyznacznika [40, 43, 44]. Gatunki antropofilne naturalnie kolonizują wytwory naskórka człowieka, przenosząc się między gospodarzami i powodując przewlekłe, ale łagodnie przebiegające infekcje głównie w obrębie gatunku *Homo sapiens* [15, 40]. Transmisja zakażenia na zwierzęta aczkolwiek sporadyczna jest uznawana za możliwą [40].

Gatunki zoofilne bytują na zwierzętach, ich przeniesienie na ludzi jest możliwe i częste, a odbywa się zwykle poprzez rezerwuary, którymi mogą być same zwierzęta, ich sierść lub przedmioty, z którymi miały styczność [16–20, 40, 43, 44]. Dermatofity zoofilne izolowane od zwierząt, odpowiedzialne są za infekcje objawowe, ale niejednokrotnie bytują również bezobjawowo, czyniąc zwierzę nosicielem i w tym przypadku mogą stać się źródłem epidemii [19, 20]. Naturalnym miejscem bytowania dermatofitów geofilnych jest gleba, często wokół siedlisk (nor, jam) określonych ssaków lądowych [5]. Ta grupa grzybów może być przenoszona przez zwierzęta mechanicznie na powłokach zewnętrznych [5, 15, 19], imitując bezobjawowe nosicielstwo, stąd różnica między dermatofitami geofilnymi i zoofil-

nymi nie zawsze jest ostra. Dodatkowo, gdy transmisja odbywa się na człowieka, gatunki zoo- i geofilne powodują grzybice o ostrym przebiegu z silnie wyrażonymi objawami reakcji zapalnej [16, 20, 22]. Dowody naukowe wskazują na zjawisko wysokiej zakaźności dermatomykoz zoofilnych wśród ludzi. Niejednokrotnie prowadzą do powstawania ostrych ognisk infekcji z wyraźnym pierścieniem na brzegu zmiany świadczącym o silnym procesie zapalnym [20, 54]. Z kolei większość infekcji powodowanych przez dermatofity geofilne ma przebieg łagodny, a ogniska mają charakter samoograniczający się [15, 54].

W toku prowadzonych w ostatnich latach badań nad filogenezą dermatofitów została zaobserwowana tendencja ewolucyjna, wskazująca zauważalny trend adaptacyjny, od najstarszych dermatofitów geofilnych poprzez zoofilne do grupy dermatofitów antropofilnych. Ostatnia z wymienionych uchodzi za ewolucyjnie najmłodszą, najsłabiej przystosowaną do różnych nisz ekologicznych, a zarazem wąsko wyspecjalizowaną do rozwoju na skórze człowieka [27, 64]. Biologiczne wyjaśnienie tego zjawiska wydaje się być proste. Dostosowanie do życia w stałym środowisku tkanek żywiciela spowodowało wtórną utratę wielu mechanizmów adaptacyjnych, co wyraźnie zauważalne jest w utracie chociażby typów płciowych u antropofilnych gatunków [25, 64]. Natomiast dermatofity geofilne, bytujące w zmiennych warunkach glebowych i podlegające ciągłej konkurencji ze strony innych mikroorganizmów, wykazują szereg cech adaptacyjnych, w tym zdolność rozmnażania płciowego [2, 64]. Ogniwu pośrednie stanowi grupa dermatofitów zoofilnych. Okrywa włosowa zwierząt jako nisza ekologiczna dla grzybów jest bowiem trudniejsza do opanowania niż skeratynizowane tkanki ludzkie, ale z pewnością łagodniejsza niż gleba eksponowana na zmienne warunki fizyko-chemiczne [47, 64]. Wydaje się, iż wspólnego przodka wszystkich dermatofitów należy poszukiwać pośród gatunków geofilnych [25, 63]. Tak przedstawiona charakterystyka poszczególnych grup dermatofitów wyznacza trzy typy ekologiczne, które chociaż nie są wyraźnie fenotypowo rozróżnialne, są zasadniczo odmiennie przystosowane do środowiska życia i mają również inne znaczenie kliniczne (Tabela I).

Tabela I
Charakterystyka grup ekologicznych dermatofitów

Cecha charakterystyczna	Grupa ekologiczna		
	Antropofile	Zoofile	Geofile
Pochodzenie ewolucyjne	odległe	pośrednie	bliskie
Proces płciowy	brak	możliwy	częsty
Zmiany infekcyjne	niewielkie	umiarkowane	nasilone
Źródło zakażenia	człowiek	zwierzęta (możliwe także środowisko)	środowisko (głównie gleba)
Leczenie	przewlekłe	łatwe, krótkie	samoistne

6. Molekularna rewolucja w taksonomii dermatofitów

Podobnie jak w czasach Ludwika Pasteura, kiedy czyste kultury zrewolucjonizowały mikrobiologię, tak w ostatniej dekadzie XX wieku zastosowanie metod molekularnych zrewolucjonizowało taksonomię dermatofitów i innych grzybów. Jako pierwsze markery molekularne w mykologii wykorzystano sekwencje DNA kodujące białka małej i dużej podjednostki rybosomu [23, 33, 39, 47, 61]. Gräser i wsp. [22, 24] zastosowali w badaniach taksonomicznych grzybów region ITS rDNA (Internal Transcribed Spacer ribosomal DNA), co pozwoliło im sklasyfikować znaczną liczbę gatunków. Ten marker molekularny był wielokrotnie wykorzystywany w późniejszych badaniach [10, 16–20, 25, 35, 42, 61, 63, 66], także w połączeniu z innymi, takimi jak gen beta tubuliny [47, 48] lub gen czynnika translacyjnego 1 [38]. Na podstawie tych badań stwierdzono, że główna topologia rodziny *Arthrodermataceae* jest molekularnie stabilna, ale nie w pełni odpowiada morfologii, ponieważ rodzaj *Trichophyton* wydaje się być polifiletyczny [24, 38, 47, 48]. Filogenetycznie, antropofilne gatunki dermatofitów są najmłodsze ewolucyjnie i ograniczone do kilku zamkniętych kłastrów, gatunki zoofilne, zwłaszcza infekujące zwierzęta hodowlane, wiekiem ewolucyjnym zajmują pozycje pośrednią, stanowiąc ogniwo łączące z przodkami, gatunkami geofilnymi [12]. Nowy system taksonomiczny sformalizował te różnice pochodzenia ewolucyjnego, co w zamyśle miało przekładać się na większą użyteczność w diagnostyce laboratoryjnej.

Podczas gdy podejście molekularne w taksonomii dermatofitów było w stanie określić główne trendy ich ewolucji, okazało się ono zawodne w klasyfikacji i identyfikacji kilku epidemiologicznie istotnych gatunków [25]. Ugruntowane w mykologii pary gatunków, takie jak *Trichophyton rubrum* / *T. violaceum*, *T. equinum* / *T. tonsurans* i do pewnego stopnia także trójka *M. audouinii* / *M. canis* / *M. ferrugineum* pozostała nierozróżnialna molekularnie, nawet z zastosowaniem analizy wielolokusowej (multilocus) [12]. Z tego względu jedynym rozwiązaniem tego problemu taksonomicznego może być podejście wielokierunkowe, łączące dane molekularne, ekologiczne, fenotypowe i uwzględniające cykle życiowe tych grzybów.

7. Problemy taksonomiczne w mykologii

Głównym problemem taksonomicznym, często spotykanym w przypadku grzybów środowiskowych, jest nieoczekiwana różnorodność filogenetyczna izolatów, które wcześniej wydawały się fenotypowo monomorficzne [22, 25, 63, 64]. Izolaty o podobnej makro- i mikro-morfologii niejednokrotnie okazują się przynależać do zupełnie innych gatunków, rodzajów, a nawet

grup ekologicznych [22, 40, 60]. Należy zaznaczyć, że sklasyfikowane na podstawie fenotypu dermatofity, pomimo zróżnicowania cech w obrębie równoważnych taksonów, należą zawsze do jednej linii ewolucyjnej, tj. rodziny *Arthrodermataceae* [25]. O wspólnej filogenezie wszystkich dermatofitów świadczyć mogą ich keratynofilne właściwości, które stanowią rzadką cechę w królestwie grzybów [64]. Z kolei ewolucja w obrębie tej rodziny wykazuje silną koherencję z naturalnymi gospodarzami, zwierzętami lub ludźmi, dostarczającymi podstawowy składnik odżywczy – keratynę [63]. Zależność między gatunkiem dermatofitu a gospodarzem odnotowano w literaturze długo przed wprowadzeniem do taksonomii metod molekularnych, a przyczyną upatruje się w zróżnicowaniu struktury keratyny u poszczególnych gatunków żywicieli i zjawisku przystosowania patogenu do żywiciela [8].

Drugim, aktualnym w mykologii problemem taksonomicznym jest koncepcja gatunków molekularnych [22, 25]. Długie lata po wprowadzeniu genetycznego kryterium do taksonomii obowiązywała reguła mówiąca, że w królestwie grzybów liczba gatunków określonych na podstawie badań molekularnych jest znacznie większa niż ta, która została zdefiniowana w oparciu o konwencjonalne metody fenotypowe [3, 13, 21]. W literaturze dostępne są dane na temat mnogości typów genetycznych *Aspergillus fumigatus* (Fresen. 1863) [3], *Candida parapsilosis* (Langeron i Talice 1932) [13] lub *Aureobasidium pullulans* (G. Arnaud 1918) [21], które potwierdzają ten pogląd. Dermatofity wydają się być jednak wyjątkowe pod tym względem. W ciągu ostatnich 150 lat badań mykologicznych, skoncentrowanych głównie w ośrodkach europejskich z powodu dużej częstotliwości i różnorodności chorób powodowanych przez te grzyby, opisana została ogromna liczba fenotypów i genotypów dermatofitów [21]. Obecnie na kontynencie europejskim, w oparciu o kryteria genetyczne zidentyfikowano 10 gatunków dermatofitów antropofilnych [12]. Jednakże w Atlasie Grzybów Klinicznych [11, 12] wymienione zostało 103 taksony tego typu, a w literaturze badacze posługują się aż 242 nazwami synonimicznymi na opisanie tych samych 10 gatunków [12, 15]. Tym samym, wydaje się, że w przypadku dermatofitów różnorodność gatunkowa obserwowana na podstawie wyników klasycznej identyfikacji jest znacznie większa niż realnie istniejąca różnorodność genetyczna. Możemy wnioskować, że antropofilne, a przypuszczalnie także zoofilne, dermatofity zostały sklasyfikowane sztucznie, co doprowadziło do nagromadzenia równoważnych taksonów, nie mających filogenetycznego uzasadnienia [64]. Podobne zjawiska zawyżenia liczby gatunków widoczne są w innych grupach grzybów o znaczeniu praktycznym, które zostały w związku z tym zbadane *in extenso*. Przykładowo, gatunki *Rhizopus* (Ehrenb. 1821) łatwo rosną w hodowli

in vitro, a ich przemysłowe wykorzystanie rozpoczęło się natychmiast po okresie Pasteura, ze względu na ważną rolę w procesach fermentacji azjatyckich produktów spożywczych na bazie soi [30]. Fenotypowo opisano 43 gatunki synonimiczne *Rhizopus microsporus* (Tiegh. 1875) i *R. arrhizus* (A. Fisch. 1892), które molekularnie zredukowano do zaledwie dwóch [14]. Innym przykładem jest wszechobecna *Alternaria alternata* (Keissl. 1912), zredukowana na podstawie analiz genomów do jednego gatunku, z pierwotnie licznych synonimicznych gatunków wyodrębnionych w oparciu o morfologię konidiów i typów konidioforów [62].

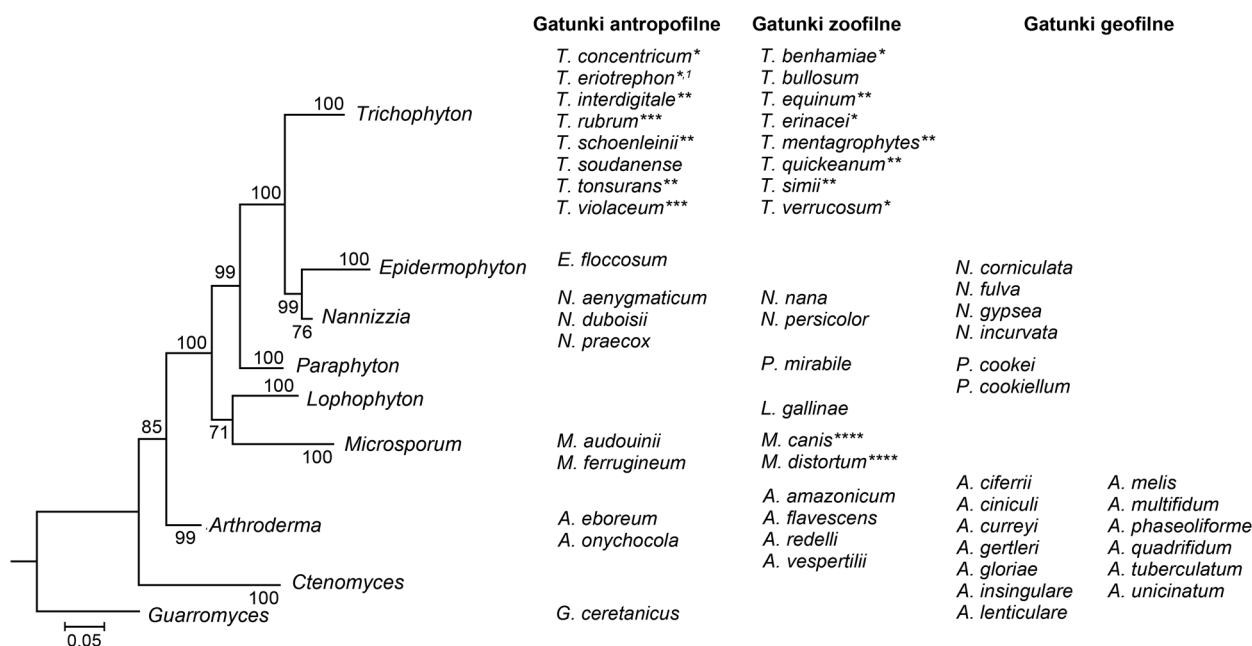
8. Kliniczny aspekt taksonomii dermatofitów

Obecne trzy główne rodzaje dermatofitów *Epidermophyton*, *Microsporum* i *Trichophyton* sklasyfikowane są na podstawie cech morfologicznych. Tylko częściowo odpowiada to ich filogenezie [22]. Najlepszym przykładem są gatunki należące do rodzaju *Trichophyton*, w którym, pomimo że sklasyfikowane są grzyby spełniające morfologiczne kryteria, częściowo mieszczą się dermatofity antropofilne i zoofilne, a częściowo także ich przodkowie, przeważnie gatunki geofilne [23, 24]. W związku z tym, szereg geofilnych gatunków *Trichophyton*, odległych filogenetycznie od przedstawicieli dwóch pozostałych grup ekologicznych i prawie nigdy niepowodujących infekcji u ludzi i zwierząt, jest obecnie rozpatrywanych w rutynowej diagnostyce na równi z patogenami [12, 15, 22]. Z punktu widzenia ekologicznego i klinicznego różnica między tymi grupami jest ogromna, ponieważ gatunki antropofilne i zoofilne są uważane za „prawdziwe” (obligatoryjne) patogeny, ponieważ mają przewagę ewolucyjną i są przenoszone między ludźmi bądź ich transmisja odbywa się ze zwierząt na ludzi [27, 64]. Natomiast przytłaczająca większość gatunków geofilnych jest oportunistami, a ich naturalnym środowiskiem bytowania jest gleba [60]. Połączenie tak wysoce ewolucyjnie odległych grzybów w jednym rodzaju nie jest optymalne i może prowadzić do błędów diagnostycznych. Filogeneza molekularna wyraźnie oddziela dermatofity geofilne od antropofilnych i zoofilnych, co potwierdzają opublikowane wcześniej badania oparte na analizie sekwencji ITS [22], genu czynnika translacyjnego 1 (*TEF1*) [38] i genu kalmoduliny (*CAL*) [1]. System taksonomiczny dermatofitów użyteczny w diagnostyce klinicznej, stanowiący nowoczesne rozumienie identyfikacji, musi odzwierciedlać filogenezę molekularną, dodatkowo popartą danymi pochodzącymi z badań fenotypowych i oceny obrazu klinicznego, a więc powinien być wielokierunkowy [12]. Główne kryteria optymalnego określania gatunków powinny opierać się na koncepcji gatunków biologicznych, tj. możliwości losowego łączenia się

między szczepami tego samego gatunku oraz wydawania płodnego potomstwa i brak takiej możliwości między odrębnymi gatunkami [43, 44]. W praktyce mikrobiologicznej to kryterium często nie jest jednak łatwe do zastosowania. Eksperymenty krzyżowania płciowego były szczególnie pomocne w wyznaczeniu gatunku *Microsporum gypseum* (Guiart i Grigoraki 1928) i kompleksu *T. mentagrophytes* [56–58]. Rozmnażanie płciowe wielu gatunków dermatofitów często nie zostało opisane *ex vivo*, ponieważ warunki, w których produkowane są teleomorfy, są nieznane lub być może naturalnie nie istnieją specyficzne uwarunkowania środowiskowe dla tego procesu [25, 43, 44]. W przypadku populacji tych grzybów przewaga liczebności jednego typu płciowego może prowadzić do preferowania rozmnażania bezpłciowego i wyjaśniać brak zróżnicowania wewnątrzgatunkowego [22, 25]. Wówczas gatunek będzie stanowiła populacja osobników o wysokim stopniu zgodności genetycznej, a koncepcja gatunków biologicznych zostanie wyrażona *in silico* na podstawie analizy podobieństwa genomów [22, 64]. De Hoog i wsp. [12] korzystając z tej koncepcji zaproponowali 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 cechowała inna swoistość, umożliwiając wyodrębnienie różnej liczby taksonów zgodnie z zależnością ITS > TUB > 60S > LSU [12]. Wyniki tych badań wskazują, że sekwencja ITS rDNA jest wystarczająco informatywna do analiz genomów dermatofitów, stanowi zatem optymalny marker w rutynowej diagnostyce, chociaż dla odróżnienia poszczególnych *varietas* niektórych „kompleksów gatunkowych” konieczne jest oparcie identyfikacji gatunkowej na analizie dodatkowych genów i cech fenotypowych [12].

9. Obecnie obowiązujący system klasyfikacyjny

Wnioski z warsztatów mykologicznych zorganizowanych w 2016 roku przez CBS KNAW Fungal Biodiversity Centre (The Centraalbureau voor Schimmelcultures Fungal Biodiversity Centre, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences) w Utrechtie w Holandii pozwoliły zespołowi kierowanemu przez Sybrena De Hoog [12], zaproponować nowy system klasyfikacji dermatofitów oparty w głównej mierze na kryterium molekularnym. Relacje taksonomiczne między członkami rodziny *Arthrodermataceae* w tym systemie modelowo przedstawia drzewo filogenetyczne skonstruowane na podstawie analiz sekwencji ITS zlokalizowanych w obrębie rDNA (Ryc. 3). W obrębie zamieszczonego filogramu można wyróżnić 7 głównych kladów. Największy z nich obejmuje gatunki z rodzaju



Ryc. 3. Filogeneza i podział ekologiczny najczęściej izolowanych gatunków dermatofitów

Objaśnienie: * *T. benhamiae* complex, ** *T. mentagrophytes* complex, *** *T. rubrum* complex, **** *M. canis* complex, ¹ gatunek sklasyfikowany wyłącznie molekularnie.

Trichophyton, cechujące się polifiletycznym pochodzeniem ewolucyjnym. W jego obrębie znajdują się cztery gatunki zbiorowe (zmiennie morfologicznie): *Trichophyton mentagrophytes* kompleks, *Trichophyton benhamiae* kompleks (Y. Gräser i de Hoog 2016), *Trichophyton bullosum* (Lebasque 1933) i *Trichophyton rubrum* kompleks. Drugi kład zawiera pojedynczy gatunek *Epidermophyton floccosum*, który jest parafiletyczny i ewolucyjnie odległy od pozostałych dermatofitów. Oddzielny kład zawiera dermatofity klasyfikowane jako *Microsporium canis* kompleks, a trzy pozostałe obejmują rodzaje *Lophophyton* (Matr. i Dassonv. 1899), *Paraphyton* (Y. Gräser, Dukik i de Hoog 2016) i *Nannizzia* (Stockdale 1961). Najbardziej zróżnicowany kład zawiera wiele gatunków obecnie znanych pod nazwą teleomorficzną *Arthroderma*. Zewnętrzną gałąź na drzewie filogenetycznym stanowi nowy takson *Guarromyces* (Y. Gräser i de Hoog 2016), do którego przeniesiono opisywany wcześniej antropofilny gatunek *Keratinomyces ceretanicus*.

10. Nerozróżnialne „kompleksy gatunków”

Wyróżnione na podstawie analizy sekwencji ITS w obrębie rDNA tzw. „kompleksy gatunków” są taksonem wyższej rangi, w którym zgrupowane są nierozróżnialne na poziomie ITS gatunki [12, 15]. Chen i wsp. [6] zdefiniowali kompleks gatunków jako populacje różnych gatunków, które są wątpliwie odrębne. W przypadku dermatofitów, kompleks gatunków oznacza tak-

son różniący się genomowo jednoznacznie od innych taksonów rangi gatunku, podczas gdy, przy zastosowaniu tego samego kryterium, nie wykazuje się zróżnicowania poszczególnych gatunków wchodzących w skład kompleksu [12, 25, 35, 47].

Największych trudności w różnicowaniu gatunków w obrębie gatunków zbiorowych (species complex) nastrocza specyficzność ekologiczna dermatofitów. Weźmy pod uwagę *T. mentagrophytes* kompleks, będący jednolitym genomowo kompleksem gatunków *T. mentagrophytes* i *T. interdigitale* (Priestley 1917) [22]. Te dwa gatunki wykazują zupełnie odrębne przystosowania ekologiczne, pierwszy z nich jest stricte antropofilny, drugi – zoofilny [22]. Podobnie, kryterium klasyfikacyjne oparte na ITS rDNA nie umożliwi zróżnicowania zoofilnego *T. equinum* od antropofilnego *T. tonsurans* [12, 22]. Wymienione przykłady dotyczą zasadniczego problemu w mykologii medycznej, uważa się bowiem, że infekcja u ludzi przez dermatofity zoofilne ma przebieg ostry ze znacznym stanem zapalnym, w przeciwieństwie do łagodnych dermatomykoz, których czynnikami etiologicznymi są gatunki antropofilne [5]. Wiarogodne ustalenie granic gatunków dermatofitów, a tym samym trafna identyfikacja gatunkowa, wymaga zatem podejścia wielokierunkowego. Wówczas kumulatywna analiza danych molekularnych, fenotypowych i klinicznych pozwoli wyznaczyć biologiczne ramy poszczególnych taksonów dermatofitów zgodne ze specyfiką ekologiczną tej grupy grzybów [12, 16, 18–20]. Nie ulega wątpliwości, że konieczne są dalsze szczegółowe badania poświęcone temu zagadnieniu.

11. Podsumowanie

Można wnioskować, że taksonomia dermatofitów, zwłaszcza gatunków antropofilnych, jest już wystarczająco dojrzała, aby ustabilizować się z korzyścią dla klinicystów. Aktualnie zdefiniowane taksony prawdopodobnie nie ulegną drastycznym zmianom w najbliższej przyszłości, a prezentowana filogeneza nie okaże się błędna w toku wciąż prowadzonych badań. Czy zatem stabilność nomenklatury dermatofitów została wreszcie osiągnięta? Przegląd aktualnej literatury naukowej nie daje takiej pewności. W niedalekiej przyszłości można się spodziewać pełnego opisu rzadkiego gatunku *Trichophyton eriatrepon*, podobnie, wciąż trwają szeroko zakrojone badania nad trudnym do zidentyfikowania *Microsporum aenygmaticum*, a gatunki zawleczone z geograficznie odległych obszarów, takie jak *Trichophyton concentricum* ulegną zapewne reklasyfikacji. Uwaga mykologów zwrócona jest w szczególności na grupę dermatofitów geofilnych, wciąż niewystarczająco przebadaną w porównaniu do ich dużej liczby potencjalnych żywicieli i zajmowanych nisz ekologicznych. Dziś gatunki te nie mają większego znaczenia klinicznego, ale, jak głoszą znawcy tematu, ewolucja w drodze życia nie zatrzymuje się na przystankach.

Piśmiennictwo

- Ahmedi B., Mirhendi H., Makimura K., de Hoog G.S., Shidfar M.R., Nouripour-Sisakht S., Jalalizand N.: Phylogenetic analysis of dermatophyte species using DNA sequence polymorphism in calmodulin gene. *Med. Mycol.* **54**, 500–514 (2016)
- Anzawa K., Kawasaki M., Mochizuki T., Ishizaki H.: Successful mating of *Trichophyton rubrum* with *Arthroderma simii*. *Med. Mycol.* **48**, 629–634 (2010)
- Balajee S.A., Gribskov J.L., Hanley E., Nickle D., Marr K.A.: *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryot. Cell.* **4**, 625–632 (2005)
- Barry I., Hainer M.D.: Dermatophyte infection. *Am. Fam. Physician.* **67**, 101–109 (2003)
- Cabañes F.J., Abarca M.L., Bragulat M.R., Castellá G.: Seasonal study of the fungal biota of the fur of dogs. *Mycopathologia*, **133**, 1 (1996)
- Chen M., Zeng J., de Hoog G.S., Stielow B., Ende A.H.G., Liao W., Lackner M.: The concept of 'species complex' illustrated by the *Scedosporium apiospermum* species complex. *Fungal. Biol.* **120**, 137–146 (2015)
- Courtellemont L., Chevrier S., Degeilh B., Belaz S., Gangneux J.P., Gangneux R.: Epidemiology of *Trichophyton verrucosum* infection in Rennes University Hospital, France: A 12-year retrospective study. *Med. Mycol.* **55**, 720–724 (2017)
- Currah R.S.: Taxonomy of the onygenales: *Arthrodermataceae*, *Gymnoascaceae*, *Myxotrichaceae* and *Onygenaceae*. *Mycotaxon.* **24**, 1–216 (1985)
- Dawson C.O., Gentles J.C.: The perfect states of *Keratinomyces ajelloi* Vanbreuseghem, *Trichophyton terrestre* Durie and Frey and *Microsporum nanum* Fuentes. *Sabouraudia*, **1**, 49–57 (1961)
- De Baere T., Summerbell R., Theelen B., Boekhout T., Vanechoutte M.: Evaluation of internal transcribed spacer 2-RFLP analysis for the identification of dermatophytes. *J. Med. Microbiol.* **59**, 48–54 (2010)
- de Hoog G.S., Guarro J., Gené J., Figueras M.J.: Atlas of clinical fungi, 3rd web-edition, 2015
- de Hoog G.S., Dukik K., Monod M., Packeu A., Stubbe D., Hendrickx M., Kupsch C., Stielow J.B., Freeke J., Göker M. i wsp.: Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. *Mycopathologia*, **182**, 5–31 (2017).
- Diezmann S., Cox C.J., Schönián G., Vilgalys R.J., Mitchell T.G.: Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 5624–5635 (2004)
- Dolatabadi S., Walther G., Gerrits van den Ende A.H.G., de Hoog G.S.: Diversity and delimitation of *Rhizopus microsporus*. *Fungal Divers.* **64**, 145–163 (2014)
- Dworecka-Kaszak B., Dąbrowska I.: Dermatofity – nowa taksonomia i współczesne metody różnicowania. Przegląd aktualnego stanu wiedzy o mechanizmach patogenyzy i interakcjach patogen-gospodarz. *Med. Weter.* **73**, 613–617 (2017)
- 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)
- Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Zięba 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)
- Gnat S., Nowakiewicz A., Ziółkowska G., Majer-Dziedzic B., Trościańczyk A., Zięba P.: Evaluation of growth conditions and DNA extraction techniques used in the molecular analysis of dermatophytes. *J. Appl. Microbiol.* **122**, 1368–1379 (2017)
- Gnat S., Nowakiewicz A., Łagowski D., Trościańczyk A., Zięba P.: Multiple-strain *Trichophyton mentagrophytes* infection in a silver fox (*Vulpes vulpes*) from a breeding farm. *Med. Mycol.* **57**, 171–180. DOI: 10.1093/mmy/myy011 (2018)
- Gnat S., Nowakiewicz A., Łagowski D., Zięba P.: *Tinea corporis* by *Microsporum canis* in mycological laboratory staff: Unexpected results of epidemiological investigation. *Mycoses*, **61**, 945–953. DOI: 10.1111/myc.12832 (2018)
- Gostinčar C., Ohm R.A., Kogej T., Sonjak S., Turk M., Zajc J., Zalar P., Grube M., Sun H., Han J. i wsp.: Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. *BMC Genom.* **15**, 549 (2014)
- Gräser Y., de Hoog G.S., Summerbell R.C.: Dermatophytes: recognizing species of clonal fungi. *Med. Mycol.* **44**, 199–209 (2006)
- Gräser Y., Kuijpers A.F., Presber W., de Hoog G.S.: Molecular taxonomy of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. tonsurans*. *Med. Mycol.* **37**, 315–330 (1999)
- Gräser Y., Kuijpers A.F., Presber W., de Hoog G.S.: Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 3329–3336 (2000)
- Gräser Y., Scott J., Summerbell R.: The New Species Concept in Dermatophytes a Polyphasic Approach. *Mycopathologia*, **166**, 239 (2008)
- Gruby D.: Mémoire sur une végétation qui constitue la vraie teigne. *C.R. Acad. Sci.* **13**, 72–75 (1841)
- Havlickova B., Czaika V.A., Friedrich M.: Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*, **51**, 2–15 (2008)
- Howard D.H., Weitzman I., Padhye A.A.: *Onygenales Arthrodermataceae* (w) Pathogenic Fungi in humans and Animals, red. D.H. Howard (.), Marcel Dekker Inc, New York, 2002, s. 141–194
- Hubka V., Dobiašova S., Dobiaš R., Kolařík M.: *Microsporum aenygmaticum* sp. nov. from *M. gypseum* complex, isolated as a cause of *Tinea corporis*. *Med. Mycol.* **52**, 387–396 (2014)

30. Jennessen J., Schnu J., Rer A., Olsson J., Samson R.A., Dijksterhuis J.: Morphological characteristics of sporangiospores of the temperate fungus *Rhizopus oligosporus* differentiate it from other taxa of the *R. microsporus* group. *Mycol. Res.* **112**, 547–563 (2008)
31. Kano R., Yoshida E., Yaguchi T., Hubka V., Anzawa K., Mochizuki T., Hasegawa A., Kamata H.: Mating type gene (MAT1-2) of *Trichophyton verrucosum*. *Mycopathologia*, **177**, 87–90 (2014)
32. Krzyściak P., Skóra M., Macura A.B.: Atlas grzybów chorobotwórczych człowieka. Medpharm Polska, Wrocław, 2011: 266–297
33. Leclerc M.C., Philippe H., Guého E.: Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. *J. Med. Vet. Mycol.* **32**, 331–341 (1994)
34. Macura A.B.: Dermatophytes, pathogens or saprophytes. *Int. J. Derm.* **34**, 529–539 (1995)
35. Makimura K., Tamura Y., Mochizuki T., Hasegawa A., Tajiri Y., Hanazawa R., Uchida K., Saito H., Yamaguchi H.: Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal Internal Transcribed Spacer 1 regions. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 920–924 (1999)
36. Martinez D.A., Oliver B.G., Gräser Y., Goldberg J.M., Li W., Martinez-Rossi N.M., Monod M., Shelest E., Barton R.C., Birch E. i wsp.: Comparative genome analysis of *Trichophyton rubrum* and related dermatophytes reveals candidate genes involved in infection. *MBio*, **3**, e00259-12 (2012)
37. Mercer D.K., Stewart C.S.: Keratin hydrolysis by dermatophytes. *Med. Mycol.* DOI: 10.1093/mmy/myx160 (2018)
38. Mirhendi H., Makimura K., de Hoog G.S., Rezaei-Matehkolaei A., Najafzadeh M.J., Umeda Y., Ahmadi B.: Translation elongation factor 1- α gene as a potential taxonomic and identification marker in dermatophytes. *Med. Mycol.* **53**, 215–224 (2015)
39. Mochizuki T., Takeda K., Anzawa K.: Molecular markers useful for epidemiology of dermatophytes. *J. Dermatol.* **42**, 232–235 (2015)
40. Moriello K.A., Deboer D.J.: Fungal flora of the coat of pet cats. *Am. J. Vet. Res.* **52**, 602–606 (1991)
41. Negroni R., Bonvehi P., Arechavala A.: Historia y descripción de *Microsporum fulvum*, una especie válida del género descubierta en la República Argentina. *Rev. Argentina Microbiol.* **40**, 47 (2008)
42. Neji S., Trabels H., Hadrich I., Cheikhrouhou F., Sellami H., Makni F., Ayadi A.: Molecular characterization of strains of the *Trichophyton verrucosum* complex from Tunisia. *Med. Mycol.* **54**, 787–793 (2016)
43. Nenoff P., Herrmann J., Gräser Y.: *Trichophyton mentagrophytes sive interdigitale?* A dermatophyte in the course of time. *J. Deutsch. Dermatol. Ges.* **5**, 198–202 (2007)
44. Nenoff P., Krüger C., Ginter-Hanselmayer G., Tietz, H.: Mycology – an update. Part 1: Dermatophytes: Causative agents, epidemiology and pathogenesis. *JDDG: J. Deutsch. Dermatol. Ges.* **12**, 188–210 (2014)
45. Nweze E.I.: Dermatophytoses in domesticated animals. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, **53**, 95–99 (2011)
46. Ovren E., Berglun L., Nordlind K., Rollman O.: Dermatophytosis: fluorostaining enhances speed and sensitivity in direct microscopy of skin, nail and hair specimens from dermatology outpatients. *Mycoses*, **59**, 436–441 (2016)
47. Pchelin I.M., Zlatogursky V.V., Rudneva M.V., Chilina G.A., Rezaei-Matehkolaei A., Lavnikovich D.M., Vasilyeva N.V., Taraskina A.E.: Reconstruction of phylogenetic relationships in dermatomycete genus *Trichophyton* Malmsten, 1848 based on ribosomal internal transcribed spacer region, partial 28S rRNA and beta-tubulin genes sequences. *Mycoses*, **59**, 566–575 (2016)
48. Rezaei-Matehkolaei A., Mirhendi H., Makimura K., de Hoog G.S., Satoh K., Najafzadeh M.J., Shidfar M.R.: Nucleotide sequence analysis of beta tubulin gene in a wide range of dermatophytes. *Med. Mycol.* **52**, 674–688 (2014)
49. Rippon J.W.: The changing epidemiology and emerging patterns of dermatophyte species. *Curr. Top. Med. Mycol.* **1**, 208–234 (1985)
50. Sabouraud R.J.A.: *Maladies du cuir chevelu. 3^{me} partie: Les teignes.* Masson, Paris, 1910, 988 pp
51. Seeliger H.P.R.: The discovery of *Achorion schoenleinii*. *Mykosen*. **28**, 161–182 (1985).
52. Stockdale P.M.: *Nannizzia incurvata* gen. nov., sp. nov., a perfect state of *Microsporum gypseum* (Bodin) Guiart et Grigorakis. *Sabouraudia*, **1**, 41–48 (1961)
53. Stockdale P.M.: Sexual stimulation between *Arthroderma simii* Stockd., Mackenzie and Austwick and related species. *Sabouraudia*, **6**, 176–181 (1968).
54. Subelj M., Marinko J.S., Učakar V.: An outbreak of *Microsporum canis* in two elementary schools in a rural area around the capital city of Slovenia, 2012. *Epidemiol Infect.* **142**, 2662–2666 (2014).
55. Summerbell R.C.: Form and function in the evolution of dermatophytes. *Revta. Iberoam. Micol.* **17**, 30–43 (2000)
56. Symoens F., Jousson O., Packeu A., Fratti M., Staib P., Mignon B., Monod M.: The dermatophyte species *Arthroderma benhamiae*: intraspecific variability and mating behavior. *J Med Microbiol.* **62**, 377–385 (2013)
57. Symoens F., Jousson O., Planard C., Fratti M., Staib P., Mignon B., Monod M.: Molecular analysis and mating behaviour of the *Trichophyton mentagrophytes* species complex. *Int. J. Med. Microbiol.* **301**, 260–266 (2011)
58. Takashio M.: Une nouvelle forme sexuée du complexe *Trichophyton mentagrophytes*, *Arthroderma vanbreuseghemii*. *Annals Parasit.* **48**, 713–372 (1973)
59. Weitzman I., Salkin I.F., Rosenthal R.A.: Evaluation of *Trichophyton* agars for identification of *Trichophyton soudanense*. *J. Clin. Microbiol.* **18**, 203–205 (1983)
60. Weitzman I., Summerbell R.C.: The dermatophytes. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**, 240–259 (1995)
61. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W.: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics (w) PCR protocols: a guide to methods and applications, red. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White, New York Academic Press Inc; 2007, s. 315–322
62. Woudenberg J.H.C., Groenewald J.Z., Binder M., Crous P.W.: *Alternaria* redefined. *Stud. Mycol.* **75**, 171–212 (2013)
63. Wu Y., Yang Z., Yang F., Liu T., Leng W., Chu Y.: Recent dermatophyte divergence revealed by comparative and phylogenetic analysis of mitochondrial genomes. *BMC Genomics*, **10**, 238 (2009)
64. Zhan P., Liu W.: The changing face of dermatophytic infections worldwide. *Mycopathologia*, **182**, 77–86 (2017)
65. Ziółkowska G., Wawrzekiewicz K. Screening of the enzymatic activity of *Microsporum canis* field strains. *Annales UMCS Sect D.* **L**, 11–20 (1995)
66. Ziółkowska G., Nowakiewicz A., Gnat S., Trościańczyk A., Majer-Dziedzic B., Zięba P.: Molecular identification and classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strains isolated from humans and selected animal species. *Mycoses*, **58**, 118–126 (2015)

MIKROBIOM RYZOSFERY I JEGO KORZYSTNY WPŁYW NA ROŚLINY – AKTUALNA WIEDZA I PERSPEKTYWY

Małgorzata Woźniak*, Anna Gałązka

Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy

Wpłynęło we wrześniu, zaakceptowano w listopadzie 2018 r.

Streszczenie: System korzeniowy roślin działa jak fabryka, która produkuje ogromną ilość związków chemicznych, aby skutecznie komunikować się z otaczającymi go/ją mikroorganizmami. Jednocześnie mikroorganizmy mogą wykorzystywać te związki jako źródło energii. Różnorodność drobnoustrojów związanych z korzeniami roślin jest ogromna, rzędu dziesiątek tysięcy gatunków. Tę złożoną społeczność drobnoustrojów, nazywany również drugim genomem rośliny, który ma zasadnicze znaczenie dla zdrowia i produktywności roślin. W ciągu ostatnich kilku lat nastąpił znaczny postęp w zakresie badań dotyczących struktury mikrobiomów ryzosfery i ich dynamiki. Udowodniono, że rośliny kształtują skład mikroorganizmów poprzez syntezę wydzielin korzeniowych. Natomiast drobnoustroje odgrywają kluczową rolę w funkcjonowaniu roślin poprzez pozytywne oddziaływanie na ich wzrost i rozwój. Ogólnie, mikroorganizmy ryzosferowe promują wzrost roślin bezpośrednio poprzez udostępnianie roślinom składników mineralnych m.in. azotu i fosforu oraz syntetyzowanie regulatorów wzrostu. Natomiast pośrednio poprzez hamowanie rozwoju różnych patogenów roślin.

1. Wstęp. 2. Funkcje mikroorganizmów ryzosferowych. 3. Mikroorganizmy zwiększające dostępność składników mineralnych. 4. Mikroorganizmy syntetyzujące regulatory wzrostu roślin. 5. Biologiczna ochrona roślin. 6. Podsumowanie

THE RHIZOSPHERE MICROBIOME AND ITS BENEFICIAL EFFECTS ON PLANTS – CURRENT KNOWLEDGE AND PERSPECTIVES

Abstract: The root system of a plant works like a factory that produces a huge amount of chemicals to communicate effectively with the microorganisms around it. At the same time, micro-organisms can use these compounds as an energy source. The variety of microorganisms associated with plant roots is enormous, amounting to tens of thousands of species. This complex microbial community, also called the second plant genome, is essential for plant health and productivity. Over the last few years, there has been significant progress in research into the structure and dynamics of the microbial sphere of the rhizosphere. It has been proven that plants shape the composition of microorganisms by synthesizing root secretions. On the other hand, microorganisms play a key role in the functioning of plants through their positive impact on their growth and development. In general, rhizosphere microorganisms promote plant growth directly by providing plants with minerals such as nitrogen and phosphorus and by synthesizing growth regulators, and indirectly, however, by inhibiting the development of various plant pathogens.

1. Introduction. 2. Functions of rhizosphere microorganisms. 3. Microorganisms increasing the availability of minerals. 4. Microorganisms synthesizing plant growth regulators. 5. Biological plant protection. 6. Summary

Słowa kluczowe: mikrobiom, promowanie wzrostu roślin, ryzosfera
Key words: mikrobiom, promoting plant growth, rhizosphere

1. Wprowadzenie

Rośliny to organizmy wielokomórkowe, które pod wpływem przemian metabolicznych, stale ulegają procesowi wzrostu i rozwoju. Jako organizmy autotroficzne, rośliny odgrywają ważną rolę w podtrzymywaniu wszystkich innych form życia. W rozwijającej się roślinie możemy zdefiniować co najmniej trzy główne części: (1) korzeń, rosnący zwykle pod powierzchnią gleby, który odgrywa ważną rolę w pobieraniu wody i składników pokarmowych, (2) łodyga, której podstawową funkcją jest transport wody i składników odżywczych, a także podtrzymywanie liści i innych organów, oraz (3) pęd, który wytwarza liście, kwiaty

i owoce, umożliwia efektywne odżywianie rośliny poprzez fotosyntezę jak również odpowiada za proces rozmnażania [48, 63]. Rośliny są skolonizowane przez nadzwyczaj wysoką liczbę (mikro)organizmów, które mogą osiągnąć gęstość komórek znacznie większą niż liczba komórek samej rośliny. Ponadto, liczba genów mikroorganizmów zasiedlających ryzosferę znacznie przewyższa liczbę genów roślinnych. Rośliny funkcjonują jako łącznik pomiędzy społecznościami mikroorganizmów, owadów i innych zwierząt bezkręgowych i kręgowych występujących zarówno nad jak i pod powierzchnią gleby [10, 54, 64]. W środowisku naturalnym czynniki abiotyczne i biotyczne mają pośredni lub bezpośredni wpływ na rośliny. Przykładowo, atak

* Autor korespondencyjny: Małgorzata Woźniak, Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy; tel. 81 4786960; e-mail: m.wozniak@iung.pulawy.pl

ze strony różnych organizmów np. owadów prowadzi do zmniejszenia powierzchni liścia, a zatem do ograniczenia potencjału fotosyntezy. Konsekwencją tego procesu może być modyfikacja wydzielin korzeniowych, oddziałujących na mikroorganizmy glebowe. Ponadto, stosowanie środków ochrony roślin i pestycydów może zmienić stężenie i rodzaj metabolitów wtórnych syntetyzowanych w pędach i korzeniach roślin i wpływać negatywnie na interakcje roślin z niepatogennymi mikroorganizmami glebowymi [64]. Rozległa komunikacja pomiędzy roślinami i mikroorganizmami odbywa się na różnych etapach rozwoju roślin, w których ważną rolę odgrywają cząsteczki sygnalizacyjne obu partnerów. Cząsteczki sygnałowe produkowane przez bakterie i grzyby biorą udział w zainicjowaniu kolonizacji rośliny. Natomiast rośliny rozpoznają związki pochodzące od mikroorganizmów i dostosowują swoją odpowiedź w zależności od rodzaju napotkanego drobnoustroju i metabolitu. Ten chemiczny dialog określa ostateczny wynik relacji pomiędzy rośliną i mikroorganizmami [4]. Praktycznie wszystkie tkanki roślin mogą być zasiedlane przez mikroorganizmy. Badania koncentrują się głównie na ryzosferze, fylosferze i endosferze. Ryzosfera jest obszarem wzbogaconym w składniki odżywcze pochodzące ze słuzu roślinnego i wydzielin korzeniowych oraz charakteryzuje się występowaniem licznych i aktywnych metabolicznie drobnoustrojów [38, 90]. Natomiast fylosfera jest stosunkowo uboga w składniki odżywcze i podlega ekstremalnym temperaturom, promieniowaniu i wilgoci [90, 95]. Mikroorganizmy obecne w ryzosferze i fylosferze to epifity (występują w pobliżu lub na tkankach roślin), podczas gdy drobnoustroje znajdujące się wewnątrz tkanek roślin, czy to w liściach, korzeniach czy łodygach, nazywane są endofitami [71, 90].

Mikroorganizmy odgrywają kluczową rolę w prawidłowym przebiegu większości procesów zachodzących na Ziemi. Mikrobiom roślinny wpływa na żywotność roślin w związku z czym stanowi jeden z głównych wskaźników produktywności roślin [9, 90]. Kompleksowe badania dotyczące mikrobiomu roślinnego mogą przyczynić się do zmniejszenia częstości występowania chorób roślin, zwiększenia produkcji rolnej i zmniejszenia ilości stosowanych preparatów chemicznych [6, 90, 98]. Znaczna większość aktywnych metabolicznie mikroorganizmów jest niezdolna do wzrostu na podłożach agarowych. Klasyczne techniki oparte na hodowli mikroorganizmów pozwalają szczegółowo badać wyizolowane drobnoustroje, a techniki molekularne, takie jak metagenomika/metatranskryptomika umożliwiają identyfikację populacji mikroorganizmów. Również tych określanych jako niehodowalne [26, 49, 51, 98]. W badaniach dotyczących mikroorganizmów prokariotycznych powszechnie stosowana jest amplifikacja genu 16S rRNA. Sekwencjonowanie regionów zmien-

nych tego genu umożliwia identyfikację taksonomiczną na poziomie rodzaju, a nawet na poziomie gatunku. W celu identyfikacji drobnoustrojów eukariotycznych, takich jak grzyby, wykorzystywany jest gen 18S rRNA, a także region ITS. Technologia sekwencjonowania metagenomowego stała się powszechnie stosowanym narzędziem biologii molekularnej, umożliwiającym identyfikację tysięcy do milionów sekwencji w jednej próbce środowiskowej, ujawniając bogactwo nawet rzadkich gatunków drobnoustrojów [49, 56, 60, 90, 98].

Gleba jest układem wysoce złożonym pod względem liczebności i różnorodności interakcji pomiędzy jej składnikami fizycznymi, chemicznymi i biologicznymi [8, 12]. Funkcje gleby w dużej mierze zależą od mikroorganizmów, które stanowią komponent dla podstawowych procesów metabolicznych zachodzących w środowisku glebowym [57]. Liczne dane literaturowe wskazują, że wiele, drobnoustrojów glebowych oddziałuje z korzeniami roślin i składnikami gleby na granicy korzeń–gleba [8]. Wydzieliny korzeniowe i rozkładające się resztki roślinne są głównym źródłem węgla dla heterotroficznych mikroorganizmów oraz wyznacznikiem funkcji ryzosfery [8, 60]. Z kolei aktywne mikroorganizmy ryzosferowe i ich metabolity wpływają na strukturę systemu korzeniowego poprzez modyfikację jakości i ilości wydzielin korzeniowych (substancji bioaktywnych roślin) [8, 56, 90]. W ryzosferze możemy wyróżnić trzy oddziałujące ze sobą komponenty: ryzosferę, ryzoplantę i korzeń. Ryzosfera to obszar gleby, który znajduje się w pobliżu powierzchni korzenia i który jest pod wpływem wydzielin korzeniowych roślin. Ryzoplanta to zewnętrzna powierzchnia korzenia wraz ze ściśle przylegającymi do niej cząstkami gleby. Natomiast korzeń jest częścią rośliny, która utrzymuje ją w podłożu i odpowiedzialna jest za dostarczanie wody i soli mineralnych [8, 56, 60, 90].

2. Funkcje mikroorganizmów ryzosferowych

Mikroorganizmy obecne w ryzosferze odgrywają ważną rolę w kształtowaniu gospodarza roślinnego. Niektóre z nich wykazują korzystny wpływ na wzrost i rozwój roślin np. bakterie wiążące azot atmosferyczny, grzyby mykoryzowe czy ryzobakterie promujące wzrost roślin (PGPR – Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). Mikroorganizmy, te nawiązują z roślinami symbiozę opartą na obustronnej korzyści (mutualizm). Następną grupą to mikroorganizmy, które są szkodliwe dla roślin: patogenne grzyby, łęgniowce (oomycota), bakterie i nicienie. Negatywne interakcje między florą bakteryjną a roślinami są przyczyną wielu chorób ważnych gospodarczo upraw na całym świecie. Do najważniejszych patogenów korzeni zaliczmy *Agrobacterium tumefaciens*, *Ralstonia solanacearum*, *Dickeya dadanthi*,

Dickeya solani, *Pectobacterium carotovorum* i *Pectobacterium atrosepticum* [36, 54, 71]. W ostatnim czasie w literaturze pojawiło się wiele informacji opisujących trzecią grupę mikroorganizmów występujących w ryzosferze, a mianowicie patogenów ludzkich [30, 54, 91].

Ryzosfera jest zamieszkała przez różnorodne mikroorganizmy, a bakterie zasiedlające to siedlisko nazywane są ryzobakteriami [42, 43]. Pod koniec lat 70. XX wieku Kloepper i Schroth wprowadzili termin PGPR aby opisać bakterie, które kolonizują korzenie roślin i posiadają zdolność do stymulacji wzrostu roślin [44]. Ryzosferowe bakterie PGPR powinny charakteryzować się (1) zdolnością kolonizacji strefy korzeniowej roślin, (2) zdolnością do przeżycia i rozmnażania się w obecności mikroorganizmów oddziałujących konkurencyjnie, przynajmniej przez czas potrzebny do ujawnienia swoich korzystnych działań na rzecz promocji i ochrony roślin, (3) aktywnością promowania wzrostu roślin [8]. Ogólnie korzystne dla roślin interakcje z mikroorganizmami podzielone zostały na trzy kategorie. Pierwsza kategoria obejmuje mikroorganizmy, które są odpowiedzialne za odżywienie roślin tj. mikroorganizmy, które zwiększają dostępność składników mineralnych. Druga grupa drobnoustrojów to mikroorganizmy odpowiedzialne za bezpośredni wpływ na promowanie wzrostu roślin poprzez produkcję np. fitohormonów. Natomiast trzecia grupa mikroorganizmów stymuluje wzrost roślin pośrednio poprzez hamowanie aktywności mikroorganizmów wykazujących działanie patogenne. Takie oddziaływanie określane jest jako biologiczna ochrona roślin [60, 97]. Większość mikroorganizmów PGPR stymuluje wzrost roślin opierając się na kombinacji dwóch lub większej liczby mechanizmów promujących wzrost roślin [14, 56]. Ponadto, niektóre PGPR mogą wpływać na wzrost i rozwój roślin poprzez synergistyczny efekt koinokulacji. Przykładowo Tilak i wsp. [88] testowali koinokulacyjne szczepienie bakteriami *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus* ze szczepami bakterii z rodzaju *Rhizobium* na nikli indyjskiej (*Cajanus cajan* L). Podwójne szczepienie spowodowało znaczny wzrost roślin, aktywności nitrogenazy i liczby tworzonych brodawek w porównaniu z roślinami kontrolnymi.

Obecnie obserwujemy rosnące zainteresowanie bakteriami posiadającymi zdolność stymulowania wzrostu i odżywiania roślin, co odzwierciedla się w szybko rosnącej liczbie publikacji naukowych na ten temat. Badania obejmują coraz szerszy zakres gatunków roślin, nowe techniki identyfikacji mikroorganizmów oraz analizy mechanizmów ich działania. Różne szczepy bakterii i grzybów zostały z powodzeniem wykorzystane do inokulacji roślin. Obejmują one m.in. bakterie z rodzaju: *Azospirillum* [13], *Bacillus* [58], *Pseudomonas* [67], *Rhizobium* [28], *Serratia* [20], *Stenotrophomonas* [81], i *Streptomyces* [18]. Grzyby posiadające naturalną

zdolność do stymulowania różnych cech roślin związanych z ich wzrostem (PGPF – Plant Growth-Promoting Fungi) obejmują m.in. gatunki z rodzaju *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Piriformospora*, *Phoma* i *Rhizoctonia* [32, 33, 80].

3. Mikroorganizmy zwiększające dostępność składników mineralnych

Większość gatunków ryzobakterii to organotrofy, które uzyskują energię z asymilacji związków organicznych. Ograniczone zasoby związków organicznych i węgla w większości gleb, są najczęstszym czynnikiem hamującym wzrost bakterii glebowych. Mikroorganizmy ryzosferowe odgrywają zasadniczą rolę w uwalnianiu kationów odżywczych z minerałów glebowych, które wykorzystują nie tylko do własnego żywienia ale także do żywienia roślin [1, 54].

Jednym z najbardziej znanych przykładów promowania wzrostu roślin jest proces biologicznego wiązania azotu (BNF – Biological Nitrogen Fixation). Spośród wszystkich znanych na świecie pierwiastków, rośliny najsilniej reagują na deficyt azotu w glebie. Warunkuje on prawidłowy rozwój części podziemnych i nadziemnych roślin. Pula azotu występującego w atmosferze jest niedostępna dla roślin. Ponadto intensywne stosowanie nawozów sztucznych w uprawach rolniczych doprowadziło do rosnącej kumulacji szkodliwych azotanów w glebach i wodach oraz tlenków azotu w atmosferze. W związku ze zwiększeniem efektywności wykorzystania nawozów azotowych, należy priorytetowo potraktować proces biologicznego wiązania azotu. Symbiotyczne wiązanie N_2 jest powszechnie znanym procesem, w którym bakterie posiadające kompleks enzymatyczny – nitrogenazę, redukują atmosferyczny N_2 do amoniaku w brodawkach korzeni roślin bobowatych [1, 8, 50, 52, 56, 90]. Bakterie odpowiedzialne za ten proces należą m.in. do rodzaju *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* i *Azorhizobium*, wspólnie określanymi jako ryzobia. Bakterie te oddziałują z korzeniami roślin bobowatych prowadząc do nawiązania efektywnej symbiozy. Inną grupą mikroorganizmów są bakterie wiążące azot w stanie asymbiotycznym (wolnym) np. *Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp., *Azomonas* sp. czy *Bacillus* sp. Promieniowce z rodzaju *Frankia* także posiadają zdolność wiązania azotu atmosferycznego poprzez tworzenie na korzeniach roślin drzewiastych m.in. olszy (*Alnus* Mill.) specyficznej symbiozy zwanej aktinoryzą [8, 50]. Inną grupą mikroorganizmów, które pozytywnie wpływają na żyzności gleby poprzez nawiązanie symbiozy i wiązanie azotu atmosferycznego są cyjanobakterie – grupa fotosyntetycznych prokariotów (Cyanobacteria; Blue-Green Algae – BGA). Poza udostępnianiem azotu roślinom, wpływają także

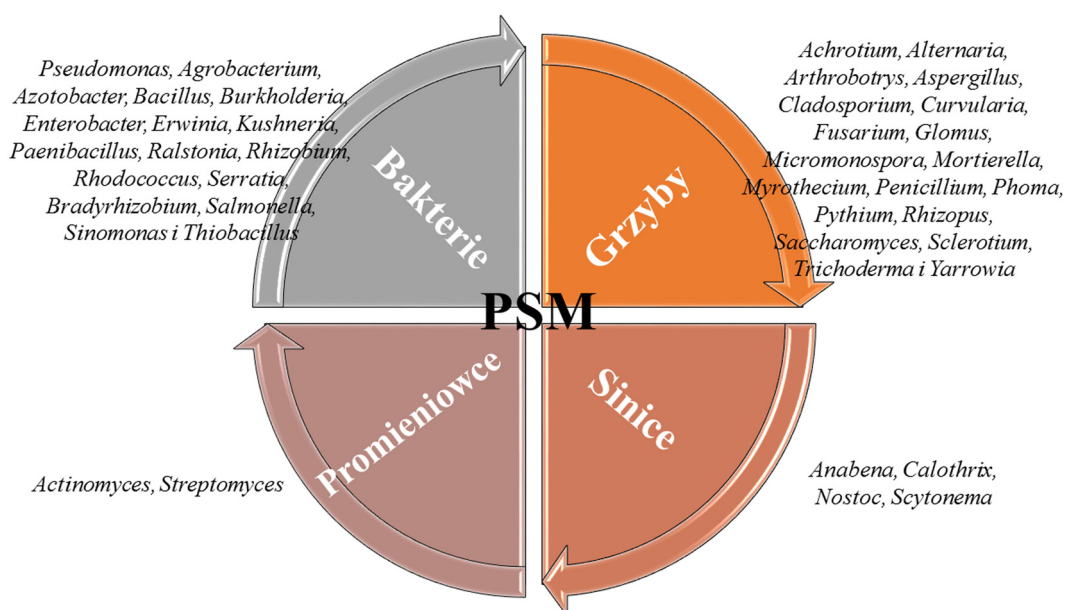
na agregację cząstek gleby, a tym samym na utrzymanie wilgoci i zapobieganie erozji [77].

Kolejny typ symbiozy występujący w ryzosferze to mykoryza – mutualistyczna symbioza grzybów z korzeniami większości roślin. Najbardziej rozpowszechnionym typem tej symbiozy jest mykoryza arbuskularna (AM – Arbuscular Mycorrhiza). Grzyby AM początkowo zaliczane były do gromady *Glomales* i *Zygomycota* [70], ale obecnie przyporządkowane są do gromady *Glomeromycota* [76]. Obecność mykoryzy arbuskularnej wpływa pozytywnie na kondycję roślin m.in. poprzez zwiększenie powierzchni chłonnej korzeni, co umożliwia roślinom lepszy dostęp do wody i substancji mineralnych szczególnie tych, których formy jonowe wykazują słabą mobilność lub tych, które występują w niskich stężeniach w glebie. Wyniki licznych badań wskazują, że rośliny skolonizowane przez grzyby mykoryzy arbuskularnej wykazują większą odporność na czynniki stresu środowiskowego i stresu biotycznego [8].

Fosfor (P) to drugi ważny czynnik ograniczający wzrost roślin [40, 52]. Odgrywa istotną rolę praktycznie we wszystkich procesach metabolicznych roślin, w tym fotosyntezie, transferze energii, transdukcji sygnału, biosyntezie makrocząsteczek i oddychaniu [3, 41, 78]. Średnio, zawartość fosforu w glebie wynosi około 0,05% (w/w), jednak tylko 0,1% tego fosforu jest dostępna dla roślin [3, 99]. Niedobór fosforu glebowego jest często uzupełniany poprzez stosowanie nawozów fosforowych. Jednak większość zastosowanego fosforu w formie nawozów nie jest dostępna dla roślin, a stosowanie ich w nadmiernych ilościach może doprowadzić do problemów środowiskowych, takich jak skażenie wód gruntowych, eutrofizacja zbiorników wodnych i utrata

żyźności gleby [37]. Skuteczność stosowanych nawozów fosforowych w postaci chemicznej rzadko przekracza 30% ze względu na ich utrwalenie, albo w postaci fosforanu żelaza/glinu w glebach kwaśnych [61] albo w postaci fosforanu wapnia w glebach obojętnych do zasadowych [47]. W środowisku naturalnym liczne mikroorganizmy występujące w glebie i ryzosferze skutecznie uwalniają fosfor z jego nierozpuszczalnych form dzięki solubilizacji i mineralizacji [3, 11, 52, 78]. Ta grupa drobnoustrojów określana jest jako mikroorganizmy rozpuszczające fosfor (PSM – Phosphate Solubilizing Microorganisms) (Ryc. 1). Produktami metabolizmu tych mikroorganizmów są między innymi kwasy organiczne takie jak glukonowy, cytrynowy, mlekowy, propionowy i bursztynowy, postrzegane jako główny czynnik odpowiedzialny za udostępnianie fosforu. Duża liczba drobnoustrojów, w tym bakterie, grzyby, promieniowce i sinice, wykazuje zdolność do rozpuszczania i mineralizacji związków fosforu.

Mikroorganizmy ryzosferowe mogą również ułatwiać pobieranie pierwiastków śladowych, takich jak żelazo (Fe) [2, 25, 52]. Żelazo jest niezbędnym składnikiem odżywczym dla prawie wszystkich form życia. Żelazo obficie występuje w glebie, ale w postaci, która jest niedostępna dla drobnoustrojów i roślin, a mianowicie Fe^{3+} . Wiele mikroorganizmów wykształciło specyficzne systemy i nośniki jonów żelaza – siderofory. Siderofory są związkami organicznymi o niskiej masie cząsteczkowej, które umożliwiają uzyskiwanie żelaza z trudno rozpuszczalnych substratów oraz ze środowisk o niskich stężeniach żelaza. Zarówno w przypadku bakterii Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich, żelazo (Fe^{3+}) jest wychwytywane przez



Ryc. 1. Bioróżnorodność PSM
Opracowanie własne na podstawie [3, 78].

siederofory i w takim kompleksie w błonie bakteryjnej następuję redukcja do jonów Fe^{2+} , które są następnie uwalniane do komórki za pomocą mechanizmu transportu aktywnego [1, 2]. W ostatnich latach sideroforum poświęca się coraz więcej uwagi ze względu na ich potencjalną rolę i zastosowanie w różnych obszarach badań środowiskowych. Siderofory mikrobiologiczne pełnią ważną rolę w bioremediacji, kontroli biologicznej, wietrzeniu minerałów glebowych i promowaniu wzrostu roślin. Badania Qi i Zhao [100] potwierdzają, że siderofory wytwarzane przez *Trichoderma asperellum* stymulują wzrost i odporność ogórka (*Cucumis sativus*) w warunkach stresu solnego. Siderofory są niezwykle skuteczne w solubilizacji i zwiększeniu mobilności szerokiego zakresu metali, które mogą stanowić zagrożenie dla środowiska np. Al, Cd, Cu, Ga, In, Pb i Zn, jak również pierwiastków promieniotwórczych w tym U (uran) i Np (neptun) [68, 74]. Proces ten zależy głównie od funkcjonalności ligandu, co oznacza, że siderofory mogą mieć silne powinowactwo do konkretnego metalu innego niż żelazo [59]. W ostatnich latach wzrosło także zainteresowanie badaniami potencjału sideroforów w bioremediacji. Hong i współpracownicy [31] donoszą o sideroforach produkowanych przez *Fusarium solani*, które przyczyniły się do solubilizacji Cu i Zn *in vitro*. Poza tym, wykazano, że siderofory produkowane przez *Agrobacterium radiobacter* przyczyniają się do zmniejszenia zawartości As w glebie w przybliżeniu o 54% [96]. Siderofory mikrobiologiczne mogą odgrywać ważną rolę w remediacji węglowodorów ropopochodnych ze środowisk morskich [17]. Petrobaktyna to pierwszy strukturalnie scharakteryzowany siderofor wytwarzany przez morską bakterię *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, który degraduje ropę naftową [7]. Hickford i wsp. [29] badali inny siderofor o nazwie sulfonian petrobaktyny (wyizolowany także z tej samej morskiej bakterii), który również rozkłada ropę naftową. Obecność sideroforów w pobliżu korzeni roślin może chronić je przed wieloma patogenami, poprzez wiązanie w chelaty wszystkich dostępnych form żelaza i niedostępnianie go organizmom patogennym. Niektóre siderofory (piowerdyny) produkowane przez fluoryzujące bakterie z rodzaju *Pseudomonas* mogą być wyjątkowo skutecznym narzędziem hamowania wzrostu fitopatogenów, ponieważ wykazują wysokie powinowactwo do jonów żelaza (III). Przykładowo, piowerdyna zaangażowana jest w kontrolę biologiczną choroby więdnięcia ziemniaka wywołanej przez *Fusarium oxysporum*, a także ograniczenie wzrostu fitopatogenów w orzeszkach ziemnych i kukurydzy [2]. Ponadto, piowerdyna stosowana jest jako probiotyk w hodowli ryb, ponieważ hamuje wzrost kilku patogenów ryb: *Vibrio anguillarum*, *Vibrio ordalii*, *Aeromonas salmonicida*, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus iniae*, *Flavobacterium psychrophilum* [21]. Należy zaznaczyć,

że siderofory znalazły zastosowanie także w ekologii i taksonomii mikroorganizmów. Siderotypowanie definiuje się jako metodę charakterystyki i identyfikacji drobnoustrojów według typów produkowanych przez nie sideroforów [2]. Piowerdyna to typowa dla szczepów bakterii z rodzaju *Pseudomonas* grupa sideroforów. Obecnie znanych jest, co najmniej 50 cząsteczek piowerdyn o różnych sekwencjach łańcucha peptydowego. Zmienność w obrębie peptydu jest wykorzystana do określenia pokrewieństwa pomiędzy bakteriami z rodzaju *Pseudomonas* [55]. Ponadto, siderofory mogą być używane jako znaczniki chemotaksonomiczne do identyfikacji innych rodzajów bakterii, takich jak *Burkholderia* sp. i *Mycobacterium* sp. [2]. Podsumowując, siderotypowanie może stać się potężnym narzędziem w badaniach środowiskowych, ułatwiającym skuteczną i szybką identyfikację drobnoustrojów [55].

4. Mikroorganizmy syntetyzujące regulatory wzrostu roślin

Ryzosfera jest stosunkowo bogatym w składniki odżywcze środowiskiem zawierającym aminokwasy, cukry, kwasy tłuszczowe i inne związki organiczne, które przyciągają mikroorganizmy [95]. Z kolei drobnoustroje syntetyzują biologicznie aktywne związki, w tym m.in. fitohormony: auksyny, cytokininy, gibbereliny, ABA (kwas abscysynowy, abscisic acid), witaminy i związki lotne. Te mikrobiologiczne metabolity odgrywają istotną rolę we wzroście, odżywianiu i rozwoju roślin [23, 52, 63]. Termin „hormony roślinne” lub „fitohormony” został ostatecznie wprowadzony przez Thimanna w 1948 r. Wraz z dalszymi badaniami identyfikowano coraz więcej hormonów roślinnych, które określano jako śladowe substancje organiczne syntetyzowane w niektórych częściach rośliny. Hormony roślinne odgrywają znaczącą rolę w rolnictwie, ponieważ uczestniczą w procesie dojrzewania owoców, opadania liści oraz kiełkowaniu nasion [87, 79, 23]. Hormony roślinne znajdują się nie tylko w roślinach wyższych, ale także syntetyzowane są przez bakterie i grzyby. Początkowo hormony roślinne do celów rolniczych były uzyskiwane głównie przez ekstrakcję z tkanek roślinnych. W związku ze zwiększonym zapotrzebowaniem stopniowo wprowadzano syntezę chemiczną. Niemniej jednak, ze względu na stosunkowo złożoną strukturę hormonów roślinnych, synteza chemiczna niesie ze sobą szereg problemów, takich jak wysokie koszty, złożony proces produkcji, niska czystość, itp. W porównaniu z dwoma poprzednimi metodami produkcja mikrobiologiczna jest ekologicznym i zrównoważonym procesem syntezy hormonów roślinnych. Ponadto, końcowe produkty charakteryzują się wyższą aktywnością biologiczną i czystością. Dzięki licznym nowatorskim

narzędziom badawczym, mikrobiologiczna produkcja hormonów roślinnych jest bardziej wydajna i ekonomiczna [79]. Ogólnie, auksyny wpływają na podział i różnicowanie komórek, stymulują kiełkowanie nasion i bulw, zwiększają szybkość tworzenia ksylemów, kontrolują procesy wegetatywnego wzrostu, inicjują tworzenie korzeni, pośredniczą w reakcjach fotosyntezy, syntezy pigmentów i biosyntezy różnych metabolitów [1]. Podaje się, że 80% mikroorganizmów izolowanych z ryzosfery różnych upraw posiada zdolność syntezy i uwalniania auksyn jako metabolitów wtórnych [1, 39, 56]. Na przykład Sorty i wsp. [84] wyizolowali z chwastów halotolerujących (*Psoralea corylifolia* L.) różne grupy bakterii wytwarzających IAA (kwas indolilo-3-octowy; indole-3-acetic acid; auksyna) należących do rodzaju *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* i *Sinorhizobium*. Bakterie z rodzaju *Mycobacterium* wytwarzające IAA stwierdzono w ryzosferze tropikalnego storczyka (*Dendrobium moschatum* Buch.-Ham.) [89], a *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Cellulomonas*, *Mycoplana* i *Rahnella* zidentyfikowano w ryzosferze pszenicy (*Triticum* L.) [23]. Oprócz bezpośredniego wpływu na wzrost i rozwój roślin, auksyny syntetyzowane przez mikroorganizmy pośrednio oddziałują na rośliny poprzez zwiększenie aktywności wiązania azotu atmosferycznego i solubilizacji fosforu, czego przykładem jest bakteria *Sinorhizobium meliloti* 1021, szczep RD64 [34]. Chociaż nie tak intensywnie badane jak auksyny, cytokininy i gibbereliny również stymulują wzrost roślin [23, 56]. Kolejnym ważnym hormonem roślinnym jest etylen. Etylen wpływa na wzrost i rozwój roślin poprzez regulację wielkości i podziału komórek, a pod względem rozwoju poprzez kontrolowanie procesu dojrzewania i starzenia się roślin [75]. Ponadto, etylen został określony jako hormon stresu [1]. W warunkach stresowych, takich jak wysokie zasolenie, susza, metale ciężkie itp. endogenne poziomy etylenu jest znacząco zwiększony, co negatywnie wpływa na całą roślinę i może doprowadzić do zmniejszenia wydajności upraw [1, 11]. Niektóre ryzobakterie promujące wzrost roślin posiadają enzym 1-aminocyklopropano-1-karboksylazę (deaminazę ACC – 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase), który obniża poziom etylenu a tym samym ułatwia wzrost i rozwój roślin w warunkach stresu [1, 27]. Obecnie do bakterii syntetyzujących deaminazę ACC zaliczamy: *Acinetobacter* sp., *Achromobacter* sp., *Agrobacterium* sp., *Alcaligenes* sp., *Azospirillum* sp., *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp., *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Ralstonia* sp., *Serratia* sp., *Rhizobium* sp. itp. [1].

Niektóre bakterie i grzyby ryzosferowe są zdolne do produkcji witamin, zwłaszcza witamin z grupy B, które korzystnie wpływają na wzrost roślin. Rozpuszczalne w wodzie witaminy działają synergistycznie z innymi aktywnymi biologicznie substancjami, stymulując roz-

wój nie tylko roślin ale także drobnoustrojów [35, 53]. Ryzosferowa bakteria *P. fluorescens* 267 syntetyzuje m.in. biotynę, tiaminę, kobalaminę, kwas pantotenowy i niacynę [19]. Marek-Kozaczuk i Skorupska [53] wykazały, że szczepy *P. fluorescens* 267.1 z mutacją w genie syntezy tiaminy i niacyny utraciły zdolność do promowania wzrostu korzeni koniczyny (*Trifolium pratense* L. cv. Ulka). Witaminy z grupy B wytwarzane przez szczep *P. fluorescens* 267 stymulują aktywność wiązania azotu przez symbiotyczne dla koniczyny bakterie – *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, co powoduje zwiększenie ilości świeżej i suchej masy rośliny oraz liczby i wagi brodawek korzeniowych [19].

Według ostatnich badań lotne związki organiczne (VOC – Volatile Organic Compounds) wytwarzane przez promujące wzrost roślin ryzobakterie mają potencjał do kontrolowania patogenów roślinnych, stymulowania wzrostu roślin i wywoływania ogólnoustrojowej oporności na choroby [69, 85]. PGPR lub produkty syntetyzowane przez PGPR zwykle wymagają fizycznego kontaktu z częściami roślin w celu stymulacji wzrostu roślin [86]. Jednak wiele rodzajów bakterii może regulować wzrost roślin z pewnej odległości, bez bezpośredniego kontaktu. Zatem bakterie te wydzielają niewidoczne lotne związki, które promują lub hamują wzrost roślin. Według Lemfack i wsp. [46] istnieje około 350 gatunków bakterii i grzybów wytwarzających ponad 846 różnych VOC. Mikrobiologiczne VOC to cząsteczki sygnałowe charakteryzujące się:

- niską masą cząsteczkową (< 300 g/mol),
- niską temperaturą wrzenia,
- niską polarnośćią,
- naturą lipofilową,
- wysoką prężnością pary (0,01 kPa w 20°C),

Lotne związki organiczne syntetyzowane przez niektóre mikroorganizmy należą m.in. do alkanów, alkenów, alkoholi, estrów, ketonów, terpenoidów i związków siarkowych [24, 45].

Ryu i in. [73] badając szczepy *Bacillus subtilis* GB03 i *B. amyloliquefaciens* IN937a zaobserwowali, że bakterie te produkują lotne związki organiczne wspomagające wzrost roślin: 2,3-butanodiol i acetonę. Ponadto w literaturze odnotowano, że 2-pentylofuran syntetyzowany przez *Bacillus megaterium* XTBG34 stymuluje wzrost rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) [101], a *P. fluorescens* SS1 produkuje 13-tetradekadien-1-ol i 2-butanon i 2-metylo-n-1-trideken, które promują wzrost tytoniu szlachetnego (*Nicotiana tabacum*) [65]. Badania przeprowadzone przez Orozco-Mosqueda i wsp. wykazały, że siewki lucerny (*Medicago truncatula*) będące pod wpływem lotnych substancji produkowanych przez *Arthrobacter agilis* UMCV2 przez 5 dni zwiększyły świeżą masę części nadziemnych i korzenia oraz stężenie chlorofilu odpowiednio o 40%, 35% i 35% [62].

Poza aktywnością wspomagającą wzrost roślin, lotne związki organiczne modulują odpowiedź rośliny na czynniki wywołujące stres. Wykazano, że 2,3-butanodiol znacząco indukuje odporność rzodkiewnika na patogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* [72], podczas gdy 3-pentanol i 2-butanon wykorzystywane są jako czynniki przeciwdziałające namnażaniu *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, będącego patogenem sadzonek ogórka [83].

Najnowsze badania potwierdzają, że VOC wydzielane przez mikroorganizmy mogą być wykorzystywane jako cząsteczki, które znacznie stymulują wzrost roślin. Jednak wciąż istnieje potrzeba przeprowadzenia dodatkowych eksperymentów mających na celu dokładne scharakteryzowanie struktury VOC i mechanizmu ich działania na większej liczbie gatunków roślin w warunkach polowych.

5. Biologiczna ochrona roślin

Baker i Cook w 1974 r. sformułowali podstawy biologicznej ochrony roślin określając ten termin jako wykorzystanie mikroorganizmów żywych do ograniczenia występowania organizmów patogennych [5]. Ryzosfera zapewnia linię obrony korzeni roślin przed atakiem patogenów występujących w glebie. Różne elementy mikrobiomu ryzosfery mogą antagonizować patogeny obecne w glebie zarówno przed jak i w trakcie pierwotnej infekcji jak również podczas wtórnego rozprzestrzeniania się w tkance korzenia. Główne mechanizmy, za pomocą których mikroorganizmy ryzosferowe chronią rośliny przed patogenami dzieli się na bezpośrednie i pośrednie [8, 54, 60].

Bezpośrednie mechanizmy kontroli biologicznej to m.in.

- konkurencja o niszę ekologiczną, a tym samym ograniczenie liczebności populacji organizmów patogennych,
- ograniczenie składników odżywczych wymaganych do wzrostu patogenów, takich jak np. żelazo,
- wytwarzanie składników sygnałowych zakłócających reprodukcję patogenów i ograniczających ich wzrost np. toksyn, antybiotyków, enzymów litycznych, biosurfaktantów,

Pośrednie mechanizmy biokontroli obejmują:

- wzbudzenie indukowanej odporności systemicznej (ISR – Induced Systemic Resistance) i systemicznej odporności nabytej (SAR – Systemic Acquired Resistance),
- stymulowanie dodatkowych organizmów zdolnych do hamowania szkodników lub patogenów [8, 11, 15, 54, 56, 60, 66].

Kolonizacja korzeni skutkuje nie tylko wysoką liczbą populacji PGPR w systemie korzeniowym, ale

także działa jako system dostarczania antagonistycznych metabolitów biorących udział w bezpośrednim hamowaniu patogenów roślin [60]. Wśród związków syntetyzowanych przez PGPR znajdują się m.in.: amoniak, butyrolakton, 2,4-diacetylochlooroglucyna (DAPG), HCN (hydrogen cyanide, cyjanowodór), kwas fenazy-1-karboksylowy, wiskozynamid, kanozamina, oligomycyna A, oomycyna A, ksantobakcyna i piowerdyna i wiele innych [11, 15, 16, 82].

Szczepy bakterii *B. subtilis* syntetyzują wiele odmian silnych metabolitów przeciwgrzybiczych, np. zwittermicynę-A, kanosaminę i lipopeptydy (surfaktyny, ituriny) [60]. Bakterie, takie jak *Burkholderia cepacia* i *Ralstonia solanacearum* hydrolizują kwas fuzariowy, syntetyzowany przez grzyby z rodzaju *Fusarium* będące powszechnie spotykanym patogenem roślin [15]. Kolejną strategią ochronną PGPR jest wytwarzanie enzymów litycznych. Dunne i współpracownicy w roku 2000 wykazali nadprodukcję zewnątrzkomórkowej proteazy w zmutowanych szczepach *Stenotrophomonas maltophilia* W81, co spowodowało poprawę biokontroli *Pythium ultimum* (patogen korzeni wielu roślin uprawnych) [22]. W obecnym badaniu mutageniza transpozonowa Tn 5-764cd w obecności kazeiny spowodowała izolację dwóch mutantów (W81M3 i W81M4), wytwarzających około trzykrotnie więcej pozakomórkowej proteazy niż szczep W81 typu dzikiego. Ponadto mutant W81M4 wykazywał również zwiększoną aktywność chitynolityczną w porównaniu z W81, co również jest użyteczne do biologicznego zwalczania wrażliwych na chitynazy patogenów i pasożytów roślin.

W ryzosferze mikroorganizmy konkurują ze sobą o składniki pokarmowe, źródło węgla i energii [60, 54]. Strategie wykorzystywane przez ryzobakterie to m.in. zdolność do szybkiego wzrostu po napotkaniu substratów oraz zdolność do pozakomórkowej konwersji glukozy do kwasu glukonowego i kwasu 2-ketoglukonowego. Niektóre bakterie, w tym kilka gatunków *Pseudomonas* skutecznie wychwytuje ze środowiska glukozę, następnie przekształca ją do kwasu glukonowego i kwasu 2-ketoglukonowego. W związku z czym i zapewnia sobie przewagę nad mikroorganizmami, które nie mają zdolności wykorzystywania wspomnianych związków [60].

Mikroorganizmy zasiedlające ryzosferę mogą także oddziaływać na owady roślinożerne. Przykładem są badania przeprowadzone przez van de Mortel i wsp. z wykorzystaniem *P. fluorescens* SS101, którego obecność hamowała rozwój *Spodoptera exigua*, będącego owadem żerującym na pomidorze (*Solanum lycopersicum*) [92].

Mikroorganizmy ryzosferowe w relacjach z roślinami aktywują systemiczną odporność nabytą (SAR) oraz biorą udział we wzbudzeniu indukowanej odporności

systemicznej (ISR). Zarówno ISR, jak i SAR wywołują stan zwiększonej odporności rośliny, której towarzyszy synteza związków sygnałowych, takich jak kwas jasmonowy, etylen i kwas salicylowy [60, 66, 93]. Termin „indukowana odporność systemiczna” określa odporność wywołaną przez biotyczne czynniki niechorobotwórcze, natomiast termin „nabyta odporność systemiczna”, dotyczy interakcji roślin z patogenami [66]. Wczesne rozpoznanie zagrożenia przez roślinę natychmiast inicjuje kaskadę sygnałów molekularnych i transkrypcję wielu genów, które ostatecznie prowadzą do produkcji przez roślinę żywicielską cząsteczek obronnych [66, 93]. Do wspomnianych molekuł obronnych zaliczamy fitoaleksyny, białka związane z patogenezą (PR – Pathogenesis-Related), takie jak chitynazy, β -1,3-glukanazy, inhibitory proteinaz oraz ligniny itp. [60, 93]. Verhagen i in. wykazali, że pomidory (*Solanum lycopersicum*) zainokulowane szczepem *P. fluorescens* WCS417r (oznacza, że są ISR-dodatnie), wykazują szybszą i silniejszą indukcję obronną przeciw patogenowi liści *Pseudomonas syringae* [94].

6. Podsumowanie

Liczne dane literaturowe potwierdzają, że mikroorganizmy kolonizujące strefę korzeniową roślin pełnią różnorodne funkcje, przede wszystkim wpływają na promocję wzrostu i rozwoju roślin. Korzenie roślin uwalniają związki będące źródłem energii dla mikroorganizmów. Wysokie stężenie wydzielin korzeniowych w ryzosferze przyciąga aktywne metabolicznie mikroorganizmy, których liczba jest znacznie większa niż w innych częściach gleby. Gatunek roślinny, stadium rozwoju, rodzaj gleby i warunki klimatyczne to główne

czynniki określające skład zbiorowisk mikrobiologicznych ryzosfery. Obawy związane z nadmiernym stosowaniem chemii rolnej sprawiają, że coraz większą popularnością cieszy się rolnictwo ekologiczne propagujące biopreparaty bazujące na mikroorganizmach ryzosferycznych stymulujących wzrost i rozwój roślin. Stosowanie na szeroką skalę PGPR może zmniejszyć globalne wykorzystanie agrochemikaliów i pestycydów. Co więcej, jest to technologia łatwo dostępna dla rolników zarówno w krajach rozwiniętych, jak i rozwijających się. Mikroorganizmy ryzosferowe poza aktywnością promowania wzrostu roślin, prezentują także potencjał bioremediacyjny w stosunku do metali ciężkich i pestycydów, a także uczestniczą w kontrolowaniu szeregu różnych fitopatogenów. Pomimo licznych badań dotyczących interakcji roślin i mikroorganizmów ryzosferycznych, wciąż istnieje potrzeba dokładniejszego zrozumienia podstawowych zasad ekologii ryzosfery, w tym funkcji i różnorodności mikroorganizmów. Zapoznanie się z dynamiką i składem społeczności mikroorganizmów zasiedlających ryzosferę, a także komunikacji z rośliną przyczyni się do efektywnego wykorzystania preparatów mikrobiologicznych na bazie PGPR. Dalsze badania nad mechanizmem fitostymulacji przez PGPR umożliwiłyby opracowanie konsorcjów bakteryjnych, grzybowych i bakteryjno-grzybowych komercyjnie wykorzystywanych w warunkach agroekologicznych.

Poniżej przedstawiono tabelę podsumowującą, w której zaprezentowano przykłady mikroorganizmów ryzosferycznych, które potencjalnie mogą być wykorzystane w preparatach mikrobiologicznych promujących wzrost roślin.

Badania sfinansowano z Tematu Badawczego 1.21 realizowanego w ramach działalności Statutowej IUNG-PIB.

Tabela I
Wybrane rodzaje bakterii i ich właściwości promowania wzrostu i rozwoju roślin

Mikroorganizmy	Właściwości promowania w wzrostu roślin
<i>Pseudomonas</i> sp.	Produkcja: IAA, HCN, NH ₃ , VOC, egzopolisacharydów, sideroforów, deaminazy ACC, cytokinin; solubilizacja fosforu i metali ciężkich; aktywność przeciwgrzybicza
<i>Rhizobium</i> sp.	Produkcja: IAA, HCN, NH ₃ , egzopolisacharydów, sideroforów, cytokinin; solubilizacja fosforu; wiązanie azotu atmosferycznego
<i>Bacillus</i> sp.	Produkcja: IAA, HCN, NH ₃ , VOC, giberelin, cytokinin, sideroforów; solubilizacja fosforu; aktywność przeciwgrzybicza
<i>Azospirillum</i> sp.	Produkcja: IAA, sideroforów; solubilizacja fosforu; wiązanie azotu atmosferycznego; odporność na antybiotyki
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Produkcja: IAA, deaminazy ACC; solubilizacja fosforu; wiązanie azotu atmosferycznego
<i>Klebsiella</i> sp.	Produkcja: IAA, HCN, NH ₃ , egzopolisacharydów, sideroforów; solubilizacja fosforu
<i>Burkholderia</i> sp.	Produkcja: IAA, giberelin, deaminazy ACC, sideroforów; solubilizacja fosforu i metali ciężkich

Na podstawie: [1, 13, 28, 56, 58, 67, 81].

Piśmiennictwo

- Ahemad M., Kibret M.: Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *JKSUS*, **26**, 1–20 (2014)
- Ahmed E., Holmström S.J.: Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microb. Biotechnol.* **7**, 196–208 (2014)
- Alori E.T., Glick B.R., Babalola O.O.: Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Front. Microbiol.* DOI:10.3389/fmicb.2017.00971 (2017)
- Bais H.P., Park S.W., Weir T.L., Callaway R.M., Vivanco J.M.: How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends Plant Sci.* **9**, 26–32 (2004)
- Baker K.F., Cook R.J.: Biological control of plant pathogens. W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1974
- Bakker M.G., Manter D.K., Sheflin A.M., Weir T.L., Vivanco J.M.: Harnessing the rhizosphere microbiome through plant breeding and agricultural management. *Plant Soil*. **360**, 1–13 (2012)
- Barbeau K., Zhang G.P., Live D.H., Butler A.: Petrobactin, a photoreactive siderophore produced by the oil-degrading marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 378–379 (2002)
- Barea J.M., Pozo M.J., Azcon R., Azcon-Aguilar C.: Microbial co-operation in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* **56**, 1761–1778 (2005)
- Berendsen R.L., Pieterse C.M., Bakker P.A.: The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.* **17**, 478–486 (2012)
- Bezemer T.M., van Dam N.M.: Linking above-ground and below ground interactions via induced plant defenses. *Trends Ecol. Evol.* **20**, 617–624 (2005)
- Bhattacharyya P.N., Jha D.K.: Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 1327–1350 (2012)
- Buscot F.: What are soils? (w) Microorganisms in soils: roles in genesis and functions, red. F. Buscot, S. Varma, Springer-Verlag, Heidelberg, 2005, s. 3–18
- Cecagno R., Fritsch T.E., Schrank I.S.: The Plant Growth-Promoting Bacteria *Azospirillum amazonense*: Genomic Versatility and Phytohormone Pathway. *BioMed Research International*, DOI:10.1155/2015/898592 (2015)
- Chatterjee S., Sau G.B., Sinha S., Mukherjee S.K.: Effect of co-inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of amaranth plants. *Arch. Agron. Soil Sci.* **57**, 1–11 (2011)
- Compant S., Duffy B., Nowak J., Clément C., Barka E.A.: Use of plant growth – promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *App. Environ. Microb.* **71**, 4951–4959 (2005)
- Dąbrowska G., Zdziechowska E.: Rola bakterii ryzosferowych w stymulacji procesów wzrostu i rozwoju oraz ochronie roślin przed czynnikami środowiska. *Prog. Plant Prot.* **55**, 498–506 (2015)
- Das N., Chandran P.: Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnol. Res. Int.* **11**, 1–13 (2011)
- de Jesus Sousa J.A., Olivare F. L.: Plant growth promotion by Streptomycetes: ecophysiology, mechanisms and applications. *Chem. Biol. Technol. Agric.* DOI 10.1186/s40538-016-0073-5 (2016)
- Derylo M., Skorupska A.: Enhancement of symbiotic nitrogen fixation by vitaminsecreting fluorescent *Pseudomonas*. *Plant Soil*. **154**, 211–217 (1993)
- Devi K.A., Pandey P., Sharma G.D.: Plant Growth-Promoting Endophyte *Serratia marcescens* AL2-16 Enhances the Growth of *Achyranthes aspera* L., a Medicinal Plant. *HAYATI Journal of Biosciences*, **23**, 173–180 (2016)
- Dimitroglou A., Merrifield D.L., Carnevali O., Picchiatti S., Avella M., Daniels C. Güroy D., Davies S.J.: Microbial manipulations to improve fish health and production – a Mediterranean perspective. *Fish Shellfish Immunol.* **30**, 1–16 (2011)
- Dunne C., Moenne-Loccoz Y., de Bruijn F.J., O’Gara F.: Overproduction of an inducible extracellular serine protease improves biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* strain W81. *Microbiology*, **146**, 2069–2078 (2000)
- Egamberdieva D., Wirth S.J., Alqarawi A.A., Abd-Allah E.F., Hashem A.: Phytohormones and Beneficial Microbes: Essential Components for Plants to Balance Stress and Fitness. *Front. Microbiol.* DOI: 10.3389/fmicb.2017.02104 (2017)
- Fincheira P., Quiroz A.: Microbial volatiles as plant growth inducers. *Microbiol. Res.* **208**, 63–75 (2018)
- Gamit D.A., Tank S.K.: Effect of siderophore producing microorganism on plant growth of *Cajanus cajan* (Pigeon pea). *Int. J. Res. Pure. Appl. Microbiol.* **4**, 20–27 (2014)
- Gilbert J.A., Knight R. i wsp.: The Earth Microbiome Project: meeting report of the “1st EMP meeting on sample selection and acquisition” at Argonne National Laboratory October 6 2010. *Stand Genomic Sci.* **3**, 249–253 (2010)
- Glick B.R.: Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res.* **169**, 30–39 (2014)
- Gopalakrishnan S., Sathya A., Vijayabharathi R., Varshney R.K., Gowda C.L.L., Krishnamurthy L.: Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech*, **5**, 355–377 (2015)
- Hickford S.J.H., Küpper F.C., Zhang G., Carrano C.J., Blunt J.W., Butler A.: Petrobactin sulfonate, a new siderophore produced by the marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. *J. Nat. Prod.* **67**, 1897– 1899 (2004)
- Holden N., Pritchard L. Toth I.: Colonization out with the colon: plants as an alternative environmental reservoir for human pathogenic enterobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**, 689–703 (2009)
- Hong J.W., Park J.Y., Gadd G.M.: Pyrene degradation and copper and zinc uptake by *Fusarium solani* and *Hypocrea lixii* isolated from petrol station soil. *J. Appl. Microbiol.* **108**, 2030–2040 (2010)
- Hossain M.M., Sultana F., Kubota M., Koyama H., Hyakumachi M.: The plant growth-promoting fungus *Penicillium simplicissimum* GP17-2 induces resistance in *Arabidopsis thaliana* by activation of multiple defense signals. *Plant Cell Physiol.* **48**, 1724–1736 (2007)
- Hossain M.M., Sultana F., Isla S.: Plant Growth-Promoting Fungi (PGPF): Phytostimulation and Induced Systemic Resistance (w) Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives, red. D. Singh, H. Singh, R. Prabha, Springer, Singapore, 2017, s. 135–191
- Imperlini E., Bianco C., Lonardo E., Camerini S., Cermola M., Moschetti G., Defez R., Effects of indole-3-acetic acid on *Sinorhizobium meliloti* survival and symbiotic nitrogen fixation and stem dry weight production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **83**, 727–738 (2009)
- Ivanova E.G., Fedorov D.N., Doronina N.V., Trotsenko Y.A.: Production of vitamine B12 in aerobic methylotrophic bacteria. *Microbiology*, **75**, 494–496 (2006)
- Jankowska M., Śwędryńska D.: Analiza oddziaływań wybranych drobnoustrojów w środowisku glebowym. *Kosmos*, **1**, 49–55 (2016)
- Kang J., Amoozegar A., Hesterberg D., Osmond D.L.: Phosphorus leaching in a sandy soil as affected by organic and composted cattle manure. *Geoderma*, **161**, 194–201 (2011)

38. Kent A.D., Triplett E.W.: Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 211–236 (2002)
39. Khalid A., Arshad M., Zahir Z.A.: Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J. Appl. Microbiol.* **96**, 473–480 (2004)
40. Khan A.A., Jilani G., Akhtar M.S., Naqvi S.M.S., Rasheed M.: Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *J. Agric. Biol. Sci.* **1**, 48–58 (2009)
41. Khan M.S., Zaidi A., Ahemad M., Oves M., Wani P.A.: Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi-current perspective. *Arch. Agron. Soil Sci.* **56**, 73–98 (2010)
42. Kloepper J.W., Zablutowick R.M., Tipping E.M., Lifshitz R.: Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers (w). The rhizosphere and plant growth, red. D.L. Keister, P.B. Cregan, Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1991, s. 315–326
43. Kloepper J.W.: Plant growth-promoting rhizobacteria (other systems) (w) Azospirillum/plant associations, red. Y. Okon, CRC Press, Boca Raton, 1994 s. 111–118
44. Kloepper J.W., Schroth M.N.: Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes (w) Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, vol. 2. Station de Pathologie Vegetale et Phytobacteriologie, INRA, Angers, 1978 s. 879–882
45. Korpi A., Järnberg J., Pasanen A.L.: Microbial volatile organic compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* **39**, 139–193 (2009)
46. Lemfack M.C., Nickel J., Dunkel M., Preissner R., Piechulla B.: mVOC: adatabase of microbial volatiles. *Nucleic Acid Res.* **42**, DOI: 10.1093/nar/gkt1250 (2014)
47. Lindsay W.L., Vlek P.L.G., Chien S.H.: Phosphate minerals (w) Minerals in soil environment, 2nd edn, red. J.B. Dixon, S.B. Weed, Soil Science Society of America, Madison, 1989 s. 1089–1130
48. López-Bucio J., Cruz-Ramírez A., Pérez-Torres A., Ramírez-Pimentel J.G., Sánchez-Calderón L., Herrera-Estrella L.: Root architecture (w) Plant architecture and its manipulation, red. C. Turnbull, Wiley-Blackwell Annual Review Series, Oxford, 2005, s. 181–206
49. Łyszcz M., Gałązka A.: Genetyczne metody różnicowania mikroorganizmów w systemie gleba-roślina. *Post. Mikrobiol.* **56**, 341–352 (2017)
50. Łyszcz M., Gałązka A.: Proces biologicznego wiązania azotu atmosferycznego (w) Studia i Raporty IUNG-PIB – Siedliskowe i agrotechniczne uwarunkowania produkcji roślinnej w Polsce, 49(3), red. J. Podleśny, Dział Upowszechniania i Wydawnictw IUNG – PIB w Puławach, Puławy, 2016, s. 59–70
51. Łyszcz M., Gałązka A.: Wybrane metody molekularne wykorzystywane w ocenie bioróżnorodności mikroorganizmów glebowych. *Post. Mikrobiol.* **55**, 309–319 (2016)
52. Łyszcz M., Głodowska M.: Bakterie endofityczne i ich wpływ na wzrost i rozwój roślin (w) Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce – Ochrona środowiska, red. J. Nyćkowiak, J. Leśny, Młodzi Naukowcy, Poznań, 2017, s. 65–70
53. Marek-Kozaczuk M., Skorupska A.: Production of B-group vitamins by plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* strain 267 and the importance of vitamins in the colonization and nodulation of red clover. *Biol. Fertil. Soils* **33**, 146–151 (2001)
54. Mendes R., Garbeva P., Raaijmakers J.M.: The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**(5), 634–663 (2013)
55. Meyer J.M., Gruffaz C., Raharinosy V., Bezverbnaya I., Schäfer M., Budzikiewicz H.: Siderotyping of fluorescent *Pseudomonas*: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method. *Biometals*, **21**, 259–271 (2008)
56. Mitter B., Brader G., Afzal M., Compant S., Naveed M., Trognitz F., Sessitsch A.: Advances in elucidating beneficial interactions between plants, soil, and bacteria (w) Advances in agronomy Vol. 121, Academic Press, Cambridge, 2013 s. 381–445
57. 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)
58. Nautiyal C.S., Srivastava S., Chauhan P.S., Seem K., Mishra A., Sopory S.K.: Plant growth-promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* NBRISN13 modulates gene expression profile of leaf and rhizosphere community in rice during salt stress. *Plant Physiol. Bioch.* **66**, 1–9 (2013)
59. Neubauer U., Nowak B., Furrer G., Schulin R.: Heavy metal sorption on clay minerals affected by the siderophore desferrioxamine B. *Environ. Sci. Technol.* **34**, 2749–2755 (2000)
60. Nihorimbere V., Ongena M., Smargiassi M., Thonart P.: Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, **15**, 327–337 (2011)
61. Norrish K., Rosser H.: Mineral phosphate (w) Soils: an Australian viewpoint. Academic Press, Melbourne, CSIRO/London, UK, Australia, 1983, s. 335–361
62. Orozco-Mosqueda M., Velázquez-Becerra C., Macías-Rodríguez L., Santoyo G., Flores-Cortez I., Alfaro-Cuevas R., et al.: *Arthrobacter agilis* UMCV2 induces iron acquisition in *Medicago truncatula* (strategy I plant) in vitro via dimethylhexadecylamine emission. *Plant Soil.* **362**, 51–66 (2013)
63. Ortiz-Castro R., Contreras-Cornejo H.A., Macías-Rodríguez L., López-Bucio J.: The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal. Behav.* **4**, 701–712 (2009)
64. Pangesti N., Pineda A., Pieterse C.M., Dicke M., Van Loon J.J.: Two-way plant mediated interactions between root-associated microbes and insects: from ecology to mechanisms. *Front. Plant Sci.* DOI: 10.3389/fpls.2013.00414 (2013)
65. Park Y.S., Dutta S., Ann M., Raaijmakers J.M., Park K.: Promotion of plant growth by *Pseudomonas fluorescens* strain SS101 via novel volatile organic compounds. *Biochem Biophys Res Commun.* **461**, 361–365 (2015)
66. Pospieszny H.: Systemiczna odporność nabyta (Systemic Acquired Resistance-SAR) w integrowanej ochronie roślin. *Progress in Plant Protection*, **56**, 436–442 (2016)
67. Preston G.M.: Plant perceptions of plant growth-promoting *Pseudomonas*. *Philos. T. Roy. Soc. B.* **359**, 907–918 (2004)
68. Rajkumar M., Ae N., Prasad M.N.V., Freitas H.: Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnol.* **28**, 142–149 (2010)
69. Raza W., Yousaf S., Rajer F.U.: Plant growth promoting activity of volatile organic compounds produced by biocontrol strains. *Sci. Lett.* **4**, 40–43 (2016)
70. Redecker D., Morton J.B., Bruns T.D.: Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Mol. Phylogenet. Evol.* **14**, 276–284 (2000)
71. Reinhold-Hurek B., Hurek T.: Living inside plants: bacterial endophytes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**, 435–443 (2011)
72. Ryu C., Farag M.A., Hu C., Reddy M.S., Kloepper J.W., Pare P.W.: Bacterial volatiles induce systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **134**, 1017–1026 (2004)
73. Ryu C.-M., Farag M.A., Hu C.-H., Reddy M.S., Wei H.-X., Pare P.W., Kloepper J. W.: Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 4927–4932 (2003)
74. Schalk I.J., Hannauer M., Braud A.: Minireview new roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environ. Microbiol.* **13**, 2844–2854 (2011)
75. Schaller G.: Ethylene and the regulation of plant development. *BMC Biol.* DOI:10.1186/1741-7007-10-9 (2012)

76. Schußler A., Schwarzott D., Walker C.: A new fungal phylum, the Glomeromycota, phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* **105**, 1413–1421 (2001)
77. Shariatmadari Z., Riahi H., Seyed Hashtroudi M., Ghassempour A., Aghashariatmadary Z.: Plant growth promoting cyanobacteria and their distribution in terrestrial habitats of Iran. *Soil Sci. Plant Nutr.* **59**, 535–547 (2013)
78. Sharma S.B., Sayyed R.Z., Trivedi M.H., Gobi T.A.: Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, DOI:10.1186/2193-1801-2-58 (2013)
79. Shi T.-Q., Peng H., Zeng S.-Y., Ji R.-Y., Shi K., Huang H., Ji X.-J.: Microbial production of plant hormones: Opportunities and challenges. *Bioengineered*, **8**, 124–128 (2017)
80. Shores M., Harman G.E., Mastouri F.: Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu. Rev. Phytopathol.* **48**, 21–43 (2010)
81. Singh R.P., Jha P.N.: The PGPR *Stenotrophomonas maltophilia* SBP-9 Augments Resistance against Biotic and Abiotic Stress in Wheat Plants. *Front. Microbiol.* DOI:10.3389/fmicb.2017.01945 (2017)
82. Sivasakthi S., Usharani G., Saranraj P.: Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR)-*Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. *Afr. J. Agr. Res.* **9**, 1265–1277 (2014)
83. Song G.C., Ryu C.M.: Two volatile organic compounds trigger plant selfdefense against a bacterial pathogen and a sucking insect in cucumber under open field conditions. *Int J Mol Sci.* **14**, 9803–9019 (2013)
84. Sorty A.M., Meena K.K., Choudhary K., Bitla U.M., Minhas P.S., Krishnani K.K.: Effect of plant growth promoting bacteria associated with halophytic weed (*Psoralea corylifolia* L.) on germination and seedling growth of wheat under saline conditions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **180**, 872–882 (2016)
85. Tahir H.A.S., Gu Q., Wu H., Niu Y., Huo R., Gao X.: *Bacillus* volatiles adversely affect the physiology and ultra-structure of *Ralstonia solanacearum* and induce systemic resistance in tobacco against bacterial wilt. *Sci. Rep.* DOI: 10.1038/srep40481 (2017)
86. Tahir H.A., Gu Q., Wu H., Raza W., Hanif A., Wu L., Colman W.M., Gao X.: Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. *Front. Microbiol.* DOI:10.3389/fmicb.2017.00171 (2017)
87. Thimann K.V.: Fifty years of plant hormone research. *Plant Physiol.* **54**, 450–453 (1974)
88. Tilak K.V.B.R., Ranganayaki N., Manoharachari C.: Synergistic effects of plant growth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* on nodulation and nitrogen fixation by pigeon pea (*Cajanus cajan*). *Eur. J. Soil Sci.* **57**, 67–71 (2006)
89. Tsavkelova E.A., Cherdyntseva T.A., Klimova S.Y., Shestakov A.I., Botina S.G., Netrusov A.I. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. *Arch. Microbiol.* **188**, 655–664 (2007)
90. Turner T.R., James E.K., Poole P.S.: The plant microbiome. *Genome Biol.* DOI:10.1186/gb-2013-14-6-209 (2013)
91. Tyler H.L. Triplett E.W.: Plants as a habitat for beneficial and/or human pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **46**, 53–73 (2008)
92. van de Mortel J.E., de Vos R.C., Dekkers E., Pineda A., Guilod L., Bouwmeester K., van Loon J. J.A., Dicke M., Raaijmakers J.M.: Metabolic and transcriptomic changes induced in *Arabidopsis* by the rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* SS101. *Plant Physiol.* **160**, 2173–2188 (2012)
93. Van Loon L.C.: Plant responses to plant growth promoting bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* **119**, 243–254 (2007)
94. Verhagen B.W.M., Glazebrook J., Zhu T., Chang H.-S., van Loon L.C., Pieterse C.M.J., The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **17**, 895–908 (2004)
95. Vorholt J.A.: Microbial life in the phyllosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 828–840 (2012)
96. Wang Q, Xiong D, Zhao P, Yu X, Tu B, Wang G.: Effect of applying an arsenic-resistant and plant growth-promoting rhizobacterium to enhance soil arsenic phytoremediation by *Populus deltoides* LH05-17. *J. Appl. Microbiol.* **111**, 1065–1074 (2011)
97. Welbaum G., Sturz A.V., Dong Z. Nowak J.: Fertilizing soil microorganisms to improve productivity of agroecosystems. *Crit. Rev. Plant Sci.* **23**, 175–193 (2004)
98. Woźniak M., Gałzka A., Grządziel J., Głodowska M.: The identification and genetic diversity of endophytic bacteria isolated from selected crops. *The Journal of Agricultural Science*, 1–10, DOI:10.1017/S0021859618000618 (2018)
99. Zhu F, Qu L, Hong X, Sun X.: Isolation and characterization of a phosphate solubilizing halophilic bacterium *Kushneria* sp. YCWA18 from Daqiao Saltern on the coast of yellow sea of China. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* DOI:10.1155/2011/615032 (2011)
100. Qi W, Zhao L.: Study of the siderophore producing *Trichoderma asperellum* Q1 on cucumber growth promotion under salt stress. *J. Basic. Microbiol.* **53**, 355–364 (2013)
101. Zou C., Li Z., Yu D.: *Bacillus megaterium* strain XTBG34 promotes plant growth by producing 2-pentylfuran. *J. Microbiol.* **48**, 460–466 (2010)

BAKTERIE ENDOFITYCZNE W FITODEGRADACJI TOKSYCZNYCH ZANIECZYSZCZEŃ ORGANICZNYCH

Daria Chlebek, Katarzyna Hupert-Kocurek*

Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski

Wpłynęło we wrześniu, zaakceptowano w listopadzie 2018 r.

Streszczenie: Fitodegradacja to przyjazna dla środowiska technologia, opierająca się na zdolności roślin do transformacji pobranych przez korzenie zanieczyszczeń organicznych. Istotną rolę we wspomaganiu procesów fitodegradacji mogą pełnić, budzące coraz większe zainteresowanie, bakterie endofityczne, kolonizujące wewnętrzne tkanki roślin bez wywoływania objawów chorobowych. Bakterie endofityczne wyposażone w odpowiednie szlaki metaboliczne, przyczyniają się do degradacji wielu różnych klas związków organicznych, w tym: wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, lotnych i monopierścieniowych związków organicznych, materiałów wybuchowych czy pestycydów. Mogą również wspomagać bioremediację gazów cieplarnianych, takich jak metan i dwutlenek węgla. Ponadto, bakterie endofityczne mogą wspierać wzrost i rozwój roślin poprzez szeroki zakres bezpośrednich i pośrednich mechanizmów, co również wpływa na efektywność procesów fitodegradacji.

1. Wprowadzenie. 2. Fitodegradacja zanieczyszczeń organicznych. 3. Źródła bakterii endofitycznych wspomagających procesy fitodegradacji. 4. Zanieczyszczenia organiczne degradowane przez bakterie endofityczne. 5. Genetyczne uwarunkowania degradacji ksenobiotyków przez endofity. 6. Mechanizmy wpływające na efektywność fitodegradacji wspomaganej przez endofity bakteryjne. 7. Podsumowanie

ENDOPHYTIC BACTERIA IN PHYTODEGRADATION OF PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS

Abstract: Organic pollutants are released into the environment as a result of various human activities. Traditional physical and chemical methods for the clean-up of soil and water polluted with these pollutants are often costly and invasive. A good alternative to above methods is bacteria assisted phytodegradation. Recently, the particular attention is focused on endophytic bacteria equipped with appropriate metabolic pathways, increasing the efficiency of organic compound degradation, and promoting plant growth. Endophytic bacteria are known to degrade various classes of organic compounds, such as: polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs); volatile and monocyclic organic compounds; explosives as well as pesticides. They may also assist bioremediation of greenhouse gases such as methane and carbon dioxide. Additionally, endophytic bacteria can promote the growth and development of plants through a wide range of direct and indirect mechanisms, which also affects the effectiveness of phytoremediation processes.

1. Introduction. 2. Phytodegradation of organic pollutants. 3. Sources of endophytic bacteria enhancing phytodegradation. 4. Organic pollutants degraded by endophytic bacteria. 5. Genetic basis of xenobiotics degradation in endophytic bacteria. 6. Mechanisms enhancing microbe-assisted phytodegradation. 7. Summary

Słowa kluczowe: bakterie endofityczne, fitodegradacja, zanieczyszczenia organiczne

Key words: endophytic bacteria, phytodegradation, organic pollutants

1. Wprowadzenie

Zanieczyszczenia organiczne uwalniane do środowiska w wyniku przemysłowej i rolniczej działalności człowieka stwarzają poważne zagrożenie dla bytujących w nim organizmów [1]. Ponieważ tradycyjne, fizyczne i chemiczne metody oczyszczania środowisk zdegradowanych są często kosztowne i inwazyjne, coraz więcej uwagi poświęca się metodom biologicznego usuwania tego typu zanieczyszczeń ze środowiska. Jedną z nich jest fitodegradacja, opierająca się na zdolności roślin do transformacji zanieczyszczeń organicznych [5, 11, 75]. Aby zwiększyć efektywność tej metody,

w ostatnich latach, coraz częściej prowadzi się badania mające na celu wykorzystanie potencjału degradacyjnego bakterii do wspomagania procesów fitodegradacji. Szczególna uwaga badaczy skupia się na bakteriach endofitycznych. Bakterie te, mogą promować wzrost i rozwój roślin, a co za tym idzie wpływać na zwiększenie ich biomasy. Mogą również wpływać na biodostępność zanieczyszczeń organicznych w glebie. Ważną zaletą wynikającą z zastosowania tej grupy mikroorganizmów do wspomagania procesów fitodegradacji jest również to, iż wszelkie toksyczne związki organiczne pobrane przez roślinę ulegają mineralizacji wewnątrz jej tkanek [1, 20, 30].

* Autor korespondencyjny: Katarzyna Hupert-Kocurek; Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach, ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice; tel. 32 200 94 62; e-mail: katarzyna.hupert-kocurek@us.edu.pl

2. Fitodegradacja zanieczyszczeń organicznych

Roślinny metabolizm ksenobiotyków pobranych ze środowiska, obejmuje ogólne przemiany tych związków do form bardziej rozpuszczalnych w wodzie i procesy ich sekwestracji [5, 75]. Fotoautotroficzne rośliny nie wykorzystują bowiem pobieranych związków organicznych jako źródła węgla i energii, a ich rola ogranicza się do przekształcenia tych związków w formy mniej toksyczne, w celu ochrony wrażliwych układów enzymatycznych i organelli. W procesie detoksykacji ksenobiotyków w komórkach roślin, wyróżnia się trzy fazy: aktywację, koniugację i sekwestrację / kompartmentalizację. W pierwszej fazie przemian, do lipofilnych związków organicznych zostają wprowadzone reaktywne, polarne grupy funkcyjne. Prowadzi to do obniżenia ich lipofilności i zwiększenia rozpuszczalności w środowisku wodnym komórki. Reakcje fazy pierwszej są zazwyczaj katalizowane przez takie enzymy, jak cytochrom P450 czy karboksyloesterazy. Faza druga obejmuje, katalizowane przez S-transferazy glutationowe (GST) oraz glukozylotransferazy (GT), reakcje sprzęgania transformowanych związków z endogennymi cząsteczkami, takimi jak aminokwasy, cukry czy glutation w celu zmniejszenia ich fitotoksyczności. W fazie trzeciej zachodzi usunięcie zainaktywowanych pochodnych ksenobiotyków z cytozolu do apoplastycznych przedziałów komórki lub wakuoli [72].

Efektywność procesu fitodegradacji może być ograniczona wrażliwością roślin na zbyt wysokie stężenie pobranych ksenobiotyków, które mogą wywoływać efekt fitotoksyczny, hamować wzrost i rozwój roślin [10]. Może być także limitowana poprzez biodostępność zanieczyszczeń [55]. Wadą omawianego procesu jest także nieznan, w wielu przypadkach, kierunek przemian związków absorbowanych w tkankach roślin, co może prowadzić do powstania metabolitów o znacznie większej toksyczności niż substancja macierzysta [36].

3. Źródła bakterii endofitycznych wspomagających procesy fitodegradacji

W przeciwieństwie do roślin, mikroorganizmy, ze względu na ich wszechstronne zdolności metaboliczne, umożliwiają całkowitą degradację związków organicznych, do CO₂ i H₂O [21]. W porównaniu z innymi organizmami, charakteryzują się one wyjątkową zdolnością adaptacji do nowych warunków środowiska, w tym traktowania związków niebędących produktami ich własnych przemian metabolicznych, jako substratów energetycznych i budulcowych [14]. Dlatego też w ostatnich latach, znaczącą rolę w procesie oczyszczania środowisk zdegradowanych przypisuje się fitoremediacji wspomaganą przez mikroorganizmy. Szczególną rolę w tym

procesie przypisuje się, wyposażonym w odpowiednie szlaki metaboliczne, bakteriom endofitycznym, które zwiększają skuteczność degradacji związków organicznych, pomagają roślinom przezwyciężyć stres wywołany zanieczyszczeniami, a także promują ich wzrost [5].

Bakterie endofityczne definiowane są głównie jako bakterie kolonizujące wewnętrzne tkanki roślin bez wywoływania objawów chorobowych, czy negatywnego wpływu na swojego roślinnego gospodarza [60]. W praktyce, termin ten określa mikroorganizmy, które mogą zostać wyizolowane z powierzchniowo wysterylizowanych organów roślinnych [18]. Wiele endofitów bakteryjnych zostało wyizolowanych zarówno z roślin dwuliściennych jak i jednoliściennych, począwszy od drzewiastych gatunków takich jak: dąb i grusza, do roślin uprawnych, takich jak: burak cukrowy i kukurydza [60].

Populacja i różnorodność endofitów obecnych w roślinach jest zmienna, uzależniona głównie od genotypu roślin, rodzaju tkanki, fazy rozwoju rośliny, ilości zanieczyszczeń organicznych i warunków fizykochemicznych gleby [28, 54]. Badania Phillips i wsp. [54] udowodniły, że różne gatunki roślin rosnące w glebie zanieczyszczonej węglowodorami utrzymują odrębne populacje mikroorganizmów endofitycznych, które mogą mieć wpływ na zdolność roślin do promowania degradacji określonych grup węglowodorów.

Obecność bakterii endofitycznych zdolnych do degradacji zanieczyszczeń organicznych wykazano u wielu gatunków roślin charakteryzujących się wysoką tolerancją/odpornością na zanieczyszczenia, takich jak topola (*Populus* sp.) czy wierzba (*Salix* sp.) [10, 81]. Bakterie użyteczne w procesach fitodegradacji wyizolowano także z tkanek komonicy zwyczajnej (*Lotus corniculatus*), życicy wielokwiatowej (*Lolium multiflorum*), łubinu żółtego (*Lupinus luteus*), grochu (*Pisum sativum*), pszenicy (*Triticum durum*) i kukurydzy (*Zea mays*) [39]. Z dębu szypułkowego (*Quercus robur*) oraz jesionu wyniosłego (*Fraxinus excelsior*) pozyskano endofity posiadające potencjał do rozkładu trichloroetyleny (TCE) [1], a w brodawkach roślin strączkowych, takich jak bób (*Vicia faba*) i łubin biały (*Lupinus albus*), znaleziono endofity zdolne do rozkładu zarówno węglowodorów alifatycznych, jak i aromatycznych [81]. Dobrym źródłem bakterii endofitycznych zdolnych do wykorzystania związków organicznych, jako źródła węgla, okazały się także rośliny zasiedlające mokradła [20] i słone bagna [45]. Izolowane z tych roślin szczepy należą głównie do rodzajów *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* i *Pantoea* [37].

Warto podkreślić, iż endofity bakteryjne zdolne do degradacji zanieczyszczeń kolonizują specyficzne tkanki roślinne [1]. Przede wszystkim można je znaleźć w ksylemie i/lub korze korzenia [5]. Najwyższą liczebność tej grupy bakterii obserwowano w korzeniach większości roślin [12, 59].

4. Zanieczyszczenia organiczne degradowane przez bakterie endofityczne

Grupę toksycznych i odpornych na biodegradację zanieczyszczeń organicznych, szeroko rozpowszechnioną w środowisku, stanowią wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) [53]. Obecność tego typu związków, może być wynikiem zarówno procesów naturalnych, takich jak pożary lasów czy wybuchy wulkanów, jak i przemysłowej i rolniczej działalności człowieka [3]. Wiele bakterii endofitycznych zdolnych jest do wzrostu w obecności WWA, a niektóre mogą degradować te związki, wykorzystując je jako źródło węgla i energii. Przykładem mogą być endofityczne szczepy *Pseudomonas putida* PD1 i *Pseudomonas* sp. Ph6 degradujące fenantren [28, 66] czy wyizolowane, odpowiednio, z konyzy kanadyjskiej (*Conyza canadensis*) i koniczyny łąkowej (*Trifolium pratense* L.) szczepy *Stenotrophomonas* sp. P1 i *Pseudomonas* sp. P3 zdolne do degradacji naftalenu, fenantrenu, fluorenu, pirenu i benzo(a)pirenu [86].

Obecność fenolu i jego pochodnych w środowisku wiąże się z powszechnym zastosowaniem tych związków, między innymi, do produkcji barwników, farb, lakierów, detergentów, herbicydów i leków. Związki te mogą powstawać również jako produkty uboczne wielu procesów przemysłowych, takich jak: przetwarzanie ropy naftowej, koksowanie węgla kamiennego oraz produkcja stali. Mogą także powstawać w wyniku biodegradacji polimerów aromatycznych, takich jak ligniny i taniny [40]. Zdolność do degradacji fenoli wykazano między innymi u bakterii endofitycznych izolowanych z korzeni i łodygi konopi siewnej (*Cannabis sativa*), wzrastającej na terenach zanieczyszczonych węglowodorami [22]. Wśród wyizolowanych bakterii największy potencjał do degradacji tego substratu aromatycznego wykazywały trzy izolaty, zidentyfikowane jako: *Pseudomonas* sp. (AIEB-4), *Alcaligenes* sp. (AIEB-6) i *Achromobacter* sp. (AIEB-7). Wszystkie trzy szczepy wykazywały zdolność do wzrostu w obecności 1000 mg/L⁻¹ fenolu. W czasie 96-godzinnej hodowli, *Achromobacter* sp. (AIEB-7) zdolny był do degradacji 81% wprowadzonej dawki fenolu, natomiast *Pseudomonas* sp. (AIEB-4) oraz *Alcaligenes* sp. (AIEB-6) rozkładały odpowiednio 72% i 69% wprowadzonej dawki fenolu.

Wśród wszystkich rodzajów zanieczyszczeń, jedno z głównych zagrożeń dla środowiska i zdrowia człowieka stanowią pestycydy. Chloropiryfos [O, O-dietyl O- (3,5,6-trichloro-2-pirydynylo) -fosforotioian] (CP), to szeroko stosowany w rolnictwie środek owadobójczy. Związek ten, akumuluje się w środowisku stwarzając zagrożenie dla ludzi i zwierząt. Wykazano, że CP może wywoływać uszkodzenia wątroby i nerek oraz wpływać negatywnie na aktywność plemników. Ponadto jest on uważany za jeden z czynników odpo-

wiedzialnych za wystąpienie raka piersi u kobiet. Zdolność degradacji tego insektycydu wykazano u szczepu *Sphingomonas* sp. HJY, wyizolowanego ze szczypioru chińskiego (*Allium tuberosum* Rottl. ex Spreng) [11].

Kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D) jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych środków chwastobójczych [37]. Sole 2,4-D są łatwo absorbowane przez korzenie roślin i ulegają translokacji do tkanek merystematycznych korzeni i pędów, gdzie związek ten działa jak hormon roślinny, powodując ich niekontrolowany rozrost. Mobilność 2,4-D w glebie często prowadzi do zanieczyszczeń wód powierzchniowych i gruntowych. Mimo, iż herbicyd ten jest biodegradowalny, może on utrzymywać się w glebie i wodzie [16]. Stosowanie 2,4-D na szeroką skalę stwarza niebezpieczeństwo zarówno dla zdrowia ludzi, jak i środowiska [37]. Zdolność bakterii endofitycznych do degradacji 2,4-D wykazano w doświadczeniu przeprowadzonym przez Germaine i wsp. [16]. W badaniach tych, endofityczny szczep *P. putida* VM1450, pochodzący z wewnętrznych tkanek topoli (*Populus deltoids*), wprowadzono do grochu (*Pisum sativum*). Zaszczepione rośliny poddawano działaniu 2,4-D. Stwierdzono, że szczep VM1450 aktywnie kolonizował wewnętrzne tkanki rośliny, a inokulowane rośliny charakteryzowały się większą zdolnością do usuwania 2,4-D z gleby i nie akumulowały tego herbicydu w tkankach [16].

Produkcja oraz przetwarzanie amunicji doprowadziło do zanieczyszczenia środowiska związkami takimi jak: 2,4,6-trinitrotoluen (TNT), heksahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazyna (RDX) czy octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocyna (HMX). Te toksyczne i mutagenne związki, charakteryzuje wysoka trwałość i odporność na działanie czynników chemicznych, biologiczne utlenienie oraz hydrolizę [52]. Badania Van Aken i wsp. [73] wykazały, że endofityczny szczep *Methylobacterium* sp. BJ001, wyizolowany z liści i korzeni topoli (*Populus deltoids x nigra* DN34), wykazuje zdolność do degradacji TNT, RDX oraz HMX. Po 55 dniach hodowli szczepu BJ001 w obecności powyższych związków, stwierdzono całkowity rozkład 25 mg/l TNT, 20 mg/l RDX oraz 2,5 mg/l HMX.

Wybrane gatunki bakterii wyizolowane z korzeni, pędów oraz ryzosfery klonu jaworowego (*Acer pseudoplatanus*) wzrastającego w glebie zanieczyszczonej TNT, zostały wykorzystane przez Thijs i wsp. [71] do utworzenia konsorcjum bakteryjnego CAP9. Konsorcjum to łączy w sobie zdolność do wydajnej transformacji TNT oraz promocji wzrostu roślin. Udowodniono, że inokulacja mietlicy pospolitej (*Agrostis capillaris*) tym konsorcjum bakteryjnym stymulowała wzrost roślin wzrastających w glebie skażonej TNT. Po raz pierwszy badania te wykazały, że bakteria endofityczna *Stenotrophomonas chelatiphagus* wyizolowana z liści oraz bakteria *Variovorax ginsengisoli* wyizolowana z korzeni klonu

jaworowego, mogą transformować TNT do hydroksyloaminy i amino-dinitrotoluenu.

Obecnie wiele badań koncentruje się nad możliwością wykorzystania endofitycznych metanotrofów w bioremediacji gazów cieplarnianych, w szczególności metanu i dwutlenku węgla. Bakterie te przyczyniają się do efektywnego wychwytywania metanu powstałego na torfowiskach, ograniczając w ten sposób jego emisję do atmosfery [67]. Bakterie metanotroficzne zdolne są do wykorzystywania metanu jako jedyne źródła węgla i energii. Kluczowym enzymem odpowiedzialnym za utlenienie metanu jest monoksygenaza metanowa. Enzym ten może występować w dwóch formach, jako sMMO i pMMO. Forma sMMO jest obecna w cytozolu, natomiast pMMO jest związana z błoną komórkową. Wykazano, że obie formy tego enzymu utleniają szereg związków alifatycznych i aromatycznych [64] i mogą występować w komórce równocześnie, jednak ich aktywność bezpośrednio zależy od stężenia jonów miedzi (Cu^{2+}) w biomacie [68]. Wykazano, że endofityczne metanotrofy, *Methylocella palustris* i *Methylocapsa acidophila*, kolonizujące tkanki mchu z rodzaju *Sphagnum* utleniają metan do dwutlenku węgla, który jest następnie wykorzystywany przez rośliny w procesie fotosyntezy. Endofity metanotroficzne kolonizujące tkanki *Sphagnum* sp. mogą redukować emisję CH_4 i CO_2 z torfowisk nawet o 50% [67]. Endofity metanotroficzne mogą zostać także wykorzystane do inokulacji roślin, takich roślin jak: trzcina (*Phragmites* sp.), pałka (*Typha* sp.) oraz wierzba (*Salix* sp.), zasiedlających sztuczny system mokradeł. Co więcej, mogą być również wprowadzone do roślin uprawnych i przyczyniać się do promocji ich wzrostu [67].

5. Genetyczne uwarunkowania degradacji ksenobiotyków przez endofity

W genomach większości wyizolowanych bakterii endofitycznych zdolnych do degradacji węglowodorów stwierdzono obecność genu kodującego monoksygenazę alkanową (*alkB*) oraz genu kodującego hydroksylazę cytochromu P450 (*CYT153*) [2, 27, 49]. Na przykład w badaniach Kukli i wsp. [29] wykazano, iż większość bakterii endofitycznych pozyskanych z życicy trwałej (*Lolium perenne* L.), rośliny wznoszącej w środowisku skażonym węglowodorami ropopochodnymi, posiadało gen *CYT153*. W genomie jednego z pozyskanych szczepów, *Rhodococcus fascians* L11, stwierdzono obecność genu *alkH* kodującego hydroksylazę alkanową i genu *pah* kodującego podjednostkę alfa dioksygenaz hydroksylujących WWA. Endofityczne szczepy *Microbacterium* sp. i *Rhodococcus* sp. (L7, S12, S23, S25) posiadały w swoim genomie gen *alkB*. W genomie żadnego z pozyskanych izolatów

nie wykazano natomiast obecności genu *c23o* kodującego 2,3-dioksygenazę katecholową, kluczowy enzym w szlaku degradacji monocyklicznych węglowodorów aromatycznych. Z kolei, w badaniach przeprowadzonych przez Siciliano i wsp. [63] wykazano, że w glebach zanieczyszczonych ropą naftową, dwa geny kodujące enzymy odpowiedzialne za degradację węglowodorów, gen *alkB*, kodujący monoksygenazę alkanową i *ndoB*, kodujący dioksygenazę naftalenową były bardziej powszechne u bakterii endofitycznych niż u mikroorganizmów żyjących w ryzosferze. Wśród szczepów endofitycznych powszechne były również geny kodujące enzymy związane z rozkładem nitrozwiązków, jak na przykład monoksygenaza nitrotoluenu (*ntnM*) oraz reduktaza 2-nitrotoluenu (*ntdAa*) [63]. Badania przeprowadzone przez Andria i wsp. [4] nad ekspresją genu *alkB* kodującego monoksygenazę alkanową u dwóch bakteryjnych szczepów wykazały natomiast, że endofityczny szczep *Pseudomonas* sp. ITRI53 wyizolowany z endosfery życicy wielokwiatowej (*Lolium multiflorum* L.) wykazywał dużo wyższy poziom ekspresji genu *alkB*, niż szczep *Rhodococcus* sp. ITRH43, pozyskany z ryzosfery tej rośliny. Co więcej, ekspresja genu *alkB* zachodziła nie tylko w ryzosferze, ale również *in planta*.

Różnice w ekspresji genów kodujących enzymy degradacyjne u bakterii endofitycznych wykazali także Yousaf i wsp. [82] w badaniach nad ekspresją bakteryjnego genu *CYP153* kodującego hydroksylazę cytochromu P450, enzym zaangażowany w degradację węglowodorów. W badaniach tych, trzy różne gatunki roślin: życica wielokwiatowa (*Lolium multiflorum* var. Taurus), komonica zwyczajna (*Lotus corniculatus* var. Leo) i lucerna (*Medicago sativa* var. Harpe) zaszczepione zostały trzema różnymi szczepami *Enterobacter ludwigii*. Stwierdzono, że szczepy bakterii, wprowadzone do roślin, różniły się znacząco poziomem ekspresji i liczbą genów zaangażowanych w degradację alkanów w zależności od gatunku roślinnego gospodarza, przedziału w obrębie roślin, a także na różnych etapach ich wzrostu. Najwyższy poziom ekspresji genów zaobserwowano w korzeniach oraz pędach życicy wielokwiatowej. Wszystkie szczepy wykazywały ekspresję genu *CYP153* we wszystkich przedziałach roślinnych, co wskazuje na ich aktywną rolę w degradacji oleju napędowego w roślinie. Najwyższy wskaźnik degradacji oleju napędowego (do 68%) wykazały dwa szczepy: *E. ludwigii* ISI10-3 i *E. ludwigii* BRI10-9 wprowadzone do życicy wielokwiatowej lub lucerny.

Informacja genetyczna kodująca syntezę enzymów zaangażowanych w degradację związków organicznych zlokalizowana jest najczęściej w ruchomych elementach genetycznych takich jak plazmidy czy transpozony, które umożliwiają HTG pomiędzy bakteriami [21]. HTG jest głównym mechanizmem, przez który mikroorganizmy nabywają nowe metaboliczne szlaki,

dzięki czemu szybko przystosowują się do zmian zachodzących w środowisku [74]. Umożliwia on zwiększenie populacji oraz aktywność autochtonicznych endofitycznych bakterii zdolnych do rozkładu związków organicznych [1]. Ponadto, HTG umożliwia pozyskanie bakterii endofitycznych, z nowymi katabolicznymi ścieżkami i heterologiczną ekspresją genów, zwłaszcza gdy dawca i biorca należą do spokrewnionych gatunków [18, 65]. *Burkholderia cepacia* FX2, to bakteria wykazująca zdolność degradacji toluenu, będąca gospodarzem plazmidu niosącego gen kodujący 2,3-dioksygenazę katecholową (C23O), kluczowy enzym w szlaku degradacji monocyklicznych węglowodorów aromatycznych. Wprowadzenie szczepu FX2 do kukurydzy (*Zea mays*) oraz pszenicy twardej (*Triticum durum*) wpłynęło pozytywnie na wzrost tych roślin, doprowadziło także do ograniczenia ewapotranspiracji toluenu do atmosfery. Horyzontalny transfer plazmidu z genem *c23o* wśród endofitycznych bakterii naturalnie występujących w tych roślinach pozwolił na zwiększenie populacji bakterii zdolnych do degradacji zanieczyszczeń oraz promocji wzrostu roślin [74]. Z kolei, *Burkholderia phytofirmans* PSJN jest endofitycznym szczepem, który z powodzeniem kolonizuje wiele roślin, stymulując ich wzrost i witalność. Na genom tej bakterii składają się dwa chromosomy i jeden plazmid, wyposażone między innymi w geny kodujące szlaki rozkładu wielu złożonych związków organicznych. Bakteria ta niesie geny kodujące takie enzymy zaangażowane w degradację

związków alifatycznych, jak: monoksygenazę alkanową (*alkB*) i hydroksylazę cytochromu P450. Jej genom zawiera również, co najmniej 15 genów kodujących dioksygenazy, enzymy zaangażowane w rozszczepienie pierścienia aromatycznego, takie jak: 1,2-dioksygenaza katecholowa, 2,3-dioksygenaza katecholowa, dioksygenaza 2-nitropropanowa oraz 3,4-dioksygenaza protokatechowa. Ponadto, w genomie tego szczepu stwierdzono imponująco dużą liczbę genów *GST* (24 kopie), wchodzących w skład operonów odpowiedzialnych za degradację związków aromatycznych [41]. Przykłady bakterii endofitycznych, w genomach których stwierdzono obecność genów zaangażowanych w degradację zanieczyszczeń organicznych przedstawiono w tabeli I.

6. Mechanizmy wpływające na efektywność fitodegradacji wspomaganej przez endofity bakteryjne

Ze względu na obecność zanieczyszczeń organicznych, dostępność składników mineralnych, w tym azotu, fosforu i żelaza w glebie może być limitowana, co w konsekwencji prowadzi do ograniczenia wzrostu roślin [27]. Biodostępność składników mineralnych w zanieczyszczonych glebach jest jednym z głównych czynników ograniczających efektywność fitoremedycji [1]. Wśród endofitów bakteryjnych promujących wzrost roślin można znaleźć takie, które mają zdolność wiązania wolnego azotu atmosferycznego (bakte-

Tabela I
Bakterie endofityczne, w genomach których wykazano obecność genów warunkujących zdolność do degradacji zanieczyszczeń organicznych

Endofit bakteryjny	Roślinny gospodarz	Gen	Kodowany enzym	Źródło
<i>Pseudomonas</i> sp. ITRI53 <i>Pseudomonas mandelii</i> 6FXS	<i>Lolium multiflorum</i> L. <i>Lotus corniculatus</i>	<i>alkB</i>	monoksygenaza alkanowa	[4] [51]
<i>Rhodococcus fascians</i> L11 <i>Rhodococcus</i> sp. 4WK	<i>Lolium multiflorum</i> L. <i>Oenothera biennis</i>	<i>alkH</i>	hydroksylaza alkanowa	[29] [51]
<i>Enterobacter ludwigii</i> ISI10-3 <i>E. ludwigii</i> ISI10-4 <i>E. ludwigii</i> BRI10-9 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 5XS <i>Pseudomonas umsongensis</i> 8.1WK	<i>Lolium multiflorum</i> var. Taurus, <i>Lotus corniculatus</i> var. Leo, <i>Medicago sativa</i> var. Harpe <i>Lotus corniculatus</i> <i>Oenothera biennis</i>	<i>CYP153</i>	hydroksylaza cytochromu P450	[82] [51]
<i>Burkholderia cepacia</i> FX2	<i>Zea mays</i> , <i>Triticum durum</i>	<i>c23o</i>	2,3-dioksygenaza katecholowa	[74]
<i>Pseudomonas putida</i> VM1441 (pNAH7)	<i>Pisum sativum</i>	<i>ndoB</i>	dioksygenaza naftalenowa	[15]
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 17397	<i>Elymus angustus</i> Trin.	<i>nidA</i>	dioksygenaza naftalenowa	[54]
<i>Pseudomonas syringae</i> Lz4W <i>Pseudomonas poae</i> DSM	<i>Agropyron elongatum</i>	<i>phnAc</i>	dioksygenaza fenantrenowa	[54]
<i>Rhodococcus fascians</i> L11	<i>Lolium multiflorum</i> L.	<i>pah</i>	podjednostka alfa dioksygenaz hydroksylujących WWA	[29]
<i>Pseudomonas</i> sp. BF1-3	<i>Platycodon grandiflorus</i>	<i>ophB</i>	hydrolaza organofosforowa	[44]
<i>Burkholderia cepacia</i> VM1468	<i>Populus deltoides</i> <i>x(trichocarpa x deltoides)</i>	<i>tomA</i>	monoksygenaza toluenowa	[70]
<i>Burkholderia phytofirmans</i> PSJN	<i>Zea mays</i>	<i>GST</i>	glutathion-S-transferaza	[41]

rie dizatrophiczne). Ostatnie badania wykazały, że zdolność wiązania wolnego azotu wykazują także niektóre endofity bakteryjne zdolne do degradacji związków organicznych [27]. Dashti i wsp. [9] donoszą, że bakterie zdolne do degradacji zanieczyszczeń organicznych i wiązania wolnego azotu zwiększają degradację węglowodorów w glebach zanieczyszczonych ropą naftową oraz ubogich w azot. Endofity bakteryjne zdolne są także do syntezy specyficznych związków organicznych, sideroforów, które umożliwiają redukcję jonów Fe^{3+} do Fe^{2+} , łatwiej dostępnych dla roślin [27]. Kolejnym makroskładnikiem ważnym dla wzrostu i rozwoju organizmów jest fosfor [30]. Bakterie związane z roślinami mogą zwiększać rozpuszczalność nieorganicznych fosforanów poprzez syntezę kwasów organicznych oraz fosfataz [27]. Oprócz omówionych powyżej składników mineralnych, bakterie endofityczne dostarczają roślinom niezbędnych witamin [60], w tym witaminę B1 [39] i B12 [67].

Jednym z najważniejszych fitohormonów produkowanym przez endofity bakteryjne jest kwas indolilo-3-octowy (IAA), należący do grupy auksyn. Fitohormon ten stymuluje wzrost wydłużeniowy korzeni, pobudza podziały komórkowe, a także indukuje tworzenie korzeni bocznych [56]. Ponadto, IAA może służyć jako cząsteczka sygnałowa w komunikacji pomiędzy komórkami bakterii [18]. Bakteryjny IAA wpływa także pośrednio na regulację poziomu etylenu w roślinie. Może on bowiem zwiększać transkrypcję i aktywność roślinnego enzymu-syntazy ACC, katalizującej tworzenie kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego (ACC), bezpośredniego prekursora etylenu [17]. Badania Sheng i wsp. [65] przeprowadzone nad *Enterobacter* sp. 12J1 wyizolowanym z czosnku (*Allium macrostemon*) rosnącego na terenach zanieczyszczonych węglowodorami wykazały, że szczep ten jest zdolny nie tylko do degradacji pirenu, ale również do produkcji IAA. Ponadto posiada on zdolność produkcji sideroforów oraz solubilizacji nieorganicznego fosforu. Po inokulacji szczepem *Enterobacter* sp. 12J1 pszenicy oraz kukurydzy stwierdzono, że skutecznie kolonizował on wewnętrzne tkanki korzeni oraz pędów, a także ryzosferę badanych roślin. Rośliny inokulowane tym szczepem charakteryzowały się zwiększoną produkcją biomasy.

Etylen (C_2H_4) jest ważnym fitohormonem modulującym wzrost i metabolizm komórek roślinnych. Jednakże jego nadmiar, produkowany przez rośliny w odpowiedzi na stresy środowiskowe, może hamować elongację korzeni, formowanie korzeni bocznych oraz włośników [30]. W szlaku biosyntezy etylenu, S-adenozylometionina (SAM) jest przekształcana przez syntazę ACC w kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowy (ACC), który następnie, przy udziale oksydazy ACC, ulega konwersji do etylenu. Bakterie wykazują zdolność syntezy deaminazy ACC, enzymu, który katalizuje

rozkład ACC do amoniaku i kwasu α -ketomasłowego obniżając tym samym poziom etylenu w roślinie [17]. Ostatnie badania wykazały, że endofity bakteryjne produkujące deaminazę ACC, jak również wykazujące zdolność degradacji węglowodorów znacząco przyczyniają się do produkcji biomasy roślin, w przeciwieństwie do bakterii posiadających tylko jedną z tych cech [27]. Na przykład Yousaf i wsp. [82] wykazali pozytywną korelację pomiędzy aktywnością deaminazy ACC obecnej w komórkach endofitycznych szczepów *E. ludwigii* ISI10-3 i BRI10-9, a poprawą efektywności wzrostu korzeni roślin inokulowanych tymi izolatami. Badane szczepy skutecznie kolonizowały wnętrza korzeni i ryzosferę roślin. Z kolei, badania Afzal i wsp. [2] wykazały, że *Burkholderia phytofirmans* PsJN, wyizolowana z powierzchniowo wysterylizowanych korzeni cebuli (*Allium cepa*), po wprowadzeniu do akacji (*Acacia amplicep*) wykazywała wysoką aktywność deaminazy ACC, która stymulowała wzrost rośliny oraz produkcję biomasy w glebie zanieczyszczonej ściekami włókienniczymi.

Endofity bakteryjne mogą także pośrednio stymulować wzrost roślin w glebach zanieczyszczonych związkami organicznymi poprzez hamowanie wzrostu i aktywności fitopatogenów, indukcję mechanizmów odporności roślin, syntezę enzymów hydrolitycznych, a także rozkład zanieczyszczeń organicznych [27].

Wiele endofitów bakteryjnych wykazuje antagonistyczne działanie przeciwko licznym grzybom oraz bakteriom [56]. Mogą one hamować działanie enzymów lub degradować toksyny produkowane przez patogeny [75]. Niektóre z nich zdolne są do wytwarzania enzymów litycznych degradujących ściany komórkowe grzybów [39], inne z kolei produkują cyjanowodór [7, 29, 50] czy wiele metabolitów wtórnych, w tym antybiotyki [56]. Badania Bisht i wsp. [7] wykazały, że endofityczny szczep *Bacillus* sp. SBER3 wyizolowany z topoli (*Populus deltoides*) jest zdolny do syntezy IAA, deaminazy ACC oraz sideroforów. Ponadto, w warunkach *in vitro*, hamuje wzrost fitopatogennych grzybów: *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum* i *Fusarium solani* o, odpowiednio, 60%, 61,5%, 64,3% i 12%. Szczep ten, oprócz promowania wzrostu roślin, zdolny jest także do degradacji wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Stwierdzono, że po reinokulacji tego szczepu do rośliny, przyczyniał się on do wzrostu długości korzeni oraz pędów, przyrostu obwodu pnia, zarówno w glebie kontrolnej, jak i w glebie zanieczyszczonej węglowodorami [7]. W tabeli II przedstawiono przykłady bakterii endofitycznych promujących wzrost roślin oraz wykazujących zdolność do degradacji zanieczyszczeń organicznych.

Niektóre bakterie endofityczne użyteczne w fitoremediacji zdolne są do produkcji związków powierzchniowo czynnych – biosurfaktantów [12, 29, 48, 83]. Te

Tabela II

Przykłady bakterii endofitycznych promujących wzrost roślin oraz wykazujących zdolność do degradacji zanieczyszczeń organicznych

Endofit bakteryjny	Roślinny gospodarz	Mechanizm promujący wzrost roślin	Degradowane zanieczyszczenia	Źródło
<i>Pseudomonas putida</i> L1	<i>Lolium perenne</i> L.	produkcja IAA produkcja sideroforów produkcja HCN	olej napędowy	[29]
<i>Enterobacter asburiae</i> 4FJK	<i>Hieracium piloselloides</i>	synteza deaminazy ACC produkcja IAA produkcja HCN produkcja NH ₃	olej napędowy	[50]
<i>Pseudomonas</i> sp. 1FWK	<i>Oenothera biennis</i>	synteza deaminazy ACC produkcja IAA produkcja sideroforów	olej napędowy	[51]
<i>Enterobacter ludwigii</i> ISI10-3, <i>E. ludwigii</i> ISI10-4, <i>E. ludwigii</i> BRI10-9	<i>Lolium multiflorum</i> var. Taurus, <i>Lotus corniculatus</i> var. Leo, <i>Medicago sativa</i> var. Harpe	synteza deaminazy ACC	alkany	[82]
<i>Bacillus</i> sp. SBER3	<i>Populus deltoides</i>	synteza deaminazy ACC, produkcja IAA produkcja sideroforów synteza enzymów litycznych	antracen, naftalen, benzen, toluen, ksylen	[7]
<i>Enterobacter</i> sp. 12J1	<i>Allium macrostemon</i>	produkcja IAA, mobilizacja fosforanów produkcja sideroforów	piren	[65]
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> F3B	<i>Chrysopogon zizanioides</i>	produkcja IAA wiązanie wolnego azotu	toluen	[19]
<i>Burkholderia cepacia</i> FX2	<i>Zea mays</i> , <i>Triticum durum</i>	produkcja sideroforów, mobilizacja fosforanów	toluen	[74]
<i>Burkholderia phytofirmans</i> PSJN	<i>Acacia amplicep</i>	synteza deaminazy ACC	ścieki włókiennicze	[2]
<i>Pseudomonas</i> sp. E46	<i>Spirodela polyrhiza</i>	produkcja IAA	fenpropatyna	[75]

wewnątrzkomórkowe, zewnątrzkomórkowe lub związane ze ścianą komórkową mikroorganizmów metabolity można podzielić na dwie grupy. Do pierwszej zaliczane są związki o stosunkowo małej masie cząsteczkowej (glikolipidy, fosfolipidy, lipopeptydy), drugą grupę stanowią substancje wysokocząsteczkowe, takie jak: emulsan, liposan czy kompleksy polisacharydowo-białkowe. Biosurfaktanty o małej masie cząsteczkowej zazwyczaj silnie obniżają napięcie międzyfazowe i powierzchniowe. Z kolei, biosurfaktanty wysokocząsteczkowe, to w większości efektywne emulgatory [47,48]. Szczególną rolę, biosurfaktanty, jak i mikroorganizmy je produkujące, odgrywają w bioremediacji środowisk zanieczyszczonych węglowodorami ropopochodnymi [32]. Oczyszczanie takich środowisk jest ograniczone ze względu na wysoką hydrofobowość tego typu zanieczyszczeń oraz ich niską rozpuszczalność w wodzie. Związki te zostają zaadsorbowane na cząstkach gleby bądź uwięzione w porach gruntu i tym samym stają się niedostępne dla mikroorganizmów oraz roślin [12, 83]. Obecność biosurfaktantów produkowanych przez mikroorganizmy przyczynia się do zwiększenia biodostępności zanieczyszczeń organicznych oraz ułatwia ich pobieranie przez rośliny [12]. Biosurfaktanty oddziałując bezpośrednio z węglowodorami zwiększają ich rozpuszczalność w wodzie, a oddziałując z powierzchnią komórek bakteryjnych degradujących te

substancje, przyczyniają się do zwiększenia ich hydrofobowości [5, 12]. Ponadto, obecność biosurfaktantów w środowisku może wpływać zarówno na poszczególne komórki, jak i całe populacje drobnoustrojów. Na przykład, niektóre cykliczne lipopeptydy wytwarzane przez bakterie z rodzaju *Bacillus* i *Pseudomonas*, poza bardzo wysoką aktywnością powierzchniową, charakteryzują się aktywnością biologiczną – hamując wzrost fitopatogenów, przyczyniają się do wzbudzenia indukowanej odporności systemicznej roślin (ISR), biorą udział w formowaniu biofilmów czy w ruchu rozpełzliwym (ang. swarming motility) [46,57]. Zdolność do produkcji biosurfaktantów wykazano u takich endofitycznych szczepów, jak: *Pseudomonas* sp., *Microbacterium* sp. i *Kocuria* sp. wyizolowanych z *Lolium perenne* [29], szczepu *Bacillus subtilis* K1 wyizolowanego z korzeni figowca bengalskiego (*Ficus benghalensis* L.) [48] czy *Microbacterium* sp. M87 pochodzącego z tkanek hiacyncy wodnego (*Eichhornia crassipes*) [32]. Badania Wu i wsp. [79] dowiodły, iż wyizolowany z korzeni trzciny (*Phragmites australis*) szczep *Pseudomonas aeruginosa* L10, produkujący biosurfaktant efektywnie obniżający napięcie powierzchniowe, wykazuje wysoką aktywność degradacyjną wobec różnych węglowodorów. Zsekwencjonowanie genomu tego szczepu wykazało obecność genów *rhlABRI* kodujących enzymy zaangażowane w biosyntezę ramnolipidu, jednego z najczęściej bada-

nych związków powierzchniowo czynnych. Z kolei, w 2014 roku, Zhang i wsp. [83] wykazali, iż inokulacja roślin bakteryjnym konsorcjum zawierającym endofityczny szczep *B. subtilis* J4AJ zdolny do degradacji oleju napędowego i endofityczny szczep *Pseudomonas* sp. U-3 produkujący biosurfaktant efektywnie obniżający napięcie powierzchniowe, sprzyjała usuwaniu oleju napędowego ze środowiska.

Produkowane przez endofity biosurfaktanty, mogą stanowić dobrą alternatywę dla budzących coraz więcej kontrowersji syntetycznych środków powierzchniowo czynnych stosowanych dla wspomagania procesów bioremediacji [31]. Zastosowanie syntetycznych surfaktantów budzi coraz większe obawy szczególnie ze względu na ich toksyczność i odporność na biodegradację, która może prowadzić do wzrostu zanieczyszczenia środowiska tego typu związkami [8, 23, 42]. Zdolność do degradacji anionowych surfaktantów wykazano u bakterii glebowych *B. subtilis* i *Bacillus cereus* [49] oraz u wyizolowanych z gleby i wody bakterie z rodzaju *Pseudomonas* [58]. Syntetyczne surfaktanty mogą także wpływać niekorzystnie na chemiczną i fizyczną strukturę gleby oraz gromadzić się w wodach gruntowych [61].

7. Podsumowanie

Wykorzystanie bakterii endofitycznych w remediacji zanieczyszczeń organicznych jest obecnie jednym z ważniejszych nurtów badawczych w biotechnologii środowiskowej. Liczne badania potwierdzają, że relacje między roślinami a ich wewnętrznymi symbiontami, w oczywisty sposób przyczyniają się do efektywnego przebiegu bioremediacji. Dlatego też warto badać te interakcje w celu opracowywania metod i strategii, pozwalających na lepsze wykorzystanie tych oddziaływań. Nowo izolowane bakterie endofityczne mogą stać się bowiem punktem wyjścia do dalszych badań nad ich zdolnością do degradacji zanieczyszczeń organicznych czy wspomaganie wzrostu roślin. Poznanie i zrozumienie genetycznych podstaw oddziaływań między roślinami a endofitami, przy użyciu najnowszych technik biologii molekularnej, umożliwi pełne wykorzystanie potencjału tej grupy mikroorganizmów.

Piśmiennictwo

- Afzal M., Khan Q.M., Sessitsch A.: Endophytic bacteria: prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants. *Chemosphere*, **117**, 232–242 (2014)
- Afzal M., Shabir G., Tahseen R., Ejazul I., Iqbal S., Khan Q.M.: Endophytic *Burkholderia* sp. strain PsJN improves plant growth and phytoremediation of soil irrigated with textile effluent. *Clean Soil Air Water*, **42**, 1304–1310 (2014)
- Andreolli M., Lampis S., Poli M., Gullner G., Biró B., Vallini G.: Endophytic *Burkholderia fungorum* DBT1 can improve phytoremediation efficiency of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemosphere*, **92**, 688–694 (2013)
- Andria V., Reichenauer T.G., Sessitsch A.: Expression of alkane monooxygenase (*alkB*) genes by plant – associated bacteria in the rhizosphere and endosphere of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) grown in diesel contaminated soil. *Environ. Pollut.* **157**, 3347–3350 (2009)
- Arslan M., Imran A., Khan Q.M., Afzal M.: Plant –bacteria partnerships for the remediation of persistent organic pollutants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 1–15 (2015)
- Barac T., Taghavi S., Borremans B., Provoost A., Oeyen L., Colpaert J.V., Vangronsveld J., van der Lelie D.: Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nat. Biotechnol.* **22**, 583–588 (2004)
- Bisht S., Pandey P., Kaur G., Aggarwal H., Sood A., Sharma S., Kumar V., Bisht N.S.: Utilization of endophytic strain *Bacillus* sp. SBER3 for biodegradation of polyaromatic hydrocarbons (PAH) in soil model system. *Eur. J. Soil. Biol.* **60**, 67–76 (2014)
- Chen P., Pickard M., Gray M.: Surfactant inhibition of bacterial growth on solid anthracene. *Biodegradation*, **11**, 341–347 (2000)
- Dashti N., Khanafer M., El-Nemr I., Sorkhoh N., Ali N., Radwan S.: The potential of oil utilizing bacterial consortia associated with legume root nodules for cleaning oily soils. *Chemosphere*, **74**, 1354–1359 (2009)
- Doty S.L.: Enhancing phytoremediation through the use of transgenics and endophytes. *New Phytol.* **179**, 318–333 (2008)
- Feng F., Ge J., Li Y., Cheng J., Zhong J., Yu X.: Isolation, colonization, and chlorpyrifos degradation mediation of the endophytic bacterium *Sphingomonas* strain HJY in chinese chives (*Allium tuberosum*). *J. Agric. Food Chem.* **65**, 1131–1138 (2017)
- Feng N.X., Yu J., Zhao H.M., Cheng Y.T., Mo C.H., Cai Q.Y., Li Y.W., Li H., Wong M.H.: Efficient phytoremediation of organic contaminants in soils using plant-endophyte partnerships. *Sci. Total Environ.* **583**, 352–368 (2017)
- Ferreira A., Quecine M.C., Lacava P.T., Oda S., Arau W.L.: Diversity of endophytic bacteria from Eucalyptus species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **287**, 8–14 (2008).
- Gałązka A.: Zanieczyszczenia gleb substancjami ropopochodnymi z uwzględnieniem biologicznych metod ich uzdatniania. *Kosmos*, **64**, 146–154 (2015)
- Germaine K.J., Keogh E., Ryan D., Dowling D.N.: Bacterial endophyte mediated naphthalene phytoprotection and phytoremediation. *FEMS Microbiol. Lett.* **296**, 226–234 (2009)
- Germaine K.J., Liu X., Cabellos G.G., Hogan J.P., Ryan D., Dowling D.N.: Bacterial endophyte-enhanced phytoremediation of the organochlorine herbicide 2,4 - dichlorophenoxyacetic acid. *FEMS Microbiol. Ecol.* **57**, 302–310 (2006)
- Glick B.R.: Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res.* **169**, 30–39 (2014)
- Hardoim P.R., van Overbeek L.S., Elsas J.D.: Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.* **16**, 463–471 (2008)
- Ho Y.N., Hsieh J.L., Huang C.C.: Construction of a plant-microbe phytoremediation system: combination of vetiver grass with a functional endophytic bacterium, *Achromobacter xylosoxidans* F3B, for aromatic pollutants removal. *Bioresour. Technol.* **145**, 43–47 (2013)
- Ho Y.N., Mathew D.C., Hsiao S.C., Shih C.H., Chien M.F., Chiang H.M., Huang C.C.: Selection and application of endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain F3B for improving phytoremediation of phenolic pollutants. *J. Hazard. Mater.* **219–220**, 43–49 (2012)

21. Ijaz A., Imran A., Anwar ul Haq M., Khan Q., Afzal M.: Phyto-remediation: recent advances in plant-endophytic synergistic interactions. *Plant Soil*, **392**, 1–17 (2015)
22. Iqbal A., Arshad M., Hashmi I., Karthikeyan R., Gentry T.J., Schwab A.P.: Biodegradation of phenol and benzene by endophytic bacterial strains isolated from refinery wastewater-fed *Cannabis sativa*. *Environ. Technol.* **13**, 1–10 (2017)
23. Jin D., Jiang X., Ou Z.: Effects of concentration, head group, and structure of surfactants on the degradation of phenanthrene. *J. Hazard. Mater.* **144**, 215–221 (2007)
24. Johnston-Monje D., Raizada, M. N.: Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. *PLoS One* **6**, e20396 (2011)
25. Kang J.W., Khan Z., Doty S.L.: Biodegradation of trichloroethylene by an endophyte of hybrid poplar. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 3504–3507 (2012)
26. Karnwal.: Use of Bio-Chemical Surfactant Producing Endophytic Bacteria Isolated from Rice Root for Heavy Metal Bio-remediation. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* **41**, 699–714 (2018)
27. Khan S., Afzal M., Iqbal S., Khan Q.M.: Plant-bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils. *Chemosphere*, **90**, 1317–1332 (2013)
28. Khan Z., Roman D., Kintz T., delas Alas M., Yap R., Doty S.: Degradation, phytoprotection and phytoremediation of phenanthrene by endophyte *Pseudomonas putida*, PD1. *Environ. Sci. Technol.* **48**, 12221–12228 (2014)
29. Kukla M., Płociniczak T., Piotrowska-Seget Z.: Diversity of endophytic bacteria in *Lolium perenne* and their potential to degrade petroleum hydrocarbons and promote plant growth. *Chemosphere*, **117**, 40–46 (2014)
30. Li H.Y., Wei D.Q., Shen M., Zhou Z.P.: Endophytes and their role in phytoremediation. *Fungal Divers.* **54**, 11–18 (2012)
31. Li J.L., Chen B.H.: Surfactant-mediated biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Materials*, **2**, 76–94 (2009)
32. Lima J. M. S., Pereira J. O., Batista I. H., Pereira Junior R. C., Barroso H. dos S., Costa Neto P. de Q., Jackisch-Matsuura A.B., França S de C, Azevedo J.L.: Biosurfactants produced by *Microbacterium* sp. isolated from aquatic macrophytes in hydrocarbon-contaminated area in the Rio Negro, Manaus, Amazonas. *Acta Sci. Biol. Sci.* **39**, 13–20 (2017)
33. Liu J., Liu S., Sun K., Sheng Y., Gu Y., Gao Y.: Colonization on root surface by a phenanthrene degrading endophytic bacterium and its application for reducing plant phenanthrene contamination. *PLoS ONE*, **9**, e108249 (2014)
34. Liu X., Germaine K. J., Ryan, D., Dowling, D. N.: Whole-cell fluorescent biosensors for bioavailability and biodegradation of polychlorinated biphenyls. *Sensors*, **10**, 1377–1398 (2010)
35. Łuksa A., Mendrycka M., Stawarz M.: Bioremediacja gleb zaolejonych z wykorzystaniem sorbentów. *Nafta-Gaz*, **66**, 810–818 (2010)
36. Marecik R., Króliczak P., Cyplik P.: Fitoremediacja – alternatywa dla tradycyjnych metod oczyszczania środowiska. *Biotechnologia*, **74**, 88–97 (2006)
37. McGuinness M., Dowling D.: Plant-associated bacterial degradation of toxic organic compounds in soil. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **6**, 2226–2247 (2009)
38. McGuinness M.C., Mazurkiewicz V., Brennan E., Dowling D.N., Dechlorination of pesticides by a specific bacterial glutathione S-transferase, BphKLB400: Potential for bioremediation. *Eng. Life Sci.* **7**, 611–615 (2007)
39. Mercado-Blanco J., Lugtenberg B.J.J.: Biotechnological Applications of Bacterial Endophytes. *Current Biotechnology*, **3**, 60–75 (2014)
40. Michałowicz J., Duda W.: Phenols-sources and toxicity. *Pol. J. Environ. Stud.* **16**, 347–362 (2007)
41. Mitter B., Petric A., Shin M.W., Chain P.S., Hauberg-Lotte L., Reinhold-Hurek B., Nowak J., Sessitsch A.: Comparative genome analysis of *Burkholderia phytofirmans* PsJN reveals a wide spectrum of endophytic lifestyles based on interaction strategies with host plants. *Front Plant Sci.* **4**, 120 (2013)
42. Mohan P.K., Nakhla G., Yanful E.K.: Biokinetics of biodegradation of surfatants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions. *Water Res.* **40**, 533–540 (2006)
43. Moore F.P., Barac T., Borremans B., Oeyen L., Vangronsveld J., van der Lelie D., Campbell C.D., Moore E.R.B.: Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: the characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation. *Syst. Appl. Microbiol.* **29**, 539–556 (2006)
44. Nath, D., Haque, A., Asraf, S., Dae, H., Keun, M.: Ecotoxicology and Environmental Safety Cloning and expression of *ophB* gene encoding organophosphorus hydrolase from endophytic *Pseudomonas* sp. BF1-3 degrades organophosphorus pesticide chlorpyrifos. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **108**, 135–141 (2014)
45. Oliveira V., Gomes N.C., Almeida A., Silva A.M., Silva H., Cunha A.: Microbe-assisted phytoremediation of hydrocarbons in estuarine environments. *Microb. Ecol.* **69**, 1–12 (2015)
46. Ongena M., Jacques P.: *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* **16**, 115–125 (2008)
47. Pacwa-Plociniczak M., Plaza G.A., Piotrowska-Seget Z., Cameotra S.S.: Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 633–654 (2011)
48. Pathak K.V., Keharia H.: Application of extracellular lipopeptide biosurfactant produced by endophytic *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) in microbially enhanced oil recovery (MEOR). *Biotech.* **4**, 41–48 (2014)
49. Patrao S., Acharya A., Suvarna N., Sequeira M.: Degradation of anionic surfactants by *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. *Pharm Biol Sci.* **3**, 42–45 (2012)
50. Pawlik M., Piotrowska-Seget Z.: Endophytic bacteria associated with *Hieracium piloselloides*: Their potential for hydrocarbon-utilizing and plant growth-promotion. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A.* **78**, 860–870 (2015)
51. Pawlik M., Cania B., Thijs S., Vangronsveld J., Piotrowska-Seget Z.: Hydrocarbon degradation potential and plant growth-promoting activity of culturable endophytic bacteria of *Lotus corniculatus* and *Oenothera biennis* from a long-term polluted site. *Environ. Sci. Pollut. Res.* DOI 10.1007/s11356-017-9496-1 (2017)
52. Panz K, Miksch K.: Phytoremediation of explosives (TNT, RDX, HMX) by wildtype and transgenic plants. *J. Environ. Manage.* **113**, 85–92 (2012)
53. Peng A., Liu J., Gao Y., Chen Z.: Distribution of endophytic bacteria in *Alopecurus aequalis* Sobol and *Oxalis corniculata* L. from soils contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. *PLoS ONE*, **8**, e83054 (2013)
54. Phillips L.A., Germida J.J., Farrell R.E., Greer Ch.W.: Hydrocarbon degradation potential and activity of endophytic bacteria associated with prairie plants. *Soil Biol. Biochem.* **40**, 3054–3064 (2008)
55. Pilon-Smits E.: Phytoremediation. *Ann. Rev. Plant Biol.* **56**, 15–39 (2005)
56. Pisarska K., Pietr S.J.: Bakterie endofityczne – ich pochodzenie i interakcje z roślinami. *Post. Mikrobiol.* **53**, 141–151 (2014)
57. Raaijmakers J. M., De Bruijn I., Nybroe O., Ongena M.: Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: More than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 1037–1062 (2010)
58. Rebello S., Asok A.K., Mundayoor S., Jisha M.S.: Surfactants: Toxicity, remediation and green surfactants. *Environ. Chem. Lett.* **12**, 275–287 (2014)

59. Rosenblueth M., Martínez-Romero E.: Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**, 827–837 (2006)
60. Ryan R., Germaine K., Franks A., Ryan D.J., Dowling D.N.: Bacterial endophyte: recent developments and applications. *FEMS Microbiol. Lett.* **278**, 1–9 (2008)
61. Sachdev D.P., Cameotra S.S.: Biosurfactants in agriculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 1005–1016 (2013)
62. Santoyo G., Moreno-Hagelsieb G., Orozco-Mosqueda M.C., Glick B.R.: Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol. Res.* **183**, 92–99 (2016)
63. Siciliano S.D., Fortin N., Mihoc A., Wisse G., Labelle S., Beaumier D., Ouellette D., Roy R., Whyte L.G., Banks M.K., Schwab P., Lee K., Greer C.W.: Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2469–2475 (2001)
64. Semrau J.D.: Bioremediation via methanotrophy: overview of recent findings and suggestions for future research. *Front. Microbiol.* **2**, 209 (2011)
65. Sheng X., Chen X., He L.: Characteristics of an endophytic pyrene-degrading bacterium of *Enterobacter* sp. 12J1 from *Allium macrostemon* Bunge. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **62**, 88–95 (2008)
66. Sun K., Liu J., Gao Y., Jin L., Gu Y., Wang W. Isolation, plant colonization potential, and phenanthrene degradation performance of the endophytic bacterium *Pseudomonas* sp. Ph6-*gfp*. *Sci. Rep.* **4**, 5462 (2014)
67. Stępniewska Z., Kuźniar A.: Endophytic microorganisms – promising applications in bioremediation of greenhouse gases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 9589–9596 (2013)
68. Stępniewska Z., Goraj W., Kuźniar A.: Przemiany metanu w środowiskach torfowych. *Forest Research Papers*, **75**, 101–110 (2014)
69. Taghavi S., Barac T., Greenberg B., Borremans B., Vangronsveld J., van der Lelie D.: Horizontal gene transfer to endogenous endophytic bacteria from poplar improves phytoremediation of toluene. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8500–8505 (2005)
70. Taghavi S., Weyens N., Vangronsveld J., van der Lelie D.: Improved phytoremediation of organic contaminants through engineering of bacterial endophytes of trees (w) Endophytes of forest trees, red. Pirttilä, A. M., Frank A. C., Springer, Dordrecht, 2011, s. 205–216
71. Thijs S., Van Dillewijn P., Sillen W., Truyens S., Holtappels M., D’Haen J., Carleer R., Weyens N., Ameloot M., Ramos J.L., Vangronsveld J.: Exploring the rhizospheric and endophytic bacterial communities of *Acer pseudoplatanus* growing on a TNT-contaminated soil: towards the development of a rhizo-competent TNT-detoxifying plant growth promoting consortium. *Plant Soil.* **385**, 15–36 (2014)
72. Truu J., Truu M., Espenberg M., Nolvak H., Juhanson J.: Phytoremediation and plant-assisted bioremediation in soil and treatment wetlands: a review. *Open Biotechnol. J.* **9**, 85–92 (2015)
73. Van Aken B., Peres C.M., Doty S.L., Yoon J.M., Schnoor J.L.: *Methylobacterium populi* sp. Nov., a novel aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, methane-utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoids x nigra* DN34). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 1191–1196 (2004)
74. Wang Y., Li H., Zhao W., He X., Chen J., Geng X., Xiao M.: Induction of toluene degradation and growth promotion in corn and wheat by horizontal gene transfer within endophytic bacteria. *Soil Biol. Biochem.* **42**, 1051–1057 (2010)
75. Weyens N., van der Lelie D., Taghavi S., Vangronsveld J.: Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge. *Curr. Opin. Biotechnol.* **20**, 248–254 (2009)
76. Weyens N., van der Lelie D., Artois T.: Bioaugmentation with engineered endophytic bacteria improves contaminant fate in phytoremediation. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 9413–9418 (2009)
77. Weyens N., Truyens S., Dupae J., Newman L., Taghavi S., van der Lelie D., Carleer R., Vangronsveld J.: Potential of the TCE-degrading endophyte *Pseudomonas putida* W619-TCE to improve plant growth and reduce TCE phytotoxicity and evapotranspiration in poplar cuttings. *Environ. Pollut.* **158**, 2915–2919 (2010)
78. Weyens N., Croes S., Dupae J., Newman L., van der Lelie D., Carleer R., Vangronsveld J.: Endophytic bacteria improve phytoremediation of Ni and TCE co-contamination. *Environ. Pollut.* **158**, 2422–2427 (2010)
79. Wu T., Xu J., Xie W., Yao Z., Yang H., Sun C., Li X.: *Pseudomonas aeruginosa* L10: A Hydrocarbon-Degrading, Biosurfactant-Producing, and Plant-Growth-Promoting Endophytic Bacterium Isolated From a Reed (*Phragmites australis*). *Front. Microbiol.* **9**, 1087 (2018)
80. Xu X., Sun J., Nie Y. Wu X.: *Spirodela polyrhiza* stimulates the growth of its endophytes but differentially increases their fenpropathrin-degradation capabilities. *Chemosphere*, **125**, 33–40 (2015)
81. Yousaf S., Afzal M., Anees M., Malik R.N., Campisano A.: Ecology and functional potential of endophytes in bioremediation: a molecular perspective (w) Advances in endophytic research, red. Verma V.C., Gange A.C., Springer, New Delhi, 2014, s. 301–320
82. Yousaf S., Afzal M., Reichenauer T.G., Brady C.L., Sessitsch A.: Hydrocarbon degradation, plant colonization and gene expression of alkane degradation genes by endophytic *Enterobacter ludwigii* strains. *Environ. Pollut.* **159**, 2675–2683 (2011)
83. Zhang X., Liu X., Wang Q., Chen X., Li H., Wei J., Xu G.: Diesel degradation potential of endophytic bacteria isolated from *Scirpus triquetus*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **87**, 99–105 (2014)
84. Zemleduch A., Tomaszewska B.: Mechanizmy, procesy i oddziaływanie w fitooremediacji. *Kosmos*, **56**, 393–407 (2007)
85. Zhong Y., Luan T., Wang X., Lan C., Tam N.F.Y.: Influence of growth medium on cometabolic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas* sp. strain PheB4. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**, 175–186 (2007)
86. Zhu X., Ni X., Waigi M.G., Liu J., Sun K., Gao Y.: Biodegradation of mixed PAHs by PAH-degrading endophytic bacteria. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **13**, 805–818 (2016)

NEW DATA ON ISOPENICILLIN N SYNTHASE AND PEROXISOME CO-LOCATION IN THE HYPHAL CELLS OF *PENICILLIUM CHRYSOGENUM* PQ-96 – PEXOPHAGY AND EXOCYTOSIS

Wiesław Kurzątkowski*, Paulina Górską, Małgorzata Główska,
Katarzyna Woźnica, Aleksandra Zasada

Department of Epidemiology, National Institute of Public Health – National Institute of Hygiene

Submitted in June, accepted in December 2018

Abstract: The machinery of antibiotic production by *Penicillium chrysogenum* PQ-96 is composed of co-located cytosolic and peroxisomal enzymes of the penicillin G biosynthesis pathway. Pexophagy and exocytosis should be currently considered as an alternative for penicillin G secretion from the mycelial cells. Penicillin G overproduction is a cellular detoxification process, protecting the mycelium from the toxicity of the antibiotic precursor.

1. Introduction. 2. Peroxisomal functions and penicillin G biosynthesis. 3. Immunoelectron microscopy of isopenicillin N synthase. 4. Ultrastructural localization of peroxisomes. 5. Pexophagy and exocytosis – secretion of penicillin G. 6. Conclusions

NOWE SZCZEGÓŁY DOTYCZĄCE KOLOKACJI SYNTAZY IZOPENICYLINY N I PEROKSYSOMÓW W KOMÓRKACH STRZĘPKÓW GRZYBNI SZCZEPU *PENICILLIUM CHRYSOGENUM* PQ-96 – PEKSOFAGIA I EGZOCYTOZA

Streszczenie: Maszyna produkcji antybiotyku przez przemysłowy szczep *Penicillium chrysogenum* PQ-96 jest złożona z zlokalizowanych cytozolowych i peroksysomalnych enzymów szlaku biosyntezy penicyliny G. Peksofagia i egzocytoza powinny być obecnie wzięte pod uwagę jako alternatywa dla sekrecji penicyliny G. Wysokowydajna produkcja penicyliny G jest procesem detoksykacyjnym chroniącym komórki producenta przed toksycznym prekursorem antybiotyku.

1. Wprowadzenie. 2. Rola peroksysomów i biosynteza penicyliny G. 3. Mikroskopia immunoelektronowa syntazy izopenicyliny N. 4. Ultrastrukturalna lokalizacja peroksysomów. 5. Peksofagia i egzocytoza. 6. Wnioski

Key words: *Penicillium chrysogenum*, penicillin G, biosynthesis, secretion, pexophagy, exocytosis, detoxification

Słowa kluczowe: *Penicillium chrysogenum*, penicylina G, biosynteza, sekrecja, peksofagia, egzocytoza, detoksykacja

1. Introduction

The discovery and industrial production of penicillin G by high-yielding *Penicillium chrysogenum* strains was a great success which allowed to open the era of antibiotic therapy. Penicillin G has saved millions of human beings from annihilation. The β -lactams are some of the oldest and most widely used antibiotics in human society. In industrial strains penicillin G is secreted in amounts of 45–50 g per liter of the fermentation broth. The biosynthesis and secretion of such unnatural amounts of this antibiotic requires a specially adopted ultra-structural organization of the industrial mycelium. Schematic arrangement of penicillin G biosynthesis in hyphal cells of *P. chrysogenum* was presented previously [1–16].

Penicillin G is synthesized by cellular condensation of activated L- α -aminoadipic acid (A), L-cysteine (C)

and L-valine (V) to δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine (ACV), formed by the ACV synthetase (ACVS) – encoded by the *pcbAB* gene. The ACV tripeptide is converted to isopenicillin N (IPN) by action of IPN synthase (IPNS) – encoded by the *pcbC* gene. In this oxidative ring closure reaction the bi-cyclic penam nucleus is formed consisting of β -lactam and thiazolidine rings [27]. In the last step, the CoA:isopenicillin N acyltransferase (IAT) – encoded by the *penDE* gene synthesizes penicillin G by substitution of the L- α -aminoadipyl side chain of IPN by the phenylacetyl side chain. The phenylacetic acid (PA) which is the precursor of penicillin G biosynthesis requires previous activation by specific phenylacetyl-CoA ligase (PCL) – encoded by *phl* gene [27]. The ACVS and IPNS are cytosolic enzymes, and IAT as well as PCL are peroxisome entrapped enzymes [25].

* Corresponding author: Wiesław Kurzątkowski, Department of Epidemiology, National Institute of Public Health – National Institute of Hygiene, 00-791 Warsaw, Poland; e-mail: wkurzatkowski@pzh.gov.pl

2. Peroxisomal functions and penicillin G biosynthesis

Peroxisomes also known as microbodies are single bilayer membrane bound highly dynamic organelles ubiquitous to most eukaryotic cells. The peroxisomal membrane is a dynamic structure modified according to the environmental needs. In contrast to the nucleus, mitochondria, or chloroplasts, peroxisomes do not contain DNA. Proliferation by division of preexisting organelles and the role of endoplasmic reticulum in the biogenesis of these organelles is now well established [11, 15, 16]. Mitochondria are also involved in the biogenesis of the peroxisomal membrane [23]. It has long been regarded that the primary function of fungal peroxisomes is limited to the β -oxidation of fatty acids. However, studies in filamentous fungi have revealed that peroxisomes have diverse functional activities. A variety of fungal metabolites are at least partially synthesized inside peroxisomes, including different types of secondary metabolites. Peroxisomal metabolites are often derived from acyl-CoA esters. Peroxisomes are versatile organelles that play an important role in the growth and survival processes of filamentous fungi, e.g. Woronin body that plugs the septal pore upon hyphal damage to prevent excessive cytoplasmic loss. A number of reports have demonstrated that Woronin bodies are derived from peroxisomes [19]. Peroxisomes contain a variety of proteins depending on the organism. These organelles accumulate toxic metabolites and act as a barrier protecting the cytosol from the hazardous compounds by degrading of toxic metabolites. Peroxisome acts as a waste furnace of toxic organic compounds, where they are oxidated, and secreted out of the cells coupled to carrier molecules [18] or in industrial amounts by pexophagy and exocytosis [11, 15, 16]. A good example is the process of penicillin G biosynthesis and its secretion from the mycelial cells of *P. chrysogenum* into the fermentation broth. In high concentrations PA is toxic to the mycelia cells [18]. During industrial production of penicillin G, PA is fed in appropriate amounts to the fermentation broth to avoid its toxic effect [4]. The fungal cytoplasmic acidification results in the inhibition of enzymatic reactions and amino acid transport, leading to cell death. The last step of penicillin G biosynthesis is located in peroxisomes where the PA is coupled to 6-aminopenicillanic acid. It suggests that the penicillin G biosynthesis is a cytosol detoxification process. It was also suggested that the large peroxisomes abundantly arranged at the periphery of the cytoplasm (Fig. 2C) seem to build a PA-barrier protecting the hyphal cells from the toxicity of the precursor of penicillin G biosynthesis [15, 16]. Based on electron microscopy and biochemical data, there are now solid evidences con-

firmed that IAT and PA are cumulated in peroxisomes [18]. The remarkable variability of activities suggests that the full extent of the biosynthetic capacity of peroxisomes is still elusive [2, 24].

3. Immunoelectron microscopic localization of IPNS

The immunoelectron microscopic arrangement of IPNS in apical, young sub-apical, mature (adult) sub-apical, and senescing/degrading hyphal cells of the tested industrial mycelium is summarized in Fig. 1. In the hyphal apex a total lack of the immunolabel of IPNS could be observed (Fig. 1A) which was more visible in the young sub-apical cytosol (Fig. 1B). In mature productive non-growing highly vacuolated cells the immune-gold localization of IPNS was mainly concentrated in channel-like structures of the cell wall and at the periphery of the cytoplasm as well as around the vacuoles. The immune-gold marker of IPNS was also abundantly arranged at polyribosomes surrounding the peroxisomes (Fig. 1C). Such a cellular co-localization of cytosolic IPNS with the peroxisomal IAT and PCL might be a precisely adopted structural arrangement enabling the withdrawal of ACV substrate of IPNS immediately from the fermentation broth and from the cytoplasm as well as from the vacuolar pool to increase the efficacy and yield in penicillin G biosynthesis. In line with this argumentation, it was recently found that ACV is present in the cytosol and vacuoles, and also accumulates in the fermentation broth [17, 25]. In senescing cells, the immunolabel of IPNS was rarely located at the periphery of the vacuoles and in the cytosol (Fig. 1D). Control experiments have been performed in order to check the specificity of immunegold-labeling. The control sample with IgG-gold conjugate alone was essentially devoid of label. The control sample incubated with pre-immunoserum, followed by goat anti-rabbit IgG – 15 nm gold conjugate exhibited only very light labeling of the hyphal cell [14]. In the mature hyphal cells of the low-penicillin-producing strain *P. chrysogenum* Q-176 the large peroxisomes and pexophagy as well as exocytoses could be observed much less often.

4. Ultrastructural localization of peroxisomes

The IAT is entrapped in peroxisomes of penicillin G yielding strains [18]. For this reason its ultrastructural location refers to the peroxisome deployment in the hyphal cells (Fig. 2). In sections through the hyphal apex typical tip bodies (Spitzenkörper) composed of small vesicles could be observed. The apical 1.0–3.0 μm

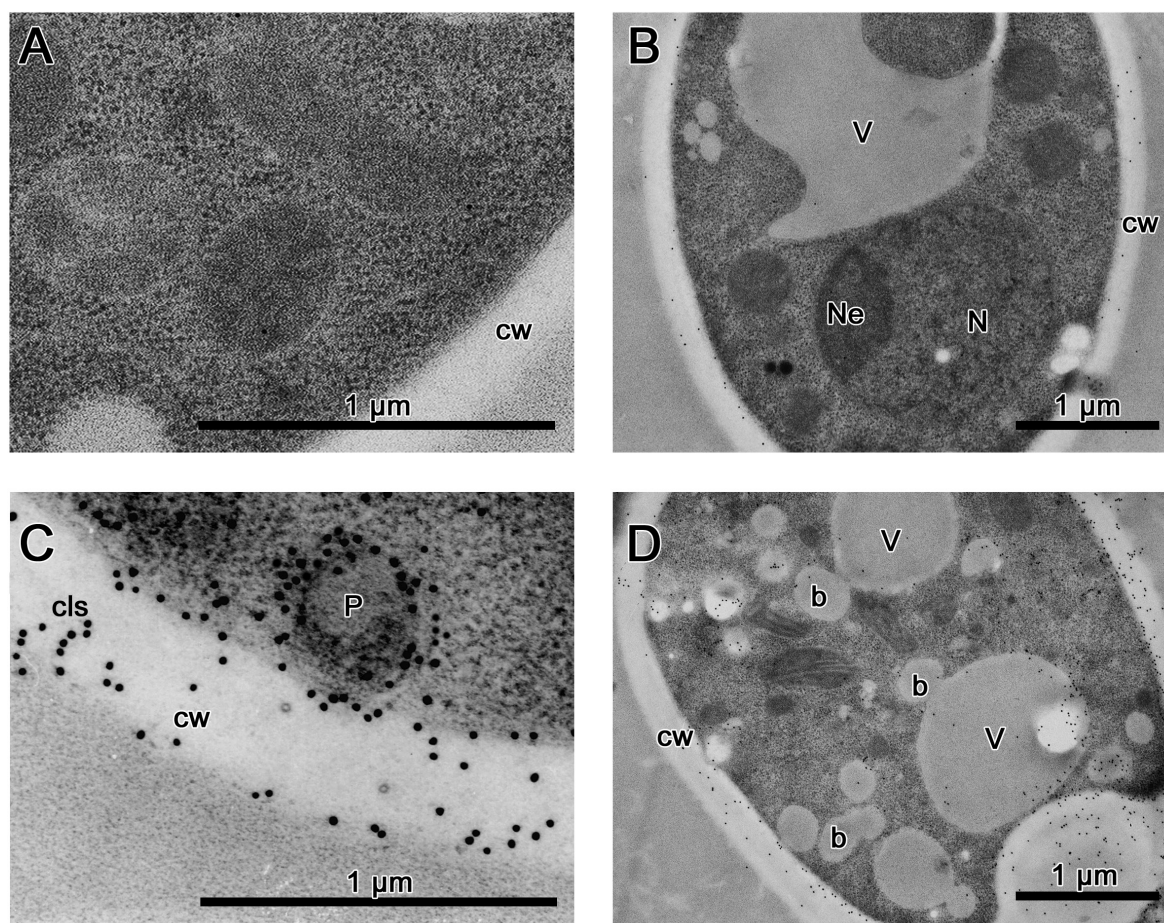


Fig. 1. *P. chrysogenu* PQ-96, high-yielding strain, immune microscopic localization of IPNS in the hyphal cells. (A) Apical cell, (B) young sub-apical hyphae, (C) mature productive non-growing vacuolated cells, (D) Senescing cells. Abbreviations: cw – cell wall, N – nucleus, Ne – nucleolus, V – vacuole, P – peroxisome, cls – canal-like structures of the cell wall, b – budding vacuole. The arrangement of IPNS marker is described in the text.

is occupied by ribosomes and mitochondria. This hyphal region is characterized by the electron dense cytoplasm, lack of peroxisomes and vacuoles as well as cross-walls (Fig. 2A). The young sub-apical hyphal cells are densely packed with ribosomes and mitochondria. Abundant *de novo* peroxisome formation in association with osmophilic membranes is characteristic for this hyphal region (Fig. 2B). A lack of large vacuoles and mature cross-walls associated with Woronin bodies characterizes this region. In mature productive non-growing highly vacuolated cells, the polyribosomes are frequently located at the periphery of the cytoplasm and in the neighborhood of the vacuolar tonoplast as well as around the peroxisomes. The membranes of the endoplasmic reticulum abundantly transform into peroxisomes from 0.1 µm up to 1.0 µm in diameter. Moreover, peroxisome multiplication by fission of preexisting organelles is also a significant feature of the productive non-growing mycelial cells of the high-yielding strain. These cells exhibited numerous large peroxisomes frequently arranged at the periphery of the cytoplasm and around the vacuoles (Fig. 2C). Massive pexophagy

and exocytosis was detected predominantly in the late-mature highly vacuolated cells. The mature cross-walls are accompanied by Woronin bodies. In senescing cells very large vacuoles could be observed (Fig. 2D). The particular cells of the hyphae are separated by mature cross-walls which are accompanied by Woronin bodies. In the cells an advanced degradation process was detected, including pexophagy and mitophagy.

5. Pexophagy and exocytosis – secretion of penicillin G

Pexophagy is a pathway in which peroxisomes are degraded inside of vacuoles in response to specific environmental conditions. The last step in penicillin G production is located in peroxisome (Fig. 3). Secretion of this antibiotic in industrial scale from the peroxisomes across the plasma membrane is poorly understood [18] and requires further explanation [20–22, 26, 27]. The lack of clear evidence that any of the ABC transporters are involved in penicillin G secretion is at present

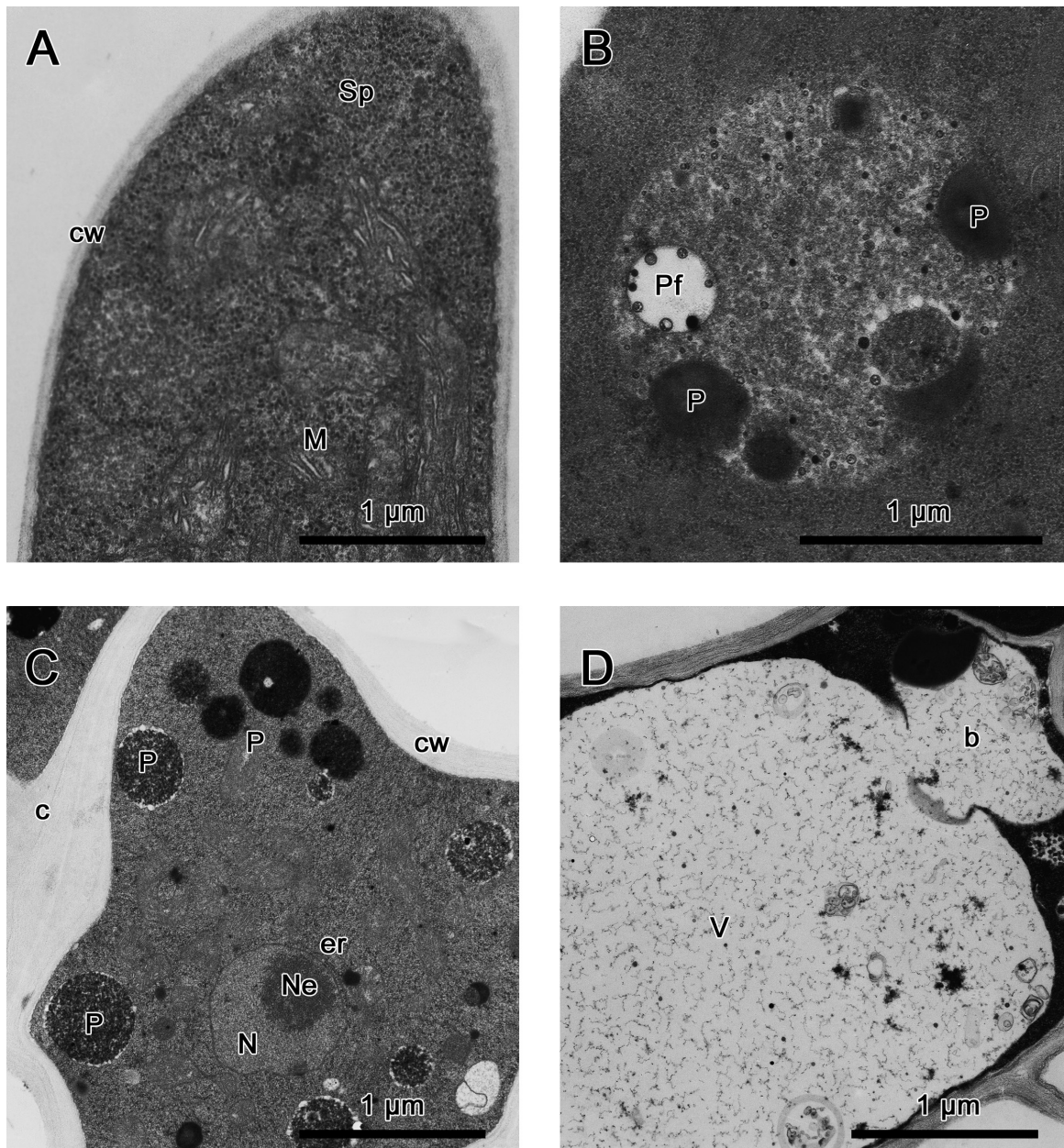


Fig. 2. *P. chrysogenum* PQ-96, high-yielding strain, ultrastructural localization of peroxisomes in the hyphal cells. (A) apical cell, (B) young sub-apical cell, (C) mature productive non-growing vacuolated cell, (D) senescing cell. Abbreviations: Sp – tip body (Spitzenkörper), M – mitochondrium, Pf – peroxisome formation, P – peroxisome, cw – cell wall, N – nucleus, Ne – nucleolus, er – endoplasmic reticulum, c – cross wall, b – budding vacuole. The arrangement of IPNS marker is described in the text.

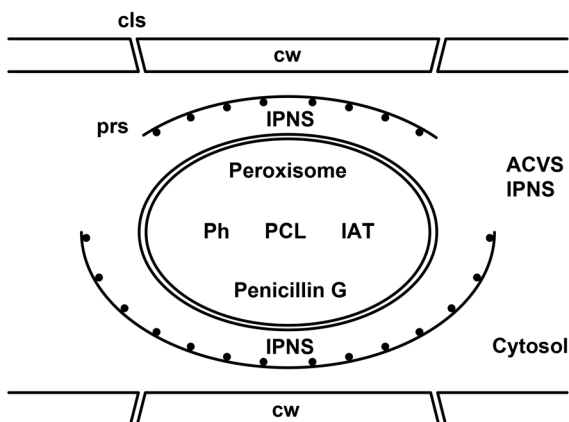


Fig. 3. The machinery of penicillin G biosynthesis.

In young and mature sub-apical hyphal cells the cytosolic ACVS and IPNS are abundantly arranged between polyribosomes and peroxisomes. Moreover, these enzymes are also immobilized at the cell wall, including the channel-like structures of the cell wall and in the peripheral cytoplasm as well as around the vacuoles. The IAT and PCL are peroxisome entrapped enzymes. In the process of mycelial protection the toxic for the cells PA is swallowed by peroxisomes and converted to penicillin G. The peroxisome is frequently located at the cell wall and in the neighborhood of vacuole. Such a cellular arrangement enhances the selective, continuous and sufficient supply of A, C, V for ACVS and ACV for IPNS from the fermentation broth and from the cytosol as well as from the vacuolar reservoir. Pexophagy and exocytosis might be directly involved in penicillin G secreted from the mycelia cells of the industrial mycelium. Abbreviations: described in the text, prs – polyribosomes, cls – canal-like structures of the cell wall.

intriguing. It may indicate that the ABC transport is not enough sufficient or the antibiotic secretion does not proceed through the classical ABC pumps. The results of our experiments exhibit that the abundant pexophagy and exocytosis characterized by large vacuolar budding as well as the presence of numerous vacuolar vesicles which fuse with the plasma membrane are important structural features characterizing the non-growing productive cells of the high-yielding strain [9, 11, 15, 16]. This structural arrangement is closely combined with the period of high penicillin G secretion in an industrial scale. The vacuolar pH of about 5 is suitable for the stability of penicillin G. The abundant pexophagy and exocytoses could not be observed in the mature cells of the low-penicillin-producing strain *P. chrysogenum* Q-176. It suggests that the pexophagy and exocytosis might be directly involved in penicillin secretion by industrial strains.

6. Conclusions

The overproduction of penicillin G is associated with a strictly adjusted cellular organization. The young sub-apical and mature non-growing peroxisomal cells of the industrial hyphae are privileged in overproduction of penicillin G. The co-location of IPNS and peroxisomes at the periphery of the cells and around the vacuoles may increase the enzyme supplying efficacy in penicillin G biosynthesis from the fermentation broth and from the cytosol as well as from the vacuolar pool. In penicillin G biosynthesis the structurally grouped organelles build a well organized assembly line composed of cytosol concentrated and membrane encompassed enzymes, substrates, intermediates, precursors (PA, A, C, V) side- and end-products. Penicillin G biosynthesis in an industrial scale is a cellular detoxification process protecting the mycelial cell from the toxicity of the PA. Pexophagy and exocytoses should be currently considered in large-scale secretion of penicillin G as a putative alternative for active secretion by the ABC transporters. The novelty of described data is the differentiation of the hyphal cells in penicillin G biosynthesis and the discovered collocation of IPNS and peroxisomes. It is important, because the knowledge concerned with the cellular arrangements in overproduction of penicillin G is of great economical importance.

Acknowledgements

The work was supported by the grants from the *Polfa* Tarchomin Pharmaceutical Works, Warsaw, Poland; Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Berlin, Germany; Robert Koch-Institute, Berlin, Germany and the statutory activity 10/EM1 of the National Institute of Public Health – National Institute of Hygiene.

References

1. Bartoszewska M., Opaliński Ł., Veenhuis M., van der Klei I.J.: The significance of peroxisomes in secondary metabolite biosynthesis in filamentous fungi. *Biotechnol. Lett.* **33**, 1921–1931 (2011)
2. Deb R., Nagotu S.: Versatility of peroxisomes: An evolving concept. *Tissue Cell*, **49**, 209–226 (2017)
3. Domínguez-Santos R., Kosalková K., García-Estrada C., Barreiro C., Ibáñez A., Morales A., Martín J-F.: Casein phosphopeptidase and CaCl₂ increase penicillin production and cause an increment in microbody/peroxisome proteins in *Penicillium chrysogenum*. *J. Proteomics*, **156**, 52–62 (2017)
4. Hillenga D.J., Versantvoort H.J., van der Molen A.J., Driessen A.J., Koningd W.N.: *Penicillium chrysogenum* takes up the penicillin G precursor phenylacetic acid by passive diffusion. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2589–2595 (1995)
5. Kiel J.A., van der Klei I.J., van den Berg M.A., Bovenberg R.A., Veenhuis M.: Overproduction of a single protein, Pc-Pex11p, results in 2-fold enhanced penicillin production by *Penicillium chrysogenum*. *Fungal Genet. Biol.* **42**, 154–164 (2005)
6. Kohlwein, S.D., Veenhuis M., van der Klei I.J.: Lipid droplets and peroxisomes: key players in cellular lipid homeostasis or a matter of fat-store 'em up or burn 'em down. *Genetics*, **193**, 1–50 (2013)
7. Kuryłowicz W., Kurzańkowski W., Woźnicka W., Połowniak-Pracka H., Paszkiewicz A., Luba J., Piorunowski J.: Atlas of ultrastructure of *Penicillium chrysogenum* in course of biosynthesis of penicillin G, *Chemia Publishing Office* (1980)
8. Kurzańkowski W., Gębska-Kuczerowska A.: Compartmentalization in cephalosporin C biosynthesis by industrial strains of *Acremonium chrysogenum*. *Post. Mikrobiol.* **54**, 374–379 (2015)
9. Kurzańkowski W., Gębska-Kuczerowska A.: Pexophagy in penicillin G secretion by *Penicillium chrysogenum* PQ-96. *Pol. J. Microbiol.* **65**, 365–368 (2016)
10. Kurzańkowski W., Gębska-Kuczerowska J.: Antibiotic biosynthesis and secondary metabolism in high yielding strains of *Streptomyces*, *Penicillium chrysogenum* and *Acremonium chrysogenum*. *Post. Mikrobiol.* **56**, 422–428 (2017)
11. Kurzańkowski W., Gębska-Kuczerowska A., Oliwa-Dobiszewska K., Gaber A., Kuczerowska M.: Penicillin G secretion by industrial mycelia of *Penicillium chrysogenum*. *Post. Mikrobiol.* **55**, 433–437 (2016)
12. Kurzańkowski W., Kurzańkowski J., Filipek J., Solecka J., Holska W., Kuryłowicz W.: Reversion of L-lysine inhibition of penicillin G biosynthesis by 6-oxopiperidine-2-carboxylic acid in *Penicillium chrysogenum* PQ-96. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 307–398 (1990)
13. Kurzańkowski W., Kurzańkowski J., Filipek J., Solecka J., Holska W., Kuryłowicz W.: Assay of 6-oxopiperidine-2-carboxylic acid in fermentations of *Penicillium chrysogenum* PQ-96. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 354–355 (1990)
14. Kurzańkowski W., Palissa H., Van Liempt H., von Döhren H., Kleinkauf H., Wolf W.P., Kuryłowicz W.: Localization of isopenicillin N synthase in *Penicillium chrysogenum* PQ-96. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 517–520 (1991)
15. Kurzańkowski W., Staniszevska M., Bondaryk M., Gębska-Kuczerowska A.: Penicillin G production by industrial strains of *Penicillium chrysogenum*. *Post. Mikrobiol.* **53**, 366–370 (2014)
16. Kurzańkowski W., Staniszevska M., Bondaryk M., Gębska-Kuczerowska A.: Compartmentalization in penicillin G biosynthesis by *Penicillium chrysogenum* PQ-96. *Pol. J. Microbiol.* **63**, 399–408 (2014)

17. Lendenfela T.D., Ghali M., Wolschek E.M., Kubicek-Pranz E.M., Kubicek C.P.: Subcellular compartmentation of penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. The amino acid precursors are derived from the vacuole. *J. Biol. Chem.* **286**, 665–671 (1993)
18. Martin J-F, Ullán R.V, Garcia-Estrada C.: Role of peroxisomes in the biosynthesis and secretion of β -lactams and other secondary metabolites. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 367–382 (2012)
19. Maruyama J., Kitamoto K.: Expanding functional repertoires of fungal peroxisomes: contribution to growth and survival processes. *Front. Physiol.* **4**, 177 DOI: 10.3389/fphys.2013.00177 (2013)
20. Meijer W.H., Gidijala L., Fekken S., Kiel J.A., van den Berg M.A., Lascaris R., Bovenberg R.A., van der Klei I.J.: Peroxisomes are required for efficient penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Environ Microbiol.* **76**, 5702–5709 (2010)
21. Nagotu S., Veenhuis M., van der Klei I.J.: *Divide et impera*. The dictum of peroxisomes. *Traffic*, **11**, 175–184 (2010)
22. Opaliński Ł., Kiel J.A., Homan T.G., Veenhuis M., van der Klei I.J.: *Penicillium chrysogenum* Pex14/17p – a novel component of the peroxisomal membrane that is important for penicillin production *FEBS J.* **277**, 3203–3218 (2010)
23. Opalinski Ł., Veenhuis M., van der Klei I.: Peroxisomes: membrane events accompanying peroxisome proliferation. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **43**, 847–851 (2011)
24. Stehlik, T., Sandrock, B., Ast, J., Freitag, J.: Fungal peroxisomes as biosynthetic organelles. *Curr Opin. Microbiol.* **22**, 8–14 (2014)
25. Tahlan K., Moore M.A., Jensen S.E.: δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase (ACVS): discovery and perspectives. *J. Ind. Microbiol.* **44**, 517–524 (2017)
26. Voigt O., Poggeler S.: Self-eating to grow and kill: autophagy in filamentous ascomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 9277–9290 (2013)
27. Weber S.S. Bovenberg R.A., Driessen A.L. Biosynthetic concepts for the production of β -lactam antibiotics in *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. J.* **7**, 225–236 (2012)

TWORZENIE BANKÓW KOMÓREK W PRODUKCJI BIOFARMACEUTYKÓW

Agnieszka Sobolewska-Ruta*, Piotr Zaleski

Instytut Biotechnologii i Antybiotyków, Warszawa

Wpłynęło w listopadzie w 2018 r., zaakceptowano w styczniu 2019 r.

Streszczenie: Szybki rozwój rynku farmaceutycznego w zakresie biofarmaceutyków jest powiązany z rosnącą liczbą i dostępnością opracowanych technologii ich wytwarzania. Jednym z podstawowych sposobów produkowania białek o właściwościach terapeutycznych jest wykorzystywanie bakteryjnych systemów ekspresyjnych. W celu zapewnienia jednolitego materiału wyjściowego dla całego procesu technologicznego konieczne jest założenie banków komórek z zachowaniem odpowiednich standardów jakościowych. Macierzysty bank komórek (MCB – Master Cell Bank) tworzony jest jako pierwszy w ściśle określonych warunkach na podstawie szczegółowo opisanych procedur, z pojedynczej dobrze wyselekcjonowanej i scharakteryzowanej kolonii bakteryjnej. Roboczy bank komórek (WCB – Working Cell Bank) przygotowany jest w drugiej kolejności, z jednej lub kilku probówek MCB. Banki te muszą być scharakteryzowane pod względem właściwości szczepu bakteryjnego oraz być wolne od zakażeń krzyżowych. W poniższej pracy nakreślono podstawowe założenia oraz wskazano na dobre praktyki mające na celu przygotowanie banku komórek zapewniającego stabilną i powtarzalną produkcję biofarmaceutyku.

1. Wprowadzenie. 2. Prokariotyczne systemy ekspresyjne. 3. System banków komórek. 4. Charakterystyka banków komórek. 4.1. Potwierdzenia tożsamości (właściwości) szczepu bakteryjnego. 4.2. Potwierdzenie czystości szczepu bakteryjnego. 5. Podsumowanie

CELL BANKS PREPARATION IN BIOPHARMACEUTICALS PRODUCTION

Abstract: The fast development of biopharmaceutical market is correlated with the growing number and availability of technologies for production of so called biodrugs. One of the main procedures for therapeutic protein production is based on bacterial expression systems. In order to maintain a constant quality and homogeneity of initial inoculum the cell bank must be created while maintaining quality standards. The first step should be the establishing of Master Cell Bank (MCB) which must be performed in laboratory meeting high quality standards and according to well described main procedures. MCB should be started from a single well characterised bacterial colony. Working Cell Bank (WCB) is usually prepared as a second step from one or few vials deposited in MCB. WCB must be characterised for bacterial strain homology and free of any biological cross contamination. This paper describes main requirements and good practises for preparation of cell bank suitable for constant and reproducible production of biopharmaceuticals.

1. Introduction. 2. Prokaryotic expression system. 3. Cell banking system. 4. Cell banks characterization. 4.1. Conformation of identity (properties) of the bacterial strain. 4.2. Confirmation of the purity of the bacterial strain. 5. Summary

Słowa kluczowe: banki komórek, białka rekombinowane, biofarmaceutyki, MCB, system ekspresyjny, WCB

Key words: cell banks, recombinant proteins, biopharmaceuticals, MCB, expression system, WCB

1. Wprowadzenie

Na rynku farmaceutycznym możemy wyróżnić leki tradycyjne, otrzymywane w wyniku procesów chemicznych oraz te, które wytwarzane są z wykorzystaniem technik inżynierii genetycznej przez żywe komórki, takie jak bakterie, grzyby, rośliny czy komórki ssacze [37]. Pojawienie się technologii rekombinacji DNA (rDNA) i jej zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym przyniosło szybki rozwój wielu firm biotechnologicznych oraz wzrost dostępności biofarmaceutyków, będących białkami rekombinowanymi o właściwościach

terapeutycznych. Umożliwiło to masową produkcję bezpiecznych i skutecznych leków. Obecnie wiele schorzeń leczonych jest przy pomocy biofarmaceutyków wytworzonych techniką rekombinacji DNA [7, 65].

Produkcja biofarmaceutyków jest ściśle regulowana przez międzynarodowe wytyczne określające sposoby postępowania w czasie ich wytwarzania. Cały proces technologiczny jak: wybór systemu ekspresyjnego, hodowla komórek, tworzenie banków komórek, produkcja, izolacja i oczyszczanie białka, charakterystyka substancji, ostateczne wytworzenie formy produktu leczniczego i dopuszczenie go do obrotu podlega

* Autor korespondencyjny: Agnieszka Sobolewska-Ruta, Zakład Bioinżynierii, Instytut Biotechnologii i Antybiotyków, ul. Starościńska 5, 02-516 Warszawa; tel. 22 378 62 29; e-mail: sobolewskaa@iba.waw.pl

rygorystycznym kontrolom przez międzynarodowe organy regulacyjne, takie jak: Agencję Żywności i Leków – FDA (The United State Food and drug Administration), Europejską Agencję Leków – EMA (European Medicines Agency), Europejski Dyrektoriat Jakości Leków i Ochrony Zdrowia – EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care) oraz Światową Organizację Zdrowia – WHO (World Health Organization). Organy te zapewniają koordynację oceny i nadzoru nad dopuszczeniem do obrotu produktów leczniczych stosowanych u ludzi i do celów weterynaryjnych na całym terytorium Unii Europejskiej (EMA) oraz Stanów Zjednoczonych (FDA). Przepisy te nakazują wytwórcom przestrzeganie licznych procedur podczas całego procesu produkcji i informowanie pacjentów o istniejących zagrożeniach związanych z zastosowaniem danego produktu leczniczego [11]. EDQM zajmuje się natomiast kontrolą jakości produktów leczniczych i produktów weterynaryjnych dopuszczonych już do obrotu na terenie Unii Europejskiej.

Pierwszym biofarmaceutykiem wytworzonym techniką rDNA w systemie prokariotycznym dopuszczonym do obrotu w 1982 roku była insulina ludzka [32]. Inne naturalne białka, tj.: hormony oraz cytokiny należą do dziewięciu kolejnych typów leków zatwierdzonych do użycia przez FDA w latach 80. XX wieku. Obecnie w medycynie stosuje się wiele rekombinowanych biofarmaceutyków do leczenia schorzeń tj.: zaburzeń metabolicznych (np. cukrzyca typu 1, cukrzyca typu 2, otyłość lub hipoglikemia), zaburzeń hematologicznych (np. niedokrwistość i przewlekła choroba nerek, hemofilia A, skaza krwotoczna związana z zaburzeniami krzepnięcia krwi) i w onkologii (np. terapie czerniaka, raka piersi lub raka jelita grubego). W latach 2010–2014 biofarmaceutyki dopuszczone do obrotu to głównie przeciwciała monoklonalne (31% całkowitej liczby wytworzonych) i leki o właściwościach przeciwnowotworowych (16%) [61].

Kluczowym etapem podczas wytwarzania biofarmaceutyków jest wybór odpowiedniego układu ekspresyjnego tzn. szczepu gospodarza i wektora ekspresyjnego. Zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia w sprawie wymagań Dobrej Praktyki Wytwarzania z 2008 roku (Dz. U. nr 184 poz. 1143) wytwarzanie produktów leczniczych uzyskanych z hodowli drobnoustrojów powinno być oparte o system banków komórek zapewniający zapobieganie niepożądanym zmianom właściwości bakterii, mogącym wynikać z powtarzających się pasażów komórek [60]. Przy produkcji białek rekombinowanych w różnych systemach ekspresyjnych nie stosuje się utrzymywania hodowli w sposób ciągły przez dłuższy okres czasu. Banki komórek mają na celu zapewnienie tego samego materiału wyjściowego dla całego procesu wytwarzania [10, 21].

W pracy zostaną nakreślone podstawowe założenia oraz wskazówki Dobrej Praktyki Wytwarzania mające na celu przygotowanie banków komórek zapewniających stabilną i powtarzalną produkcję biofarmaceutyków. Potencjalny Wytwórca sam musi odpowiednio dobrać zestaw metod niezbędnych do opracowania i scharakteryzowania banków oraz opracować stosowne procedury na potrzeby własnego procesu wytwarzania. Jest to obszar indywidualnego „know-how”, który może być częścią zastrzeżonej i chronionej technologii. Omówione zostaną przykłady podstawowych prokariotycznych systemów ekspresyjnych oraz generalne zasady wytwarzania bakteryjnych banków komórek (Microbial Cell Banks).

2. Prokariotyczne systemy ekspresyjne

Większość białek rekombinowanych jest produkowanych obecnie na drodze inżynierii genetycznej z wykorzystaniem różnych systemów ekspresyjnych: rekombinowanych szczepów prokariotycznych, eukariotycznych (np. linie komórkowe oraz drożdże), roślin lub organizmów transgenicznych. Systemy te są łatwo dostępne, bezpieczne i dają możliwość zmian sekwencji aminokwasowej białek w celu lepszego dostosowania końcowego produktu do pełnionej przez niego funkcji w organizmie. Wybór odpowiedniego układu ekspresyjnego (gospodarz i wektor) jest kluczowym krokiem podczas wytwarzania biofarmaceutyków.

Cechami przemawiającymi za stosowaniem drobnoustrojów do produkcji białek rekombinowanych jest ich różnorodność, potencjał metaboliczny i możliwość adaptacji do różnych warunków środowiskowych [12]. Najczęściej wybierane są bakterie, a zwłaszcza *Escherichia coli*. Wykorzystanie bakterii jest opłacalne ze względu na niskie koszty produkcji, łatwą manipulację w genomie, szybkie tempo wzrostu oraz możliwość wykorzystania wielu metod molekularnych umożliwiających pracę z nimi na poziomie komórkowym i molekularnym. Bakterie są idealne do produkcji białek o małej masie cząsteczkowej, które nie wymagają modyfikacji potranslacyjnych [37].

Bakterie z gatunku *E. coli* są najczęściej preferowanymi drobnoustrojami wykorzystywanymi do produkcji białek na dużą skalę ze względu na dobrze poznaną sekwencję genomu, najlepiej zdefiniowany układ transkrypcyjny i translacyjny, duży wybór opisanych promotorów, łatwość manipulacji genetycznych oraz dobrze poznane ścieżki metabolizmu i jego regulacji [23, 36]. Około 30% białek o właściwościach terapeutycznych zatwierdzonych do użycia przez FDA wytwarzane jest właśnie w tym gospodarzu [3]. W szczepach *E. coli* można uzyskać wysoki poziom ekspresji białek poprzez zastosowanie silnych promotorów. Ponadto,

E. coli może akumulować białka rekombinowane w ilości do 80% swojej suchej masy oraz charakteryzuje się zdolnością przeżycia w różnych warunkach środowiskowych [15]. Bakterie te namnażają się szybko na stosunkowo tanich podłożach, a proces syntezy białek rekombinowanych na dużą skalę w bioreaktorach został dobrze poznany i opisany [59]. Obecnie rutynowo w produkcji stosuje się szczep *E. coli* K-12 i jego pochodne [49, 75]. Pomimo wykorzystania szczepów *E. coli* jako systemu pierwszego wyboru, drobnoustroje te nie są pozbawione wad mających wpływ na procesy produkcyjne. Bakterie *E. coli* posiadają lipopolisacharyd (LPS, będący endotoksyną), przez co białka produkowane w tym systemie muszą być specjalnie oczyszczane, by mogły być użyte do wytwarzania biofarmaceutyków stosowanych w terapii ludzi i zwierząt [78]. Endotoksyny bakteryjne po dostaniu się do krwioobiegu mogą wywołać gorączkę, niedociśnienie, niewydolność oddechową, wstrząs endotoksyczny i w ostateczności sepsę. Dlatego opracowano wiele metod pozwalających na usunięcie endotoksyn z preparatów białek rekombinowanych [45]. Dodatkowo nadekspresja białek rekombinowanych w *E. coli* może prowadzić do tworzenia nieaktywnych, nierozpuszczalnych agregatów zwanych ciałkami inkluzyjnymi (IB – inclusion bodies). Jedną z dróg, aby uniknąć lub zmniejszyć produkcję IB jest obniżenie temperatury lub taka zmiana warunków hodowli, która spowoduje zarówno wzrost ekspresji białka jak i wpłynie na jego rozpuszczalność [23].

Pierwszym biofarmaceutykiem wyprodukowanym na drodze inżynierii genetycznej w *E. coli* była ludzka insulina. Dokonał tego zespół Davida Goeddela (Genentech) w 1978 roku. Następnie firmy Genentech i Lilly podpisały umowę o komercjalizacji rekombinowanej insuliny, która w 1982 r. została dopuszczona do obrotu przez FDA. Były to preparaty Humulin R (insulina szybko działająca) i Humulin N (NPH, insulina o pośrednim tempie działania) [32, 56]. Większość rekombinowanych białek o właściwościach terapeutycznych wytwarzanych w systemie *E. coli* jest wykorzystywanych w leczeniu chorób zakaźnych, grupy chorób endokrynologicznych czy zaburzeń metabolicznych [20]. W komórkach *E. coli* z powodzeniem produkuje się: interferony (alfa-1, alfa-2a, alfa-2b i gamma-1b), albuminę ludzką, hormony (analogi insuliny, kalcytoninę, hormon przytarczyc, ludzki hormon wzrostu, glukagon, somatopinę), interleukiny 11 i 2, TNF-alpha (tumor necrosis factor, czynnik martwicy nowotworu), G-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów), aktywator plazminogenu [20] i wiele rekombinowanych enzymów wykorzystywanych w diagnostyce i biologii molekularnej [37].

Oprócz szczepów *E. coli*, kolejne drobnoustroje wykazują potencjał aplikacyjny jako „fabryki komór-

kowe” do produkcji białek rekombinowanych. Jednym z nich jest *Lactobacillus lactis* należący do grupy probiotycznych bakterii o statusie GRAS (Generally Regarded as Safe) wywierających korzystny wpływ na zdrowie człowieka. Bakterie te nie produkują endotoksyn, dzięki czemu mogą być stosowane do produkcji leków i żywności [12]. Dodatkowo *L. lactis* ma zdolność wydzielania wyprodukowanych białek do podłoża hodowlanego przez system sekrecyjny typu *Sec* [35]. W szczepie tym wykorzystuje się różne promotory indukowane warunkami stresowymi środowiska, tj.: zmianami pH czy temperatury hodowli. Prawdopodobnie najbardziej znanym przykładem jest promotor indukowany nizyną, który wraz z elementami regulatoryjnymi z operonu *nis* pochodzącego z *L. lactis* tworzy system ekspresyjny zwany NICE (the Nisin-Inducible Controlled gene Expression system) wykorzystany do produkcji lizostafiny i białek błonowych [51]. Kolejnym przykładem jest promotor P170 aktywowany przez spadek pH (poniżej wartości 6) podczas przejścia komórek z wykładniczej w stacjonarną fazę wzrostu w hodowli prowadzonej z dodatkiem glukozy [51]. System ten ma znaczącą zaletę. Ulega samoindukcji poprzez gromadzący się w podłożu podczas wzrostu bakterii kwas mlekowy. W ten sposób system bazujący na promotorze P170 może być z łatwością wykorzystany w produkcji [41]. W 2003 roku bakterie z gatunku *L. lactis* po raz pierwszy zostały wykorzystane do nadprodukcji eukariotycznego białka błonowego – ludzkiego receptora KDEP1 (endoplasmic reticulum protein retention receptor – receptor odpowiedzialny za interakcję z białkami endoplazmatycznymi) bez tworzenia ciał inkluzyjnych [42].

Kolejnymi drobnoustrojami wykorzystywanymi w produkcji białek rekombinowanych są bakterie z rodzaju *Pseudomonas* charakteryzujące się szybkim tempem wzrostu i zdolnością do sekrecji białek. Kilka szczepów jak *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* czy *P. putida* są dobrą alternatywą dla systemów ekspresyjnych opartych o szczepy *E. coli*. Hodowla bakterii z rodzaju *Pseudomonas* w bioreaktorach nie wymaga tak ścisłej kontroli parametrów napowietrzania i stężenia cukru w podłożu, jak w przypadku *E. coli*, przy jednoczesnym zachowaniu dużej produkcji biomasy i wysokiej ekspresji białka rekombinowanego [12]. U *P. aeruginosa* do sekrecji białek z cytoplazmy na zewnątrz komórki wykorzystywany jest tzw. system sekrecji typu III. Bakterie te wykorzystano do opracowania systemu ekspresyjnego, w którym 54 aminokwasowy peptyd sygnałowy pochodzący z endotoksyny S (Exo S) połączono z produkowanym białkiem znajdującym się pod kontrolą indukowalnego promotora P_{tac} . System ten był aktywowany w komórce poprzez niedobór wapnia w środowisku wzrostu bakterii uzyskiwany przez dodanie EGTA (związek chelatujący – kwas

etylenoglikol-*O-O'*-bis(2-aminoetyl)-*N,N,N',N'*-tetraoctowy) do podłoża hodowlanego [16].

Bakterie Gram-dodatnie z rodzaju *Bacillus* są także wykorzystywane jako gospodarze do produkcji białek rekombinowanych. Zaletą tego gatunku jest brak LPS w strukturze ich osłon komórkowych, produkcja białek o statusie GRAS i wydzielanie białka bezpośrednio do pożywki hodowlanej oraz brak tworzenia ciał inkluzyjnych. Dwie ostatnie własności znacznie ułatwiają proces oczyszczania produktu białkowego. Z drugiej strony system oparty o bakterie z rodzaju *Bacillus* obarczony jest wadami tj.: (i) wytwarzanie dużych ilości komórkowych proteaz, które mogą degradować strukturę produkowanego białka; (ii) niestabilność plazmidów w komórkach; (iii) trudność hodowli komórek do dużej gęstości [78]. Pomimo to, ze względu na rozliczne powyżej wymienione zalety, bakterie z rodzaju *Bacillus* są chętnie wykorzystywane w biotechnologii. Najczęściej wykorzystywane gatunki to: *B. megaterium*, *B. subtilis* oraz *B. brevis*, w których przykładowo wyprodukowano: amylazę, EGF (Epidermal Growth Factor – czynnik wzrostu naskórka), interferony, lipazę A, acylazę penicylinową, stafylokinazę, streptawidynę [15, 75]. W celu wykorzystania bakterii z rodzaju *Bacillus* do produkcji białek rekombinowanych konstruuje się metodami inżynierii genetycznej szczepy posiadające stosunkową niską aktywność proteaz, niosące stabilne plazmidy i zdolność wzrostu w różnych warunkach odżywczych. Pierwszym takim szczepem był skonstruowany w 1984 roku *B. subtilis* z delecją genów *aprA* i *nprE*, kodujących proteazy [39]. Natomiast w innym szczepie *B. megaterium* zastosowano stabilny plazmid z promotorem, pochodzącym z operonu związanego z wykorzystaniem ksylozy, umożliwiającym wysoką ekspresję białek heterologicznych. Układ ten indukowany był 0,5% ksylozą, a blokowany obecnością glukozy w podłożu [40].

Wiele innych drobnoustrojów jak: *Streptomyces*, *Corynebacterium* [12], *Caulobacter*, *Methylobacterium*, *Anabaena* czy *Staphylococcus carnosus* [75] jest także wykorzystywanych do produkcji białek rekombinowanych w systemach prokariotycznych.

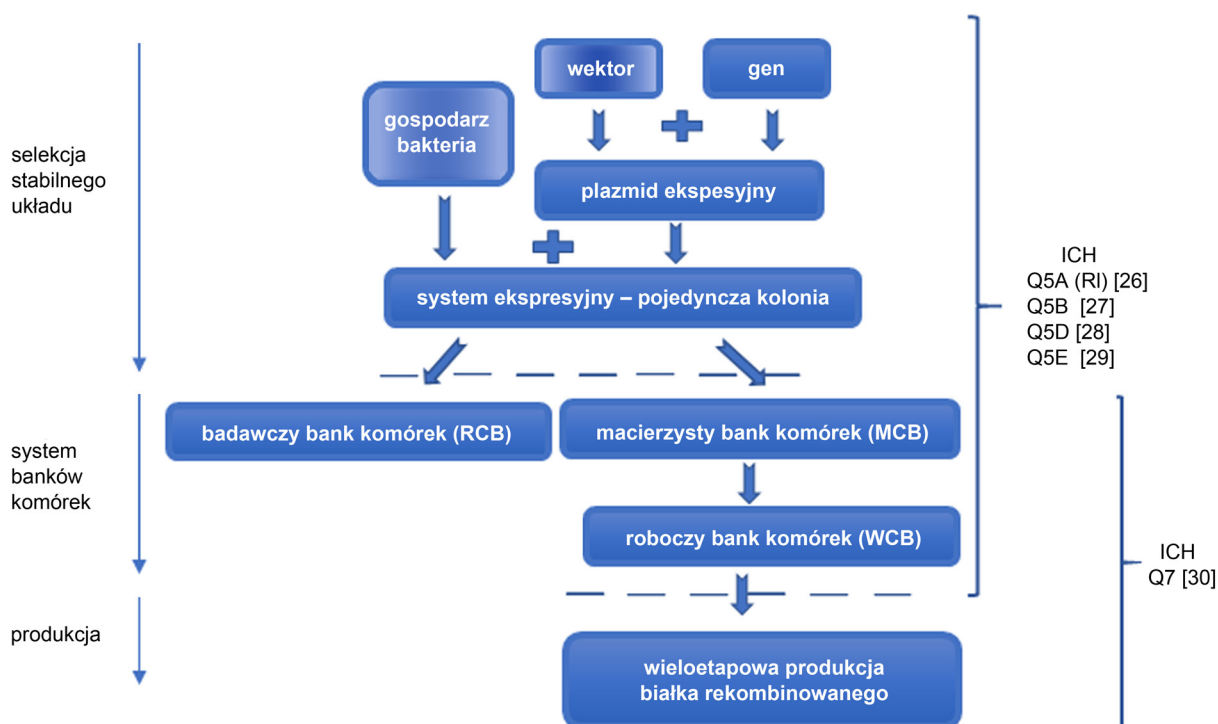
Jednak jako organizmy prokariotyczne, powyżej opisane drobnoustroje nie są wykorzystywane do syntezy białek o dużych masach cząsteczkowych lub pochodzących z wyższych organizmów. Białka te wykazują bowiem często skomplikowaną budowę, wymagając obecności mostków disiarczkowych lub chaperonów komórkowych do uzyskania odpowiedniej konformacji [20]. Ponadto, wiele z tych białek wymaga po syntezie dodatkowych modyfikacji potranslacyjnych, które nie mogą być wykonane w organizmach prokariotycznych, np.: glikozylacji czy fosforylacji, a które są zasadniczą cechą wielu białek eukariotycznych [57]. Jednak niski koszt i łatwa hodowla bakterii jest niezrównaną prze-

wagą nad jakimkolwiek innym systemem ekspresji, a zatem mimo opisanych ograniczeń drobnoustroje są zawsze preferowanym wyborem zarówno w skali laboratoryjnej jak i w skali przemysłowej [38]. Obecnie biofarmaceutyki wytwarzane techniką rekombinacji DNA pochodzące z prokariotycznych systemów ekspresyjnych stanowią 1/3 dostępnych leków sprzedawanych na rynku [37].

3. System banków komórek

Podczas wytwarzania biofarmaceutyków nie utrzymuje się hodowli bakteryjnej w sposób ciągły (pasażowanie szczepu). Ciągłe pasażowanie jest niekorzystne, ze względu na ryzyko zanieczyszczenia szczepu produkcyjnego innym materiałem biologicznym obecnym w laboratorium oraz przede wszystkim ze względu na możliwość dryfu genetycznego (możliwość zajścia spontanicznej mutagenyzy), co w konsekwencji może spowodować utratę stabilności genotypowej/fenotypowej szczepu, a więc jego cech charakterystycznych [21, 66]. W celu uniknięcia tego zjawiska wytwarzany jest tzw. system banków komórek umożliwiający zapewnienia tego samego, niezmiennego materiału wyjściowego dla całego procesu wytwarzania [10, 21]. Tworzenie banków komórek zmniejsza koszty ciągłej hodowli oraz umożliwia przechowanie materiału komórkowego w postaci niezmiennego i nienaruszonego, dzięki czemu jest to dobra alternatywa dla hodowli ciągłej. W dalszej części pracy omówiony zostanie sposób zakładania i prowadzenia bakteryjnych banków komórek (Microbial Cell Banks).

Obecnie dostępnych jest wiele różnych systemów ekspresyjnych: wektorów ekspresyjnych i szczepów gospodarzy – opisanych w podrozdziale 2. pozwalających na wydajną produkcję białek rekombinowanych. Wybór systemu zależy od sposobu prowadzenia hodowli komórkowej, rodzaju i poziomu ekspresji białka, lokalizacji produkowanego białka oraz wymaganych modyfikacji potranslacyjnych, jak również aktywności biologicznej. Szczep bakteryjny gospodarza powinien być przede wszystkim pod względem genetycznym kompatybilny z zastosowanym wektorem, aby produkcja heterologicznego białka była jak najbardziej efektywna [80]. Najważniejszym aspektem jest stabilność plazmidowego DNA (pDNA) w komórkach bakteryjnych (stabilności: strukturalna i segregacyjna), ponieważ cały proces wytwarzania białka rekombinowanego w szczepie produkcyjnym odbywa się bez zastosowania antybiotyków. Plazmid bez presji antybiotykowej powinien utrzymywać się w szczepie gospodarza przez minimum 80 generacji, aby taka „para” została zaklasyfikowana jako stabilny układ ekspresyjny. Organizacje międzynarodowe jak WHO (w raporcie dotyczącym



Ryc. 1. Poszczególne etapy produkcji biofarmaceutyków w systemie prokariotycznym

Wyszczególniono etapy (selekcja stabilnego układu, system banków komórek, produkcja białka rekombinowanego) z zaznaczeniem, które wytyczne ICH (The International Council on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) są istotne na poszczególnych etapach wytwarzania. Podczas zakładania banków komórek najważniejsze wskazówki zawarte są w ICH Q5B i ICH Q5D (zmodyfikowany wg [14]). Macierzysty bank komórek (MCB – Master Cell Bank); badawczy bank komórek (RCB – Research Cell Bank); roboczy bank komórek (WCB – Working Cell Bank); ICH Q5 (Q5 – quality of biotechnological products) – wytyczne związane z jakością produktów biotechnologicznych wytwarzanych zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Wytwarzania; ICH Q5A [26], ICH Q5B [27], ICH Q5D [28], ICH Q5E [29], ICH Q7 [30].

standaryzacji produktów biologicznych) [79] oraz EMA (w normach mówiących o produktach leczniczych w fazie badań przedklinicznych i klinicznych) [18] nakazują ostrożne i przemyślane stosowanie markerów selekcyjnych, jakimi są geny oporności na antybiotyki w procesach technologicznych. Wytwórca powinien rozważyć możliwość niewykorzystywania antybiotyków podczas wytwarzania białka rekombinowanego. Dodatkowo Zaleski P. i wsp. wskazują, iż ze względu na rozprzestrzenianie się w środowisku genów oporności na antybiotyki na drodze horyzontalnego transferu genów nie jest akceptowalne wykorzystanie ich w badaniach klinicznych. Pozostałości antybiotyków w produktach leczniczych mogą także negatywnie wpłynąć na jakość ostatecznego produktu i na zdrowie człowieka [81]. Ponadto stosowany szczep bakterii powinien być pozbawiony jak największej liczby endogennych proteaz, które mogą degradować syntetyzowane polipeptydy [71].

Po wybraniu odpowiedniego systemu ekspresyjnego, umożliwiającego wysoką i stabilną ekspresję białka rekombinowanego, kolejnym krokiem jest wytworzenie w pełni opisanych i scharakteryzowanych banków komórek. Ogólne wymagania dotyczące produkcji biofarmaceutyków zaczynając od tworzenia banków komórek, a kończąc na rejestracji produktów leczniczych stosowanych w leczeniu ludzi i zwierząt zawarte

są w Farmakopei Polskiej i normach ICH opracowanych przez The International Council on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH dostarcza wytwórcom (np. firmom biofarmaceutycznym) wytyczne umożliwiające produkcję bezpiecznych i dobrze scharakteryzowanych produktów leczniczych (Ryc. 1).

Białka rekombinowane wytwarzane są w drodze inżynierii genetycznej, w której DNA kodujący konkretny produkt wprowadzany jest przy użyciu wektora ekspresyjnego do odpowiedniego drobnoustroju (bakterii), gdzie gen dla założonego produktu białkowego (tzw. gene of interest) ulega ekspresji i produkowane jest białko w ściśle kontrolowanych warunkach wzrostu [7]. Komórki bakteryjne przed wprowadzeniem wektora nazywane są komórką gospodarza, a stabilny układ komórki gospodarza i wektora nazywany jest układem gospodarz–wektor. Zgodnie z wytycznymi zawartymi w ICH Q5B [27] oraz Farmakopei Polskiej [19] charakterystyka układu gospodarz–wektor jest pierwszym wymaganym etapem w całym procesie technologicznym. ICH Q5B przedstawia wskazówki dotyczące konstrukcji i charakterystyki wektora ekspresyjnego oraz szczepu gospodarza. Wytwórca powinien wykazać przydatność wybranego układu gospodarz–wektor poprzez:

- charakterystykę materiału wyjściowego (komórek gospodarza), która obejmuje: określenie jego pochodzenia: gatunku/rodzaju, fenotypu, genotypu, liczby pasaży. Komórki gospodarza mogą pochodzić z wyizolowanych własnych linii laboratoryjnych lub bezpośrednio z kolekcji kultur np. ATCC (American Type Culture Collection) lub innej. Wytwórca powinien również dostarczyć informacji o patogenności szczepu (jeśli taka istnieje);
- charakterystykę wektora ekspresyjnego, która obejmuje: udokumentowanie strategii klonowania, pochodzenia i charakterystyki danego genu, analizę sekwencji nukleotydowej i struktury wektora, wykazanie pochodzenia poszczególnych elementów wektora, np.: *origin* replikacji (miejsce startu replikacji), genów oporności, promotorów, wzmacniaczy ekspresji itp. Celem analizy strukturalnej wektora metodami inżynierii genetycznej jest wykazanie, iż prawidłowa sekwencja DNA kodująca konkretne białko zostanie wprowadzona do komórek gospodarza i będzie ulegała stabilnej ekspresji podczas prowadzenia hodowli;
- charakterystykę układu gospodarz–wektor, która obejmuje: opis mechanizmu wprowadzenia wektora do komórek bakteryjnych, określenie liczby kopii i stabilności wektora w szczepie gospodarza (stabilność segregacyjna – stopień utrzymywania się w szczepie bez presji antybiotykowej), opisanie metod wykorzystanych do wzmacniania i kontroli ekspresji białka rekombinowanego oraz opis opracowanych kryteriów selekcji kolonii produkujących białko rekombinowane.

Po selekcji pojedynczej kolonii produkującej białko rekombinowane następuje wytworzenie banków komórek. System banków komórek zapewnia, że identyczna populacja komórek jest zawsze zachowana, co jest kluczowym elementem pozwalającym na tworzenie jednorodnych produktów biotechnologicznych. Odpowiednio przygotowany, opisany, przechowywany i scharakteryzowany bank komórek, dodatkowo założony w bezpiecznych, kontrolowanych i monitorowanych warunkach zapewnia zawsze to samo źródło materiału wyjściowego wykorzystywanego w całym procesie technologicznym. Banki komórek powinny być tworzone zgodnie z zasadami GMP (Good Manufacturing Practice). Zasady GMP zapewniają wysoką jakość i czystość materiałów użytych do produkcji oraz pełną kontrolę nad sposobem i miejscem wytwarzania. Stosowanie tych reguł podnosi poziom bezpieczeństwa dla wytwarzanych produktów biotechnologicznych, ponieważ pozwala w pełni odtworzyć każdy etap procesu technologicznego [17, 25].

Bank komórek bakteryjnych stosowany do wytwarzania wektorów plazmidowych zdefiniowany został jako homogenna (w pełni określona) zawiesina wyjś-

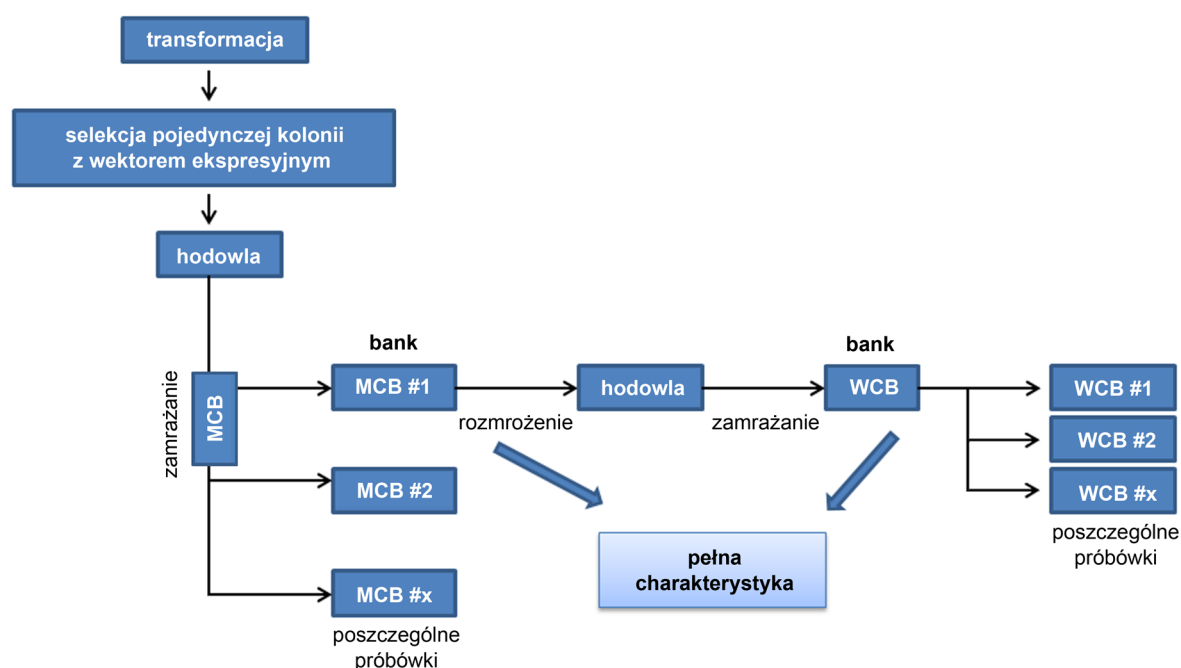
ciowych komórek bakteryjnych rozdzielonych do poszczególnych pojemników w trakcie pojedynczej operacji, poddawanych wspólnie obróbce, w taki sposób, by zapewnić ich stabilność, czystość i identyczność. Powinien on być przechowywany w ściśle określonych warunkach np. w temperaturze -70°C lub niższej. W zależności od typu użytego organizmu różne metody przechowywania komórek są dopuszczalne, ale powinny one zawsze zapewnić odpowiedni poziom żywotności komórek przez długi okres przechowywania [19].

Wytwórcy mogą przygotować własne banki komórek zgodnie z wymaganiami GMP lub pozyskiwać je ze źródeł zewnętrznych. Następnie są oni odpowiedzialni za zapewnienie odpowiedniej jakości każdego banku komórek poprzez przeprowadzenie badań na każdym z nich bez względu na ich źródło pochodzenia.

Zgodnie z wytycznymi zawartymi w ICH Q5D [28] istnieje możliwość tworzenia dwu- lub jedno-poziomowego systemu banku komórek. Przed rozpoczęciem produkcji biofarmaceutyku zakłada się dwa typy banków komórek, nazywanych odpowiednio: macierzysty bank komórek (MCB – Master Cell Bank) oraz roboczy bank komórek (WCB – Working Cell Bank), nazywany również przez wytwórców jako MWCB (Manufacturer's Working Cell Bank) [25, 64, 66]. Macierzysty bank komórek zakładany jest jako pierwszy, bezpośrednio z pojedynczej dobrze wyodrębnionej kolonii bakteryjnej, uzyskanej po transformacji szczepu bakteryjnego wektorem ekspresyjnym, selekcionowanej na podłożu z antybiotykiem. Uzyskana następnie hodowla bakteryjna zostaje zmieszana z czynnikiem ochronnym (np. krioprotektorem), jest porcjowana i zamrażana w próbkach przeznaczonych do głębokiego mrożenia. MCB powinien zawierać odpowiednią liczbę próbek z zamrożonymi hodowlami, tak aby zapewnić dostateczną ilość jednolitego materiału wyjściowego dla całego procesu produkcyjnego. Przy tworzeniu MCB powinny być zachowane wszelkie środki ostrożności w celu uniknięcia zanieczyszczeń krzyżowych innym materiałem biologicznym [74]. Należy również zauważyć, iż MCB powinien być najpierw w pełni scharakteryzowany, zanim zostanie wykorzystany do wytworzenia WCB.

W następnej kolejności z jednej lub wielu próbek z MCB zakładany jest WCB, stanowiący bezpośredni materiał wykorzystywany do produkcji białka w bioreaktorach [10]. Jeżeli do fermentacji wykorzystywanych jest więcej niż jedna próbka z WCB, zawiesina komórek (tzw. inokulum) do szczepień bioreaktora produkcyjnego powinna być przygotowana tak, by pozwoliła uzyskać jednorodny materiał biologiczny.

Wytyczne ICH Q5D wskazują, że banki komórek MCB i WCB mogą różnić się od siebie pewnymi czynnikami, jak na przykład, składnikami podłoży



Ryc. 2. Główna zasada zakładania bakteryjnych banków komórek

Macierzysty bank komórek (MCB – Master Cell Bank) zakładany jest jako pierwszy z pojedynczej dobrze wyselekcjonowanej kolonii bakteryjnej uzyskanej po transformacji komórek gospodarza wektorem ekspresyjnym. Następnie z próbówki MCB zakładany jest roboczy bank komórek (WCB – Working Cell Bank). Oba wyprodukowane banki komórek powinny być scharakteryzowane przed dopuszczeniem ich do dalszych etapów produkcji białka rekombinowanego (określenie właściwości i czystości szczepu). Rycina zmodyfikowana, na podstawie [66].

hodowlanych i warunkami prowadzenia hodowli. Podobnie warunki użyte do przygotowania MCB i WCB mogą różnić się od tych używanych bezpośrednio podczas produkcji białka w bioreaktorach. Jednakże dopóki zmiany te nie wpływają na poziom ekspresji białka rekombinowanego są dopuszczalne.

W procesie produkcyjnym zazwyczaj przygotowuje się około 100 próbek MCB oraz 100–500 próbek WCB [66] (Ryc. 2). Wytyczne ICH dopuszczają także możliwość tworzenia systemu produkcji opartego jedynie o nowo założony MCB, w przypadku kiedy niewielka liczba zamrożonych porcji (próbek) jest niezbędna do wytwarzania pożądanego produktu w każdym cyklu produkcyjnym [9]. W niektórych przypadkach oprócz MCB/WCB wymagane jest także założenie oddzielnych banków: jeden dla samych komórek gospodarza (szczep bakteryjny bez plazmidu) i drugi dla samego DNA wektora ekspresyjnego (pDNA zamrożony w buforze umożliwiającym długotrwałe przechowywanie materiału bez degradacji jego struktury, np. w buforze TE). Wytwórca do celów badawczych, do opracowania poszczególnych etapów „własnej” technologii i jej optymalizacji może również założyć badawczy bank komórek (RCB – Research Cell Bank).

Każdy Wytwórca po założeniu systemu banków komórek musi opracować pełną dokumentację potwierdzającą każdy etap produkcji. Powinna ona zawierać historię hodowli szczepu gospodarza, metodę izolacji

szczepu, opis wszystkich manipulacji genetycznych, metodę wprowadzania wektora do komórek bakteryjnych, metodę selekcji wybranego klonu, odczynnik używany do hodowli komórek i wytworzenia banku, metodę zamrażania oraz liczbę pasażu komórek. Następnie należy szczegółowo opisać: rodzaj zastosowanego systemu bankowego (jedno- czy dwu-poziomowy), określić wielkość banku (liczbę przygotowanych próbek), sposób zamykania próbek (czy wykorzystano próbki z nakrętkami z gwintem wewnętrznym czy zewnętrznym), metodę wykorzystaną do przygotowania banku/banków, w tym rodzaj stosowanych środków do mrożenia komórek oraz warunków przechowywania próbek. Wytwórca musi posiadać opracowane procedury stosowane w celu uniknięcia skażenia mikrobiologicznego oraz zanieczyszczenia krzyżowego przygotowanego banku innymi typami komórek obecnymi w laboratorium oraz posiadać system rejestru każdej pojedynczej próbki banku. Dokumentacja powinna zawierać opis systemu etykietowania oraz rodzaj użytych etykiet, które muszą wytrzymać proces przechowywania bez utraty zawartych informacji. Każda próbka banku powinna być opisana nazwą szczepu, datą produkcji, swoim kodem i numerem [74].

Dla zapewnienia ciągłej, nieprzerwanej produkcji biofarmaceutyków, wytwórca powinien dokładnie rozważyć wszystkie kroki, które należy podjąć, aby zabezpieczyć produkcję przed nieplanowymi zdarzeniami, takimi jak: pożary, przerwy w dostawie energii

elektrycznej czy błędy ludzkie. Banki komórek powinny być przechowywane w ściśle określonych warunkach, umożliwiających długotrwałą stabilność szczepu produkującego białko rekombinowane (przykładowo: w $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ lub w ultra niskiej temperaturze – ciekły azot). Stabilność szczepu w warunkach przechowywania powinna być sprawdzana za pomocą określenia jego przeżywalności (szczegóły – punkt 4.1). Zaleca się także, aby banki komórek wykorzystywane w produkcji były przechowywane w dwóch lub więcej miejscach danego obiektu lub oddalonych od siebie ośrodkach w celu uniknięcia ewentualnych strat w razie zdarzenia losowego, katastrofy naturalnej lub awarii w obrębie fabryki. Wszystkie przechowywane pojemniki powinny być traktowane identycznie, a próbka raz wyjęta z zamrożonego banku nie ma prawa być ponownie w nim zdeponowana. Zgodnie z wytycznymi ICH, dostęp do banków komórek powinien być ograniczony i w pełni kontrolowany. Należy prowadzić rejestr lokalizacji, tożsamości i inwentaryzacji każdej pojedynczej próbki ze szczepem produkcyjnym [66]. Oba banki (MCB i WCB) powinny być przechowywane w identycznych warunkach.

4. Charakterystyka banków komórek

Zgodnie z wytycznymi zawartymi w ICH Q5D [28] oraz Farmakopei Polskiej [19] każda nowo powstała partia MCB oraz WCB powinna być najpierw w pełni scharakteryzowana przed dopuszczeniem jej do dalszych etapów produkcji białek rekombinowanych [7]. Ze względu na fakt, iż wszystkie banki WCBs są

zakładane z dobrze scharakteryzowanego MCB, mogą być one przebadane w bardziej ograniczony sposób, koncentrując się głównie na badaniu zanieczyszczeń mikrobiologicznych, do jakich mogło dojść podczas przygotowywania próbek ze szczepem produkcyjnym. Nowo powstały MCB jest zazwyczaj badany tylko raz [10, 66]. Każdy z banków komórek przed przeprowadzeniem wszystkich badań ma nadany status – „w kwarantannie”. Po uzyskaniu prawidłowych wyników zostaje dopiero dopuszczony do dalszych etapów procesu wytwarzania.

Wybrana strategia badań (typ metod zastosowanych do badania banków) zależy od typu banku, rodzaju szczepu oraz samego Wytwórcy. Zawsze należy w pełni scharakteryzować co najmniej jeden z banków komórek (MCB lub WCB). Przy braku możliwości dokładnej charakterystyki banku wyjściowego, można dokonać dokładnej charakterystyki każdej nowo powstałej partii WCBs. Schemat podstawowych oznaczeń jakie należy przeprowadzić dla poszczególnych banków komórek MCB oraz WCB zgodnie z Farmakopeą Polską przedstawiono w Tabeli I. Są to jednak tylko ogólne wskazówki. Wytwórca musi sam opracować poszczególne metody analityczne do charakterystyki banków komórek. Farmakopea Polska wskazuje, iż należy również scharakteryzować szczep gospodarza.

4.1. Potwierdzenia tożsamości (właściwości) szczepu bakteryjnego

Wytwórca powinien potwierdzić tożsamość/właściwości szczepu bakteryjnego zdeponowanego w banku komórek poprzez wykonanie szeregu oznaczeń

Tabela I
Charakterystyka bakteryjnych banków komórek

Badanie	Szczep gospodarza	MCB	WCB
Tożsamość i czystość			
Żywotność	+	+	+
Charakterystyka szczepu bakteryjnego	+	+	–
Genotypowanie/fenotypowanie	+	+	–
Obecność plazmidu:			
• sekwencjonowanie plazmidowego DNA	–	+	–
• liczba kopii	–	+	+
• mapa restrykcyjna	–	+	+
• zawartość procentowa komórek zawierających plazmid	–	+	+
Obce czynniki zewnątrzpochodne			
Czystość metodą posiewu na podłoża	+	+	+
Obecność bakteriofagów	+	+	–

„+” – oznacza konieczność wykonania oznaczenia dla danego banku

„–” – oznacza brak konieczności wykonania oznaczenia dla danego banku

Badania wymagane na każdym etapie wytwarzania dla szczepu gospodarza, macierzystego banku komórek (MCB) oraz roboczego banku komórek (WCB) (wg Farmakopea Polska, wydanie XI (2017) [19]).

Tabela II
Przykłady metod, które mogą zostać wybrane do charakterystyki szczepów bakteryjnych banków komórek

Metoda	System	Producent	Ilość zidentyfikowanych szczepów (wielkość baz danych)
Metody fenotypowe			
Testy biochemiczne	API oraz ID32	bioMerieux, Francja	822 gatunki bakterii i drożdży, w tym 32 nowo zidentyfikowane i 67, którym nadano nowe nazwy [2]
	BBL Crystal	Becton Dickinson, USA	> 500 taksonów [5]
	Biolog Microbial ID	Biolog, USA	> 2900 gatunków bakterii tlenowych i beztlenowych, drożdży i grzybów [8]
	Vitek 2 Compact	bioMerieux, Francja	> 553 różnych taksonów [76]
	BD Phoenix1	Becton Dickinson, USA	319 taksonów [6]
Analiza estrów metylowych kwasów tłuszczowych	Sherlock Microbial Identification System (MIDI)	MIDI, USA	> 2500 gatunków: w tym 960 gatunków izolowanych ze środowiska, 593 gatunki kliniczne, 42 gatunki promieniowców, 31 gatunków <i>Mycobacterium</i> , 895 gatunków beztlenowych mikroorganizmów i 216 gatunków drożdży [67]
Metody proteomiczne			
MALDI TOF	MALDI Biotyper	Bruker Daltonik, Niemcy	> 2750 gatunków, w tym 471 gatunków bakterii, 152 gatunki grzybów oraz 164 gatunki <i>Mycobacterium</i> [46]
	Vitek MS	BioMerieux, Francja	1316 gatunków, 217 nowych gatunków bakterii (w tym 40 beztlenowych i 55 grzybów) [77]
Spektroskopia FTIR	FTIR Biotyper	Bruker Daltonik, Niemcy	> 6534 widm dla drożdży, bakterii rodzaju: <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , bakterii kwasu mlekowego i octowego, <i>Listeria</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Micrococcus</i> oraz bakterii Gram-dodatnich i beztlenowych [22]
Metody genetyczne			
Analiza kwasów nukleinowych	MicroSeq Microbial Identification System	Thermo Fisher Scientific, USA	> 2300 gatunków bakterii i 1100 gatunków grzybów [50]
Rybotyping	RiboPrinter System	DuPont Nutrition and Health, USA	> 6900 wzorów dla mikroorganizmów, a w tym 290 rodzajów i 1400 gatunków oraz serotypów kluczowych dla przemysłu spożywczego i farmaceutycznego [58]

Na podstawie [61].

opisanych poniżej. Musi również wykazać, iż szczep bakteryjny z banku komórek ma identyczne właściwości jak użyty szczep gospodarza.

Określenie żywotności szczepu bakteryjnego

Oznaczenie żywotności szczepu bakteryjnego należy wykonać poprzez wysianie odpowiedniego rozcieńczenia płynnych zawiesin komórek bakteryjnych na podłoże nieselekcyjne i policzenie wyrosłych pojedynczych kolonii bakterii, a następnie określić liczbę jednostek tworzących kolonie (cfu/ml) [70]. Otrzymany wynik należy porównać z liczbą bakterii określoną przed zamrożeniem szczepu. Umożliwia to potwierdzenie prawidłowości doboru metody zamrażania [10, 41].

Określenie cech szczepu bakteryjnego

Dobór testów wykorzystanych do charakterystyki szczepu z banków komórek zależy jest od typu gospodarza użytego do produkcji białka rekombinowanego. Analizy należy opracować tak, by potwierdzić tożsamość szczepu na poziomie rodzaju czy gatunku. Badania można przeprowadzić na trzech płaszczyznach: analizy

fenotypowe, analizy proteomiczne czy analizy genetyczne (Tabela II). Poniżej przedstawiono przykładowe metody badań, które Wytwórca może zastosować do charakterystyki swojego bakteryjnego banku komórek:

- a) metody fenotypowe – umożliwiają określenie cech fenotypowych bakterii i identyfikację drobnoustroju do rodzaju, a czasem gatunku, na podstawie niewielkiej ilości przeprowadzonych obserwacji [63]. Wytwórca może wybrać następujące metody:
- testy biochemiczne – oparte są na zdolnościach drobnoustrojów do przeprowadzania konkretnych reakcji biochemicznych. Możemy wykorzystać systemy: API/ID32, BBL Crystal, Biolog Microbial, VITEK2 czy BD Phoenix. Metody te dają tzw. „metaboliczny odcisk palca” dla wybranego drobnoustroju [61, 73];
 - profil estrów metylowych kwasów tłuszczowych (FA – fatty acid) – przy pomocy chromatografii gazowej o wysokiej rozdzielczości oznaczana jest charakterystyczna ilość i wzór estrów metylowych kwasów tłuszczowych [54]. Skład kwasów tłuszczowych poszczególnych drobnoustrojów jest

stabilny i wykazuje wysoki stopień powinowactwa w danej grupie taksonomicznej [61].

b) metody proteomiczne:

- spektrometria w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) – jest to łatwa i bezpieczna metoda do identyfikacji bakterii, polegająca na tworzeniu charakterystycznych widm w zależności od rodzaju i ilości składników komórkowych bakterii, takich jak: kwasy tłuszczowe, białka membranowe, polisacharydy, kwasy nukleinowe czy białka wewnątrzkomórkowe [82];

- spektrometria mas – MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) – metoda ta jest szybka oraz bardzo czuła. Umożliwia otrzymanie widm charakterystycznych dla poszczególnych gatunków bezpośrednio z komórek bakteryjnych jak i ich lizatów. Na identyfikację bakterii tą metodą nie mają wpływu warunki i czas hodowli szczepu [69].

c) metody genetyczne – pozwalają na charakterystykę szczepu na podstawie określenia jego specyficznych cech genotypowych. Analiza genetyczna jest metodą mniej subiektywną, mniej zależną od warunków hodowli i bardziej wiarygodną w stosunku do oceny fenotypowej, gdyż sekwencja DNA poszczególnych genów jest konserwowana wśród gatunków [61]. Wśród przykładów metod genetycznych wykorzystywanych do identyfikacji bakterii można wyróżnić:

- system MicroSeq ID – umożliwia identyfikację gatunku/rodzaju bakterii na podstawie analizy sekwencji nukleotydowej pierwszych 500 pozycji wysoce konserwatywnych regionów DNA kodującego 16S rRNA (16S rybosomalny RNA – składnik małej podjednostki rybosomów u prokariotów). W celu identyfikacji drobnoustroju uzyskana sekwencja nukleotydowa genu jest porównywana z sekwencjami dostępnymi w bazie danych [73]. U bakterii jednego gatunku/rodzaju, występują te same rejony konserwatywne, co umożliwia określenie pokrewieństwa bakterii, a następnie przypisanie ich do konkretnej jednostki taksonomicznej. W przypadku blisko spokrewnionych bakterii można zastosować analizę całej sekwencji genu, w celu uzyskania wiarygodnego wyniku identyfikacji (1500 pozycji);

- system RiboPrinter – zautomatyzowany system typu „Southern Blot” wykorzystujący znakowane fluorescencyjnie sekwencje ssDNA (sondy) specyficzne wyłącznie do sekwencji DNA kodującego: 5S rRNA, 16S rRNA, 23S rRNA, rejony pomiędzy tymi genami, jak i geny zlokalizowane po każdej stronie (tzw. Ribotyping). Charakterystyczny wzór fragmentów DNA (dla danego drobnoustroju) uzyskany po hybrydyzacji porównywany jest ze wzorami dostępnymi w bazach danych. Jest to

metoda szybka, odtwarzalna i specyficzna dla szerokiego zakresu gatunków bakterii [31];

- multiplex PCR – metoda genetyczna oparta o technikę PCR, w której wykorzystywany jest zestaw starterów zaprojektowanych dla specyficznych fragmentów genów genomowego DNA występujących wyłącznie u poszczególnych gatunków bakterii. W rozdziale elektroforetycznym w żelu agarozowym otrzymywany jest odpowiedni „wzór fragmentów DNA” charakterystyczny dla poszczególnych gatunków [24].

Potwierdzenie struktury i stabilności wektora ekspresyjnego w szczepie bakteryjnym

Transformacja szczepu gospodarza wektorem ekspresyjnym kodującym dane białko rekombinowane powoduje szereg obciążeń fizjologicznych dla komórki, co może bezpośrednio przekładać się na stabilność plazmidu. Niestabilność plazmidu w szczepie może wynikać z dwóch podstawowych powodów: z niestabilności strukturalnej plazmidu spowodowanej przez zmiany w obrębie sekwencji DNA (mutacje punktowe, delecje, insercje lub inne) lub z niestabilności segregacyjnej spowodowanej przez wadliwy rozdział plazmidów do komórek potomnych po podziale komórkowym [68].

Wśród czynników wpływających na stabilność strukturalną plazmidu możemy wyróżnić: wielkość plazmidu, obecność w jego strukturze sekwencji poliA, powtórzeń sekwencji (DR – direct repeat), odwróconych powtórzeń sekwencji (IR – inverted repeat), sekwencji insercyjnych (IS – insertion sequence), jak również stesy środowiskowe, takie jak: stężenie antybiotyku, typ podłoża hodowlanego, temperatura hodowli czy stężenie tlenu w podłożu [68]. Natomiast niestabilność segregacyjna plazmidu jest powiązana z metabolicznym obciążeniem szczepu bakteryjnego podczas produkcji białka w procesie fermentacji. Zwiększona ekspresja białka rekombinowanego może blokować segregację cząsteczek plazmidu, a także obniżać zdolność systemów bakteryjnych do naprawy błędów powstałych podczas replikacji w DNA plazmidowym. Po drugie, obserwuje się niższe tempo wzrostu komórek niosących plazmid w porównaniu z komórkami pozbawionymi plazmidów [80]. Kolejną dobrze znaną przyczyną niestabilności segregacyjnej plazmidów jest również akumulacja multimerów plazmidowych, co prowadzi do zaburzenia ich segregacji, zwiększając prawdopodobieństwo utraty plazmidu przez komórki. Chociaż multimery nie pojawiają się często, to nagromadzają się szybko w komórkach, a komórki wolne od plazmidu namnażają się w dużej liczbie [4, 72]. Wybrana metoda fermentacji w procesie wytwarzania białka rekombinowanego również wpływa na stabilność plazmidu [68].

Inne czynniki, takie jak gen oporności na antybiotyki i liczba kopii może również wpływać na stabilność

segregacyjną plazmidu [68]. Uważa się, że plazmidy o dużej liczbie kopii obciążają metabolizm szczepu gospodarza, powodując obniżenie produkcji białka i tempa wzrostu komórek [34].

Podsumowując, dla produkcji białek rekombinowanych w systemach prokariotycznych kluczowym aspektem jest wybór wektora o odpowiedniej strukturze i jego stabilność w szczepie bakteryjnym. Niestabilność wektora jest bowiem głównym problemem podczas produkcji białka w bioreaktorach: powoduje zmniejszoną wydajność produkcji białka (pojawienie się w hodowli komórek bez wektora mogących szybko zdobyć przewagę w populacji mieszanej), a w konsekwencji wzrost kosztów procesu wytwarzania [7, 80]. Plazmid stabilny umożliwia stałą ekspresję produktu docelowego [43]. Według Farmakopei Polskiej [19], podczas pracy z wektorem ekspresyjnym, stabilność strukturalna plazmidu powinna być weryfikowana w określonym interwale czasu przez sekwencjonowanie całej sekwencji nukleotydowej plazmidu, a także poddanie plazmidowego DNA działaniu endonukleaz restrykcyjnych. Analizy należy wykonać z wystarczającą rozdzielczością, aby sprawdzić, czy struktura plazmidu pozostaje niezmienną w komórkach bakteryjnych [68]. Do potwierdzenia obecności i zbadania stabilności plazmidu Wytwórca może wykorzystać następujące metody:

- oznaczenie liczby kopii: należy wykazać, że liczba kopii rekombinowanego plazmidu przypadająca na chromosom jest niezmienna w komórkach gospodarza, niezależnie od warunków hodowli. Do tej analizy potrzebna jest wiarygodna metoda ilościowego oznaczania liczby kopii jaką jest Real-time PCR [43];
- sekwencjonowanie plazmidowego DNA: potwierdzenie całej sekwencji nukleotydowej wektora ekspresyjnego z wykorzystaniem specyficznych starterów;
- stworzenie mapy restrykcyjnej wektora: działanie na pDNA wektora endonukleazami restrykcyjnymi (enzymami restrykcyjnymi) jest zalecane w celu potwierdzenia poprawności struktury plazmidu obecnego w komórkach. Enzymy restrykcyjne należy dobrać tak, aby uzyskane wielkości fragmentów DNA po ich działaniu na plazmidowe DNA były łatwe w obserwacji (np.: po wizualizacji rozdziału elektroforetycznego w żelu agarozowym) i reprezentatywne (charakterystyczne dla danego wektora);
- określenie stabilności segregacyjnej wektora (zawartości procentowej komórek niosących plazmid w całej puli komórek): określenie procentu komórek bakteryjnych utrzymujących wektor ekspresyjny przez kolejne generacje hodowli bakteryjnej prowadzonej przez cztery doby na podłożu minimalnym w dwóch wariantach: z i bez

presji antybiotykowej. Stosunek (wyrażony w procentach) liczby komórek antybiotykoopornych do liczby komórek obecnych w całej populacji pozwala na określenie stabilności wektora. Równolegle zaleca się ocenę poziomu ekspresji białka rekombinowanego poprzez rozdział SDS-PAGE (elektroforeza białek w warunkach denaturujących) próbek hodowli bakteryjnej pobieranej po każdym pasażu (analizie nie podlega sekwencja aminokwasowa produkowanego białka) [13, 68].

4.2. Potwierdzenie czystości szczepu bakteryjnego

Krytycznym elementem wytwarzania banków komórek jest ich czystość (tzw. jednorodność szczepu) rozumiana jako monokultura mikrobiologiczna. Według Farmakopei Polskiej jest to ocena obecności obcych czynników zewnątrzpochodnych i wirusów endogennych. ICH Q5D wskazuje, iż opracowując metody umożliwiające ocenę czystości szczepu zdeponowanego w banku Wytwórca może oprzeć się na danych literaturowych. Dobierając analizy, należy wziąć pod uwagę z jakimi innymi drobnoustrojami pracuje się w danej jednostce oraz jakie materiały wykorzystuje się do pracy z nimi. Należy również określić punkty krytyczne przy przygotowywaniu banków, w których może dojść do krzyżowego zanieczyszczenia heterologicznym materiałem biologicznym (bakteriami, grzybami, drożdżami lub bakteriofagami). Dobór metod powinien mieć na celu samo wykrycie ewentualnych zanieczyszczeń, bez konieczności ich identyfikacji [10]. Według Farmakopei Polskiej [19] wytwórca powinien potwierdzić czystość szczepu na dwóch poziomach:

- obecności zanieczyszczeń mikrobiologicznych metodą posiewu na podłoża – ocenę czystości można przeprowadzić poprzez wysianie szczepu na różne podłoża nioselekcyjne celem wykrycia potencjalnych zanieczyszczeń krzyżowych (należy dobrać warunki inkubacji w oparciu o typ drobnoustrojów, które mogą zanieczyścić szczep docelowy). Przykładowe podłoża wykorzystywane do selekcji zanieczyszczeń to: TSA – Tryptic Soy Agar lub SDA – Sabouraud Agar. Wytwórca może również przeprowadzić analizę mikroskopową badanego materiału [55];
- obecności zanieczyszczeń szczepu bakteriofagami/profagami – bakteriofagi mogą zakażać komórki bakteryjne gospodarza powodując ich lizę (cykl lityczny) lub włączać się w ich genom i przechodzić w tzw. cykl lizogenny (profagi) [61]. Zakażenie komórek bakteryjnych fagami jest bardzo niebezpieczne dla procesu produkcyjnego, zwłaszcza, gdy hodowla przeprowadzana jest na dużą skalę w bioreaktorach. Powoduje to zahamowanie wzrostu bakterii, a następnie lizę komórek,

a w konsekwencji duże straty podczas procesu produkcji. Jeśli bakteriofag zakazi hodowlę w bioreaktorze, to potencjalnie może rozprzestrzenić się w całej jednostce (np. hali produkcyjnej) oraz przetrwać tam przez długi okres czasu (w zależności od własności samego bakteriofaga). Proces dekontaminacji pomieszczeń i sprzętów jest trudny i skomplikowany. Problemy spowodowane przez fagi mogą pojawić się nagle, a nawet nawracać kilka miesięcy po pierwotnym zakażeniu [44, 47]. Dodatkowo wiadomo, że szczepy lizogennizowane (to znaczy niosące zintegrowane profagi) mogą wykazywać wolniejsze tempo wzrostu względem ich nie-lizogennych odpowiedników, a wydajność syntezy bioproduktów w tych szczepach jest znacznie niższa [33]. Dlatego bardzo ważnym aspektem jest analiza czystości mikrobiologicznej banku przed rozpoczęciem procesu produkcji. W celu sprawdzenia ewentualnej obecności bakteriofagów w szczepie można stosować standardową metodę płytek dwuwarstwowych [1] oraz metodę indukcji profagów UV/mitomycyną C (są to czynniki indukujące przechodzenie profagów z cyklu lizogennego w cykl lityczny [53]). Druga metoda umożliwia wykrycie obecności potencjalnych profagów w genomie szczepu. Jako użyteczne podejście do identyfikacji szczepów lizogennych można użyć także metody PCR, wykorzystującej startery specyficzne dla genu kodującego fagową integrację. Metoda ta umożliwia potwierdzenie obecności docelowej sekwencji fagowej w genomie szczepu [48, 52].

Banki komórek MCB i WCB, aby mogły zostać dopuszczone do produkcji biofarmaceutyków muszą być najpierw w pełni zbadane i scharakteryzowane. Powinny być wolne od jakichkolwiek zakażeń krzyżowych innymi bakteriami, grzybami czy bakteriofagami/profagami. Aby produkcja białka rekombinowanego na dużą skalę była możliwa i opłacalna dla wytwórcy, wektor ekspresyjny musi utrzymywać się stabilnie w wybranym szczepie produkcyjnym przez około 80 generacji bez presji antybiotykowej. Dodatkowo przeprowadzona analiza rekombinowanego pDNA gwarantuje, iż właściwa sekwencja nukleotydowa kodująca białko została wprowadzona do szczepu gospodarza i będzie utrzymywana podczas hodowli przez cały proces produkcyjny.

5. Podsumowanie

Jedną z przyczyn szybkiego rozwoju rynku farmaceutycznego jest coraz większa liczba opracowanych technologii wytwarzania biofarmaceutyków. Dużą część produkowanych białek o właściwościach terapeutycznych pochodzi obecnie z bakteryjnych systemów

ekspresyjnych. W celu zapewnienia jednolitego materiału wyjściowego dla całego procesu technologicznego konieczne jest założenie banków komórek z zachowaniem odpowiednich standardów jakościowych. Macierzysty bank komórek (MCB) tworzony jest jako pierwszy w ściśle określonych warunkach na podstawie szczegółowo opisanych procedur, z pojedynczej dobrze wyselekcjonowanej i scharakteryzowanej kolonii bakteryjnej. Roboczy bank komórek (WCB) przygotowany jest w drugiej kolejności, z jednej lub kilku probówek MCB. Banki te muszą być scharakteryzowane pod względem właściwości szczepu oraz być wolne od wszelkich zakażeń krzyżowych, do jakich mogło dojść podczas ich wytwarzania. Dobrze opracowany system zakładania i charakterystyki MCB/WCB ma decydujące znaczenie dla kolejnych faz rozwoju produktu biotechnologicznego, a następnie zatwierdzenia go do użycia przez odpowiednie urzędy odpowiedzialne za proces rejestracji leków, jak np. EMA czy FDA. Na potrzeby procesu wytwarzania (własnego „know-how”), potencjalny Wytwórca sam musi odpowiednio dobrać zestaw metod i procedur niezbędnych do pracy z bankami.

Piśmiennictwo

- Anderson B., Rashid M.H., Carter C., Pasternack G., Rajanna C., Revazishvili T., Dean T., Senecal A., Sulakvelidze A.: Enumeration of bacteriophage particles: comparative analysis of the traditional plaque assay and real-time QPCR – and nanosight-based assays. *Bacteriophage*, **1**, 86–93 (2011)
- API and ID32 system. https://www.biomerieux.fr/sites/subsidiary_uk/files/api-id32-identification-databases.pdf (23.01.2019)
- Baeshen M.N., Al-Hejin A.M., Bora R.S., Ahmed M.M., Ramadan H.A., Saini K.S., Baeshen N.A., Redwan E.M.: Production of biopharmaceuticals in *E. coli*: current scenario and future perspectives. *J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 953–962 (2015)
- Balding C., Balby I., Summers D.: A mutational analysis of the ColE1-encoded cell cycle regulator Rcd confirms its role in plasmid stability. *Plasmid*, **56**, 68–73 (2006)
- BBL Crystal identification system. <https://www.bd.com/en-us/offers/capabilities/microbiology-solutions/identification-and-susceptibility-testing/bbl-crystal-identification-system> (23.01.2019)
- BD Phoenix system. [file:///C:/Users/Post%20C4%99py%20Mikro/Downloads/DS_IDS_Phoenix-identification-taxa-sell-sheet_BR_EN%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Post%20C4%99py%20Mikro/Downloads/DS_IDS_Phoenix-identification-taxa-sell-sheet_BR_EN%20(1).pdf) (23.01.2019)
- Bhopale G.M., Nanda R.K.: Recombinant DNA expression products for human therapeutic use. *Curr. Sci.* **89**, 614–622 (2005)
- Biolog ID system. <https://biolog.com/products-portfolio-overview/microbial-identification/> (23.01.2019)
- Bird P., Hale G.: Cell banks and stability of antibody production. *Methods Mol. Med.* **40**, 303–307 (2000)
- Cabrera C.M., Cobo F., Nieto A., Cortes J.L., Montes R.M., Catalina P., Concha A.: Identity tests: determination of cell line cross-contamination. *Cytotechnol.* **51**, 45–50 (2006)
- Carrier T., Donahue-Hjelle L., Stramaglia M.: Banking parental cells according to cGMP guidelines. A practical approach to developing stable cell line. *BioProcess Int.* **7**, 20–25 (2009)

12. Chen R.: Bacterial expression system for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnol. Adv.* **30**, 1102–1107 (2012)
13. Chen X.A., Xu Z.N., Cen P.L.: Enhanced plasmid stability and production of hEGF by immobilized recombinant *E. coli* JM101. *Biochem. Eng. J.* **28**, 215–219 (2006)
14. Conner J., Wuchterl D., Lopez M., Minshall B., Prusti B., Prusti R., Boclarl D., Peterson J., Allen Ch.: The biomanufacturing of biotechnology products (w) *Biotechnology Entrepreneurship*, red. C. Shimasaki, Elsevier, 2014, s. 351–385
15. Demain A.L., Vaishnav P.: Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol. Adv.* **27**, 297–306 (2009)
16. Derouazi M., Toussaint B., Quenee L., Epaulard O., Guillaume M., Marleu R., Polack B.: High-yield production of secreted active proteins by the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretin system. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 3601–3604 (2008)
17. EU guidelines for Good Manufacturing Practice for medicinal products for human and veterinary use – volume 4. Annex 2 – Manufacture of biological active substances and medicinal products for human use. Ref. Ares(2012)778531 – 28/06/2012 (2012) (23.01.2019)
18. European Medicines Agency (EMA): Note for guidance on the quality, preclinical and clinical aspects of gene transfer medicinal products. CPMP/BWP/3088/99 (2001) (23.01.2019)
19. Farmakopea Polska XI. 5.14. Produkty lecznicze przeniesienia genu do stosowania u ludzi, 2017, s. 913–917.
20. Ferrer-Miralles N., Domingo-Esoin J., Corchero J.L., Vazquez E., Villaverde A.: Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microb. Cell Fact.* **8**, DOI: 10.1186/1475-2859-8-17 (2009)
21. Fieder J., Wagner N., Grammatikos S., Hoffmann H., Kaufmann H., Otto R.T.: Use of flow-cytometric analysis to optimize cell banking strategies for production of biopharmaceuticals from mammalian cells. *J. Biotechnol.* **120**, 111–120 (2005)
22. FR-IR Biotyper. https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/OpticalSpectroscopy/FT-IR/HTS-XT/AN/AN406_YeastsBacteria_inFood_EN.pdf (23.01.2019)
23. Gopal G.J., Kumar A.: Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Protein J.* **32**, 419–425 (2013)
24. Healy M., Lupski J.R. i wsp.: Microbial DNA typing by automated repetitive sequence based PCR. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 199–207 (2005)
25. Hesse F., Wagner R.: Developments and improvements in the manufacturing of human therapeutics with mammalian cell substrates. *Trends Biotechnol.* **18**, 173–180 (2000)
26. ICH Q5A (R1). The international conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Viral safety evolution of biotechnology products derived from cell line of human or animal origin. https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5A_R1/Step4/Q5A_R1_Guideline.pdf (23.01.2019)
27. ICH Q5B. The international conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Quality of biotechnological products: analysis of expression construct in cell lines used for production of r-DNA derived protein products. CPMP/ICH/139/95. https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5B/Step4/Q5B_Guideline.pdf (23.01.2019)
28. ICH Q5D. The international conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Derivation and characterization of cell substrate used for production of biotechnological/biological products. CPMP/ICH/294/95. https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5D/Step4/Q5D_Guideline.pdf (23.01.2019)
29. ICH Q5E. The international conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Comparability of biotechnological/biological products subject to changes in their manufacture process. https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5E/Step4/Q5E_Guideline.pdf (23.01.2019)
30. ICH Q7. The international conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Good manufacturing practice guide for active pharmaceutical ingredients. https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q7/Step4/Q7_Guideline.pdf (23.01.2019)
31. Jeffrey M., Koeller J., Zdunek J., Byrne R.: Validation of an enhanced method of bacterial ribotyping for improved efficiency and identification of stressed isolates. *Pharm. Technol.* **28**, 156–166 (2004)
32. Johnson I.S.: Human insulin from recombinant DNA technology. *Science*, **219**, 632–637 (1983)
33. Jones D.T., Shirley M., Wu X., Keis S.: Bacteriophage infections in the industrial acetone butanol (AB) fermentation process. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**, 21–26 (2000)
34. Jones K.L., Kim S.W., Keasling J.D.: Low-copy plasmids can perform as well as or better than high-copy plasmids for metabolic engineering of bacteria. *Metab. Eng.* **2**, 328–338 (2000)
35. Jorgensen C.M., Casper M., Vrang A., Madsen S.M.: Recombinant protein expression in *Lactococcus lactis* using the P170 expression system. *FEMS Microbiol. Lett.* **351**, 170–178 (2014)
36. Joseph B.C., Pichaimuthu S., Srimeenakshi S., Murthy M., Selvakumar K., Ganesan M., Sadananda R.M.: An overview of the parameters for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J. Cell Sci. Ther.* **6**, DOI:10.4172/2157-7013.1000221 (2015)
37. Jozala A.F., Geraldes D.C., Tundisi L.L., Feitosa V.A., Breyer C.A., Cardoso S.L., Mazzola P.G., Oliveira-Nascimento L., Rangel-Yagui C.O., Magalhães P.O., Oliveira M.A., Pessoa A.J.: Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. *Braz. J. Microbiol.* **47**, 51–63 (2016)
38. Kamionka M.: Engineering of therapeutic proteins production in *Escherichia coli*. *Curr. Pharmaceutical Biotechnol.* **12**, 268–274 (2011)
39. Kawamura F., Doi R.H.: Construction of a *Bacillus subtilis* double mutant deficient in extracellular alkaline and neutral proteases. *J. Bacteriol.* **160**, 442–444 (1984)
40. Kim L., Mogk A., Schumann W.: A xylose-inducible *Bacillus subtilis* interaction vector and its application. *Gene*, **181**, 71–76 (1996)
41. Koenig G.L.: Viability of and plasmid retention in frozen recombinant *Escherichia coli* over time: a ten-year perspective study. *Appl. Environment. Microbiol.* **69**, 6605–6609 (2003)
42. Kunji E.R., Slotboom D.J., Poolman B.: *Lactococcus lactis* as host for overproduction of functional membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1610**, 97–108 (2003)
43. Lee C., Kim J., Shin S.G., Hwang S.: Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **123**, 273–280 (2006)
44. Łoś M., Czyż A., Sell E., Węgrzyn A., Neubauer P., Węgrzyn G.: Bacteriophage contamination: is there a simply method to reduce its deleterious effects in laboratory cultures and biotechnological factories? *J. Appl. Genet.* **45**, 111–120 (2004)
45. Mack L., Brill B., Delis N., Groner B.: Endotoxin depletion of recombinant protein preparations through their preferential binding to histidine tags. *Analytical Biochem.* **466**, 83–88 (2014)
46. MALDI Biotyper system. <https://www.bruker.com/products/mass-spectrometry-and-separations/maldi-biotyper-for-microbiological-research.html> (23.01.2019)

47. Marco M.B., Moineau S., Quiberoni A.: Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage*, **2**, 149–158 (2012)
48. Martin M.C., Ladero V., Alvarez M.A.: PCR identification of lysogenic *Lactococcus lactis* strains. *J. Verbrauch. Lebensm.* **1**, 121–124 (2006)
49. Matejczyk M.: Environmental and recombinant microorganism for biopharmaceuticals production. *Civ. Environment. Eng.* **5**, 15–21 (2014)
50. MicroSEQ ID microbial identification scientific. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A30373> (23.01.2019)
51. Morello E., Bermúdez-Humarán L.G., Llull D., Sole V., Miraglio N., Langella P., Poquet I.: *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 48–58 (2008)
52. O'Sullivan D., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Coffey A.: Investigation of the relationship between lysogeny and lysis of *Lactococcus lactis* in cheese using prophage-targeted PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2192–2198 (2000)
53. Oliveira J., Mahony J., Hanemaaijer L., Thijs R.H.M., Neve H., MacSharry J., van Sinderen D.: Detecting *Lactococcus lactis* prophages by mitomycin C-mediated induction coupled to flow cytometry analysis. *Front Microbiol.* **8**, 1343 (2017)
54. Olson W.P., Groves M.J., Klegerman M.E.: Identification of bacterial contamination in a pharmaceutical manufacturing facility by GC FA analysis. *Pharm. Technol.* **14**, 32–36 (1990)
55. Pinevich A.V., Andronov E.E., Pershina E.V., Pinevich A.A., Dmitrieva H.Y.: Testing culture purity in prokaryotes: criteria and challenges. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **111**, 1509–1521 (2018)
56. Quianzon C.C., Cheikh I.: History of insulin. *J. Community Hosp. Intern. Med. Perspect.* **2**, DOI: 10.3402/jchimp.v2i2.18701 (2012)
57. Rai M., Padh H.: Expression systems for production of heterologous proteins. *Curr. Sci.* **80**, 1121–1128 (2001)
58. RiboPrinter system. <https://www.hygiena.com/riboprinter-system-technology.html> (23.01.2019)
59. Rosano G.L., Ceccarelli E.A.: Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advance and challenges. *Front. Microbiol.* **5**, 172, DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172 (2014)
60. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 1 października 2008 roku w sprawie Dobrej Praktyki Wytwarzania. Dziennik Ustaw Nr 184 pozycja 1143, <http://prawo.sejm.gov.pl/isap.nsf/DocDetails.xsp?id=WDU20081841143> (23.01.2019)
61. Sakhano N.G., Gunar O.V.: Microbial identification methods in pharmaceutical analysis: comparison and evaluation. *M. J. Pharm.* **1**, 001 (2016)
62. Sanchez-Garcia L., Martin L., Mangues R., Ferrer-Miralles N., Bazquez E., Villaverde A.: Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. *Microb. Cell Fact.* **15**, 33 (2016)
63. Sandle T.: Automated microbial identification: a comparison of USP and EP approaches. *Am. Pharm. Rev.* **4**, 56–61 (2013)
64. Schiff L.J.: Review: production, characterization, and testing of banked mammalian cell substrates used to produce biological products. *In vivo Cell Dev. Biol. Anim.* **4**, 65–70 (2005)
65. Sekhon B.S.: Biopharmaceuticals: an overview. *Thai J. Pharm. Sci.* **34**, 1–19 (2010)
66. Seth G.: Recent advances in optimal cell banking of mammalian cells for biopharmaceutical production. *Pharm. Bioprocess*, **3**, 35–43 (2015)
67. Sherlock Microbial Identification System (MIDI). <http://midi-inc.com/pages/shimadzu.html> (23.01.2019)
68. Silva F., Queiroz J.A., Domingues F.C.: Evaluation metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*. *Biotechnol. Adv.* **30**, 691–708 (2012)
69. Singhal N., Kumar M., Kanaujia P.K., Virdi J.S.: MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* **6**, 791 (2015)
70. Sinha J., Inan M., Fanders S., Taoka S., Gouthro M., Swanson T., Barent R., Barthuli A., Loveless B.M., Smith L.A., Smith T., Henderson I., Ross J., Meagher M.M.: Cell bank characterization and fermentation optimization for production of recombinant heavy chain C-terminal fragment of botulinum neurotoxin serotype E (rBoNTE(Hc): antigen E) by *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* **127**, 462–474 (2007)
71. Sorensen H.P., Mortensen K.K.: Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **115**, 113–128 (2005)
72. Summers D.K., Betton C.W., Withers H.L.: Multicopy plasmid instability: the dimer catastrophe hypothesis. *Mol. Microbiol.* **8**, 1031–1038 (1993)
73. Sutton S.: Qualification of a microbial identification system. *J. Valid. Technol.* **17**, 50–53 (2011)
74. Sutton A.: Product development of probiotics as biological drugs. *Clin. Infect. Dis.* **46**, S128–132 (2008)
75. Terpe K.: Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 211–222 (2006)
76. Vitek 2 Compact system. https://www.biomerieux-usa.com/sites/subsidiary_us/files/18-vitek2-systembrochure_v2_0.pdf (23.01.2019)
77. Vitek MS.: <https://www.biomerieux-diagnostics.com/vitek-ms-0> (23.01.2019)
78. Westers L., Westers H., Quax W.: *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Bioch. Biophys. Acta*, **1694**, 299–310 (2004)
79. WHO Expert Committee on Biological Standardization, 66th Report, Annex 2. WHO Press, Geneva, 2015, s. 93–130 (23.01.2019)
80. Xu J., Li W., Zhang Y., Zhiu Z., Liu J., Hu Z.: Stability of plasmid and expression of a recombinant gonadotropin-releasing hormone (GnRH) vaccine in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**, 780–788 (2006)
81. Zaleski P., Wawrzyniak P., Sobolewska A., Płucienniczak P.: Plazmidy jako wektory do terapii genowej. *Post. Mikrobiol.* **56**, 214–225 (2017)
82. Zarnowicz P., Lechowicz Ł., Czerwonka G., Kaca W.: Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) as a tool for the identification and differentiation of pathogenic bacteria. *Curr. Med. Chem.* **22**, 1710–1718 (2015)

DEZYNFEKCJA PRZECIWWIRUSOWA W OBSZARZE MEDYCZNYM

Agnieszka Trzcińska

Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny

Wpłynęło w czerwcu 2018 r., zaakceptowano w styczniu 2019 r.

Streszczenie: Zakażenia szpitalne (Hospital-Acquired Infections – HAI) stanowią poważny problem zdrowia publicznego. Problem ten dotyka setki milionów ludzi każdego roku i często prowadzi do wielu poważnych komplikacji zdrowotnych. Proces dezynfekcji, który jest podstawą zabiegów sanitarnych i higienicznych w placówkach medycznych, takich jak szpitale, przychodnie, gabinety stomatologiczne itp. jest ważnym elementem zapobiegania i zwalczania zakażeń wirusowych. Dezynfekcja jest złożonym procesem, na skuteczność którego ma wpływ wiele czynników. Środek dezynfekcyjny oprócz tego, że wymaga odpowiedniego stosowania, musi również spełniać pewne kryteria, w tym szeroki zakres aktywności biobójczej potwierdzony przez dobrze znane i dobrze zaprojektowane metody badawcze.

1. Wprowadzenie. 2. Dezynfekcja. 3. Skuteczność procesu dezynfekcji. 4. Wymagania stawiane środkom dezynfekcyjnym. 5. Badanie aktywności wirusobójczej środków dezynfekcyjnych. 6. Dezynfekcja przeciwwirusowa – aspekty praktyczne

ANTIVIRAL DISINFECTION IN THE MEDICAL AREA

Abstract: Hospital-acquired infections (HAIs) are a serious public health problem. This problem affects hundreds of millions of people every year, leading to many serious health complications. Disinfection is an important element in the prevention and control of viral infections, which is the basis of sanitation and hygiene processes in medical facilities such as hospitals, outpatient clinics, dental offices, etc. The disinfection is a complex process, the efficacy of which is influenced by many factors. The disinfectant, apart from the fact that it requires competent and proper use, also has to meet certain criteria, including the wide range of biocidal activity confirmed by well-known and well-designed research methods.

1. Introduction. 2. Disinfection. 3. The effectiveness of the disinfection process. 4. Requirements for disinfectants. 5. Testing of virucidal activity of disinfectants. 6. Antiviral disinfection – practical aspects

Słowa kluczowe: dezynfekcja, wirusy, badanie aktywności wirusobójczej

Key words: disinfection, viruses, virucidal activity testing

1. Wprowadzenie

Zakażenia nabywane w czasie pobytu w szpitalu lub związane z opieką medyczną (HAI – Hospital Acquired Infections; health care-associated infections) są poważnym problemem zdrowia publicznego. Problem ten corocznie dotyka setki milionów ludzi na całym świecie, prowadząc w wielu przypadkach do poważnych komplikacji zdrowotnych, a nawet śmierci, przedłuża pobyt w szpitalu i tym samym generuje wysokie koszty. Zakażenia te dotyczą nie tylko, choć w przeważającej części, pacjentów, ale i pracowników służby zdrowia. W krajach rozwiniętych problem zakażeń szpitalnych dotyczy 5–15% pacjentów, przy czym istotne jest, że w większości przypadków są to zakażenia, których można by było uniknąć lub im zapobiec [9, 55].

Wśród potencjalnych źródeł tego typu zakażeń (w tym zakażeń wirusowych) najczęściej wymienia się często dotykane powierzchnie środowiskowe (HTS – High Touch Surfaces, np. półki, meble, zasłony, pościel, ubrania, komputery, telefony) oraz wszystkie elementy sprzętu medycznego, z których transmisja patogenów może odbywać się poprzez bezpośredni kontakt pacjenta z powierzchnią lub pośrednio przez ręce lub rękawiczki ochronne personelu medycznego [9, 20, 50]. Dla przykładu wiele patogenów wirusowych jest zdolnych do przeżycia na rękach czy rękawiczkach od 2 minut do godziny [32], a po zasiedleniu danej powierzchni wirusy mogą pozostać w środowisku przez długi okres czasu [42]. Przy optymalnych warunkach pH, temperatury i wilgotności, niektóre z wirusów mogą pozostać zakaźne na powierzchni nawet przez

* Autor korespondencyjny: Agnieszka Trzcińska, Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny; 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24; tel. 22 542 12 30; e-mail: atrzcinska@pzh.gov.pl

dłuższy czas [17, 53]. Do patogenów wirusowych, które mogą zanieczyszczać powierzchnie środowiskowe należą m.in. koronawirusy, rotawirusy oraz norowirusy. Badania wykazały, że norowirusy charakteryzują się zdolnością do zachowania wirulencji na powierzchniach przez długi okres czasu [1, 9, 51, 52] i często są przenoszone z zanieczyszczonych powierzchni na opuszki palców, a następnie na kolejne powierzchnie takie jak pokrywy toalet, klamki, telefony [2]. Transmisja patogenów z zanieczyszczonych powierzchni jest uzależniona od czasu trwania i częstości kontaktu, zdolności patogenu do przeżycia na powierzchni i jego oporności na działanie dezynfektantów.

Źródłem zakażenia mogą być też powierzchnie narzędzi i sprzętów medycznych (takich jak, np. endoskopy i stetoskopy, narzędzia stomatologiczne, itd. gdzie dochodzi do kontaktu z błonami śluzowymi, śliną czy krwią pacjenta), dlatego sterylizacja i odkażanie narzędzi oraz sprzętu medycznego odgrywa ważną rolę w zapobieganiu HAI [23]. Najczęstszymi zakażeniami szpitalnymi, które mogą być skutkiem nieodpowiednich procedur sterylizacji i odkażania narzędzi oraz sprzętu medycznego są m.in. różnego rodzaju zakażenia związane z zabiegami chirurgicznymi, z użyciem cewnika moczowego, respiratora, jak również zakażenia HBV, HCV, HIV [18, 55].

Wzrost świadomości na temat rozprzestrzeniania się oporności na środki biobójcze wśród patogenów sprawia, że coraz więcej uwagi zaczyna się poświęcać działaniom praktycznym związanym ze skuteczną dekontaminacją środków ochrony osobistej zanieczyszczonych drobnoustrojami patogennymi [24, 26, 55], przestrzeganiu odpowiedniej higieny rąk, która jest kluczowym elementem strategii zapobiegania zakażeniom związanym z opieką zdrowotną [31, 54] oraz inwestuje w środki na rzecz wzmocnienia infrastruktury, które mają pomóc w zapobieganiu i kontroli zakażeń.

2. Dezynfekcja

Dezynfekcja jest ważnym elementem w profilaktyce i zwalczaniu zakażeń m.in. wirusowych, który stanowi podstawę zabiegów sanitarnych oraz procesów utrzymania higieny w placówkach medycznych, takich jak szpitale, przychodnie, gabinety stomatologiczne, itd. [7, 41]. Według „Wielkiego Słownika Medycznego” [25] dezynfekcja to niszczenie w środowisku zewnętrznym zarazków chorobotwórczych za pomocą środków chemicznych lub czynników fizycznych. Nowszą definicją podawaną przez Centers for Disease Control and Prevention (CDC) mówi, iż dezynfekcja to proces, który eliminuje większość lub wszystkie drobnoustroje chorobotwórcze, z wyłączeniem spor bakteryjnych, na

obiektach nieożywionych w celu zapobiegania zakażeniu [40]. W placówkach opieki medycznej dezynfekcja jest prowadzona przy użyciu metod chemicznych lub fizycznych. Zatem głównym celem dezynfekcji jest eliminacja lub redukcja drobnoustrojów do takiego poziomu, że zdezynfekowany obiekt nie może być dłużej źródłem zakażenia. Ze względu na czas, w którym jest prowadzona dezynfekcja, może ona mieć charakter: 1) bieżący, gdy podejmowana jest w ogniskach zakażenia, np. bezpośrednio w otoczeniu osoby chorej/nosiciela oraz w środowisku osób chorych/nosicieli w celu zabicia zarazków chorobotwórczych w wydalinach i wydzielinach lub 2) końcowy, gdy przeprowadzana jest w otoczeniu osoby zakażenie chorej po usunięciu jej z pomieszczenia albo po zakończeniu choroby i okresu zakaźności [40].

Biorąc pod uwagę zakres działania, procesy dezynfekcji możemy podzielić na [39, 40]:

- Wysokiego poziomu – inaktywowane są wszystkie drobnoustroje, z wyłączeniem dużej liczby spor bakteryjnych.
- Średniego poziomu – niszczone są formy wegetatywne bakterii, prątki, większość wirusów i grzybów, ale nie spory bakteryjne.
- Niskiego poziomu – niszczone są formy wegetatywne bakterii, niektóre wirusy i grzyby, ale nie prątki i spory bakteryjne.

Przykładowo: dezynfekcja wysokiego poziomu łączy przy odkażaniu wszystkich narzędzi, sprzętu medycznego i przedmiotów, które podczas zabiegów naruszają lub mogą naruszać tkanki miękkie i tkankę kostną; mają kontakt z jamami ciała, z uszkodzonymi i nieuszkodzonymi błonami śluzowymi oraz uszkodzoną skórą i ranami. Natomiast dezynfekcja niskiego poziomu dotyczy np. przedmiotów i narzędzi, które wchodzi w kontakt z nieuszkodzoną skórą [39, 40].

Proces dezynfekcji może być przeprowadzany różnymi metodami:

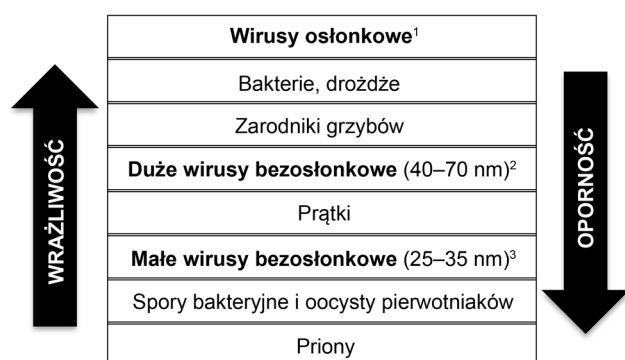
- Dezynfekcja metodami fizycznymi: 1) termiczna, przebiegająca z wykorzystaniem wody, pary wodnej lub suchego powietrza o wysokiej temperaturze oraz 2) nietermiczna, np. filtracja [27] lub promieniowanie ultrafioletowe (UV) stosowane głównie do dezynfekcji powietrza, wody i przede wszystkim nieosłoniętych powierzchni. Skuteczność promieniowania ultrafioletowego (UVC) do dezynfekcji powierzchni zanieczyszczonych wirusami potwierdziły m.in. badania prowadzone z MERS-CoV [3]. Opisano również proces fizycznej dezynfekcji z wykorzystaniem promieniowania UV w badaniach z wirusem adeno i kocim kaliciwirusem będącym modelem w badaniach nad kontaminacją norowirusami [14, 37, 49]. Dezynfekcja wykorzystująca promieniowanie ultrafioletowe o długości fali 253,7 nm jest ważną techniką inaktywacji dsDNA i ssRNA wirusów w wodzie [5].

- Dezynfekcja termiczno-chemiczna, która jest połączeniem działania środka chemicznego oraz podwyższonej temperatury (najczęściej w zakresie 50–70°C). Służy np. do dezynfekcji tekstyliów, sprzętu wrażliwego na wysoką temperaturę, dezynfekcji narzędzi stomatologicznych [19, 46].
- Dezynfekcja chemiczna, polega na zastosowaniu szerokiej gamy związków chemicznych o różnych właściwościach. W obszarze medycznym środki dezynfekcyjne mają charakter jednoskładnikowy lub zawierają wiele składników połączonych w różnych kombinacjach. Do najczęściej stosowanych substancji aktywnych należą: alkohole, chlor i jego związki, formaldehyd, aldehyd glutarowy, nadtlenek wodoru, jodofory, kwas nadoctowy, fenole, czwartorzędowe związki amoniowe (Tabela I). Celem użycia środków chemicznych jest przede wszystkim dezynfekcja powierzchni, narzędzi i rąk. W przypadku całych pomieszczeń np. szpitalnych może być wykorzystywana dezynfekcja fumigacyjna, czyli zamgławianie pomieszczeń mgłą mikrozołową, która zawiera chemiczny środek dezynfekcyjny lub dezynfekcja poprzez ozonowanie. Stosowanie chemicznych środków dezynfekcyjnych do dekontaminacji urządzeń medycznych oraz ukierunkowanej dezynfekcji powierzchni środowiskowych ma ogromne znaczenie dla ograniczania transmisji patogenów oraz kontroli zakażeń związanych z opieką zdrowotną [47].

3. Skuteczność procesu dezynfekcji

Proces dezynfekcji jest złożonym procesem, na skuteczność którego ma wpływ wiele czynników [40, 55]:

- Zróznicowana wrażliwość drobnoustrojów (Ryc. 1). Pod tym względem wirusy zostały sklasyfikowane w 3 grupach w oparciu o ich strukturę i lipofilność:



Ryc. 1. Wrażliwość/oporność drobnoustrojów i prionów na dezynfekcję

Objaśnienia: (1) – Wirusy osłonkowe, np. wirus grypy ptasiej H5N1, HBV, HCV, HIV, SARS-CoV, wirus Ebola, (2) – Duże wirusy bezosłonkowe, np. Adenowirusy, Papillomawirusy, Rotawirusy, (3) – Małe wirusy bezosłonkowe, np. Enterowirus 71, Norowirus, Poliowirus, Parwowirus B191, na podstawie: [21, 40, 43].

1. wirusy osłonkowe – bardzo wrażliwe na środki dezynfekcyjne;
 2. duże wirusy bezosłonkowe – charakteryzujące się średnią wrażliwością na dezynfektanty oraz
 3. małe wirusy bezosłonkowe – o wysokiej oporności na procesy dezynfekcji [28].
- Liczba drobnoustrojów w dezynfekowanym obszarze. Im większa jest liczba zakaźnych cząstek tym więcej czasu potrzebuje środek dezynfekcyjny do ich inaktywacji, przy stałej wartości innych czynników (stężenie preparatu, temperatura, pH, itd.).
 - Dostępność do skażonych powierzchni. Złożone urządzenia medyczne, jak również narzędzia posiadające szczeliny, kanaliki, liczne połączenia są dużo trudniejsze do dezynfekcji niż urządzenia o płaskich powierzchniach.
 - Skład produktu (wzajemne oddziaływanie składników) i jego stabilność (niektóre z środków dezynfekcyjnych mogą być niestabilne w „stężeniu roboczym” i mogą być w tej formie przechowywane i używane tylko przez ściśle określony czas).
 - Stężenie środka dezynfekcyjnego, które jest konieczne do osiągnięcia spodziewanego działania biobójczego.
 - Warunki w których zachodzi proces dezynfekcji (temperatura, pH, względna wilgotność, twardość wody). Aktywność większości (są wyjątki) środków dezynfekcyjnych wzrasta wraz ze wzrostem temperatury. Z drugiej strony, zbyt wysoka temperatura może powodować rozkład środka dezynfekcyjnego i osłabienie jego aktywności. Wzrost pH środowiska, w którym zachodzi dezynfekcja, poprawia aktywność niektórych preparatów jak aldehyd glutarowy i czwartorzędowe związki amoniowe, ale obniża aktywność fenoli, podchlorynów i jodu. Względna wilgotność ma wpływ na aktywność środków gazowych, a zbyt duża twardość wody może obniżać skuteczność niektórych związków.
 - Obecność biofilmu na dezynfekowanej powierzchni, który może chronić drobnoustroje przed działaniem środka dezynfekcyjnego.
 - Obecność organicznych i nieorganicznych zanieczyszczeń. Substancje organiczne (w postaci surowicy, krwi, ropy, kału, śluzu, itp.) mogą obniżać aktywność środka dezynfekcyjnego poprzez tworzenie z nim kompleksów o niższej/braku skuteczności lub mogą chronić drobnoustroje przed działaniem środka dezynfekcyjnego tworząc barierę (osłonę) fizyczną. Substancje nieorganiczne mogą chronić drobnoustroje przez np. zamknięcie ich w kryształach soli.
 - Czas kontaktu patogenu ze środkiem dezynfekcyjnym, czyli czas, w którym środek dezynfekcyjny jest w bezpośrednim kontakcie z dezynfekowanym obiektem. W przypadku dezynfekcji powierzchni rzeczywisty czas kontaktu to okres od momentu

Tabela I

Charakterystyka głównych substancji aktywnych stosowanych w chemicznych środkach dezynfekcyjnych o aktywności wirusobójczej

Substancja / spektrum i sposób działania / przykładowe zastosowanie	Zalety	Wady
<p>Alkohole (głównie alkohol etylowy, izopropylowy i n-propylowy)</p> <ul style="list-style-type: none"> – Bakteriobójcze, grzybobójcze, wirusobójcze (do pewnego zakresu, w zależności od stężenia i rodzaju alkoholu). – Sposób działania oparty na denaturacji białek – Do dezynfekcji małych powierzchni i narzędzi (np. stetoskopów, termometrów, nożyczek opatrunk.) 	<ul style="list-style-type: none"> – Szybki czas działania – Dobra kompatybilność materiałowa (nie powodują korozji, nie barwią) – Nie pozostawiają toksycznych pozostałości – Są biodegradowalne 	<ul style="list-style-type: none"> – Podlegają wpływom zanieczyszczeń organicznych – Mogą powodować uszkodzenia niektórych narzędzi, puchnięcie gumy, niszczenie kleju i są łatwopalne (ryzyko zapłonu i wybuchu przy dezynfekcji dużych powierzchni) – Szybko parują co może utrudniać osiągnięcie wymaganego czasu kontaktu – Mogą powodować podrażnienia oczu i skóry, gdy są używane w dużych ilościach i w zamkniętej przestrzeni
<p>Chlor i związki chloru (np. podchloryn sodu)</p> <ul style="list-style-type: none"> – Pełne spektrum działania¹⁾. – Dokładny mechanizm działania nie jest znany. Działanie bójcze chloru może być wynikiem wielu czynników m.in. chlorowania pierścienia aromatycznego aminokwasów, hamowania reakcji enzymatycznych, zmniejszenia syntezy ATP, denaturacji, inaktywacji kwasów nukleinowych, itd. – Do dezynfekcji wody, do dezynfekcji narzędzi i odpadów medycznych w zakładach opieki zdrowotnej. 	<ul style="list-style-type: none"> – Szybki czas działania – Niepalne i relatywnie stabilne – Nie pozostawiają toksycznych pozostałości – Skuteczność nie jest uzależniona od twardości wody – Brak niekorzystnych efektów dla środowiska 	<ul style="list-style-type: none"> – Mogą podrażniać błony śluzowe, posiadać nieprzyjemny zapach, drażniący przy wyższych stężeniach i Uwalniać toksyczny gaz chlorowy po zmieszaniu z amoniakiem lub kwasem – Powodują korozję metali i odbarwienia tkanin – Są inaktywowane przez zanieczyszczenia organiczne – Niebezpieczeństwo wytwarzania się trichlorometanu w kontakcie podchlorynu z gorącą wodą
<p>Formaldehyd</p> <ul style="list-style-type: none"> – Pełne spektrum działania¹⁾. – Wpływa na białko poprzez alkilowanie grup aminowej i sulfhydrylowej oraz wpływa na syntezę kwasów nukleinowych. – Wykorzystanie go w obszarze medycznym jest ograniczone. 	<ul style="list-style-type: none"> – Szeroki zakres działania bójczego – Używany w niskich stężeniach 	<ul style="list-style-type: none"> – Posiada ostry, nieprzyjemny zapach oraz właściwości alergizujące i drażniące – Potencjalny czynnik karcynogeny, wiązany z rakiem nosa i płuc
<p>Aldehyd glutarowy</p> <ul style="list-style-type: none"> – Pełne spektrum działania¹⁾. – Działa poprzez reakcję alkilacji grup sulfhydrylowych, aminowych i karboksylowych, zmianę DNA i RNA i syntezy białka. – Używany najczęściej jako środek dezynfekcyjny wysokiego poziomu do sprzętu medycznego. 	<ul style="list-style-type: none"> – Nie podlega wpływom zanieczyszczeń organicznych – Dobra kompatybilność materiałowa (nie powoduje korozji sprzętu, nie niszczy gumy i plastiku, itd.) – Używany w niskich stężeniach 	<ul style="list-style-type: none"> – Opary posiadają właściwości drażniące dla układu oddechowego, może powodować alergiczne kontaktowe zapalenie skóry – Nieprzyjemny i drażniący zapach – Ograniczone zastosowanie w dezynfekcji powierzchni ze względu na toksyczność
<p>Aldehyd ortoftalowy (OPA)</p> <ul style="list-style-type: none"> – Pełne spektrum działania¹⁾. – Działa poprzez bezpośrednią reakcję z aminokwasami, białkami i kwasami nukleinowymi. – Środek dezynfekcyjny wysokiego poziomu. 	<ul style="list-style-type: none"> – Stabilny w szerokim zakresie pH (3–9) – Ledwo wyczuwalny zapach – Szybkie działanie nie wymagające aktywacji – Dobra zgodność materiałowa – Nie ma właściwości karcynogeny, ale poleca się używanie go w dobrze wentylowanej przestrzeni. 	<ul style="list-style-type: none"> – Barwi białka na szaro w tym niechronioną skórę, błony śluzowe, itd – Może powodować podrażnienia oczu przy bezpośrednim kontakcie – Aktywność sporobójcza wymaga długiego czasu kontaktu
<p>Nadtlenek wodoru</p> <ul style="list-style-type: none"> – Pełne spektrum działania¹⁾. – Działa poprzez tworzenie destrukcyjnych rodników hydroksylowych atakujących błony lipidowe i DNA. – Głównie do dezynfekcji narzędzi i powierzchni nieożywionych. 	<ul style="list-style-type: none"> – Szybki czas działania i nie wymaga aktywacji – Nie posiada nieprzyjemnego zapachu, właściwości drażniących i nie barwi – Nie powoduje koagulacji krwi – Nie utrwała tkanki, jest biodegradowalny 	<ul style="list-style-type: none"> – Przy bezpośrednim kontakcie może powodować poważne uszkodzenia oczu – Droższy niż inne środki dezynfekcyjne – W niskich stężeniach nie posiada aktywności sporobójczej – Jest utleniaczem dla wyrobów metalowych

Tabela I. C.d.

Substancja / spektrum i sposób działania / przykładowe zastosowanie	Zalety	Wady
Kwas nadoctowy (PAA) – Pełne spektrum działania ¹⁾ . – Mechanizm działania nie jest w pełni poznany, ale przypuszcza się, że działa on m.in. poprzez denaturację białka. – Do dezynfekcji niektórych narzędzi poprzez zanurzenie.	– Szybki czas działania i nie wymaga aktywacji – Brak szkodliwych produktów rozkładu – Skuteczny w obecności substancji organicznych – Kompatybilny z wieloma materiałami – Nie powoduje koagulacji krwi i utrwalenia tkanek na powierzchni – Sporobójczy nawet w niskich temperaturach	– Przy bezpośrednim kontakcie ze stężonymi roztworami może dochodzić do poważnego uszkodzenia skóry i oczu oraz podrażnienia błon śluzowych – Może powodować korozję miedzi, mosiądzu, stali oraz galwanizowanego żelaza (skutki są zależne od pH) – Roztwór jest niestabilny
Jodofory (głównie jodopowidon) – Bakteriobójcze, wirusobójcze, grzybobójcze. – Działają poprzez zakłócenie syntezy białka i struktury kwasu nukleinowego oraz zablokowanie wolnych grup sulfhydrylowych w enzymach. – Używane głównie jako środki antyseptyczne, rzadziej jako środek do dezynfekcji sprzętu medycznego, np. termometrów.	– Niepalny – Nie barwi – Nie ma właściwości drażniących i toksycznych	– Działa niekorzystnie na silikon – Nie ma właściwości sporobójczych
Fenole – Bakteriobójcze, wirusobójcze (pełny zakres), grzybobójcze. – W wysokich stężeniach działa jak trucizna protoplazmatyczna wytrącająca białka. – Używane jako środki do dezynfekcji np. powierzchni (laboratoryjnych i narzędzi medycznych należących do grupy niskiego ryzyka).	– Niepalne – Nie barwią – Dopuszczone do użycia na powierzchniach środowiskowych	– Są absorbowane przez materiały porowate i pozostałości mogą podrażniać tkanki – Niektóre fenole mogą powodować depigmentację skóry – Nie są sporobójcze
Pochodne aminowe (np. czwartorzędowe związki amoniowe, glukoprotamina) – Bakteriobójcze, grzybobójcze, wirusobójcze wobec wirusów osłonkowych. – Aktywność hydrofobowa skuteczna wobec wirusów osłonkowych. – Niektóre mogą być używane do dezynfekcji sprzętu medycznego, który ma kontakt z nieuszkodzoną skórą, np. rękawy aparatów do mierzenia ciśnienia. Do dezynfekcji niektórych powierzchni jak meble, podłogi, ściany.	– Dobre właściwości myjące – Kompatybilne materiałowo z różnymi powierzchniami	– Słabe działanie w obecności białka i wysokiej twardości wody – Niektóre mogą wywoływać reakcje alergiczne – Słabo biodegradowalne

– Pełne spektrum działania oznacza aktywność wobec szerokiego spektrum drobnoustrojów, włączając w to bakterie, wirusy, grzyby, spory. część I – na podstawie [38–41, 55].

aplikacji na nią środka do momentu całkowitego jego wysuszenia. Dobór odpowiedniego czasu kontaktu jest niezwykle istotny w przypadku dezynfekcji wyrobów medycznych, przede wszystkim narzędzi, o złożonej budowie, w przypadku których wypełnienie wszystkich wewnętrznych kanałów wymaga czasu. Ma tu znaczenie całkowite zanurzenie narzędzi w środku dezynfekcyjnym oraz brak wytworzenia się kieszeni powietrznych. Narzędzia, które w trakcie procesu unoszą się na powierzchni środka nie są prawidłowo dezynfekowane.

4. Wymagania stawiane środkom dezynfekcyjnym

Środek dezynfekcyjny poza tym, że wymaga odpowiedniego stosowania musi też spełniać określone kryteria [40, 41], z których przede wszystkim należy wymienić:

- Szybkość działania, czyli skuteczność w krótkim czasie kontaktu.
- Trwałość, czyli stabilność zarówno w formie stężonej – koncentrat, jak i w formie rozcieńczonej, przeznaczonej do użycia.

- Nie uleganie wpływom czynników środowiskowych, co oznacza zachowanie aktywności np. w obecności obciążenia organicznego jak krew, plwocina, kał.
- Brak toksyczności – nie powinien posiadać właściwości drażniących i wywoływać reakcji alergicznych (zwłaszcza astmy i zapalenia skóry) oraz wskazane jest, aby posiadał akceptowalny dla użytkownika zapach.
- „Kompatybilność” materiałowa co oznacza, że nie powoduje korozji narzędzi i powierzchni, pogorszenia stanu tkanin, gumy, tworzyw sztucznych i innych materiałów.
- Niepalność – powinien mieć temperaturę zapłonu powyżej 150°F (ok. 65°C).
- Brak negatywnego wpływu na środowisko (ekologiczny).
- Łatwość stosowania (czytelne instrukcje na etykiecie) i w miarę możliwości dostępność w wielu postaciach, np. nasączone chusteczki, spray.
- Szerokie spektrum działania uwzględniające bakterie, w tym prątki, wirusy, grzyby.

5. Badanie aktywności wirusobójczej środków dezynfekcyjnych

Ponieważ środki dezynfekcyjne odgrywają istotną rolę w przerwaniu łańcucha zakażenia wirusowego w czasie opieki nad pacjentem w szpitalu, czy podczas rutynowej praktyki lekarskiej, powinny one posiadać

odpowiednią aktywność wirusobójczą potwierdzoną przy pomocy uznanych i dobrze zaprojektowanych metod badawczych [48]. Błędne określenie aktywności środka dezynfekcyjnego może prowadzić do stosowania produktu o nieodpowiednich parametrach (stężenie, czas kontaktu) i w konsekwencji do braku eliminacji wirusów w dezynfekowanym obszarze. Dlatego metoda określania aktywności wirusobójczej, podobnie jak bakteriobójczej i grzybobójczej, produktów przeznaczonych do użycia w różnych obszarach (medycznym, weterynaryjnym, spożywczym, przemysłowym) została opisana w normach obowiązujących w UE. Metodę badania działania wirusobójczego produktów stosowanych w obszarze medycznym opisuje obowiązująca aktualnie (lipiec 2018) norma PN-EN 14476:2013 + A1:2015 „Chemiczne środki dezynfekcyjne i antyseptyczne – Ilościowa zawiesinowa metoda określania wirusobójczego działania w obszarze medycznym – Metoda badania i wymagania (Faza 2/Etap 1)” [33]. W niniejszej Normie Europejskiej opisano metodę zawiesinową do ustalania, czy chemiczny środek dezynfekcyjny lub antyseptyczny ma działanie wirusobójcze w obszarze i sytuacjach opisanych w zakresie normy. Norma PN-EN 14476 stosuje się do produktów używanych w obszarze medycznym, w sytuacjach, w których dezynfekcja jest wskazana ze względów medycznych: 1) w czasie opieki nad pacjentem w szpitalach, zakładach opieki medycznej, gabinetach dentystycznych, przychodniach szkolnych, żłobkach, przedszkolach, domach opieki;

Tabela II

Wytyczne normy PN-EN 14476 dotyczące badania aktywności wirusobójczej środków dezynfekcyjnych stosowanych w obszarze medycznym

Warunki badania	Higieniczna dezynfekcja rąk metodą wcierania i higieniczne mycie rąk	Dezynfekcja narzędzi	Dezynfekcja powierzchni	Dezynfekcja tekstyliów
Minimalny zakres badanych wirusów	Pełny zakres aktywności wirusobójczej: <ul style="list-style-type: none"> • Wirus polio • Wirus adeno • Mysi norowirus Ograniczony zakres aktywności wirusobójczej: <ul style="list-style-type: none"> • Wirus adeno • Mysi norowirus Działanie wirusobójcze na wirusy osłonkowe: <ul style="list-style-type: none"> • Wirus krowianki 	<ul style="list-style-type: none"> • Wirus polio • Wirus adeno • Mysi norowirus Gdy temp. 40°C lub wyższa tylko mysi parwowirus	<ul style="list-style-type: none"> • Wirus polio • Wirus adeno • Mysi norowirus 	Mysi parwowirus
Dodatkowy	Každy istotny, stosowny model wirusowy			
Temperatura badania	Zgodnie z rekomendacją wytwórcy, ale w/pomiędzy			
	20°C	20°C a 70°C	4°C a 30°C	30°C a 70°C
Czas kontaktu	Zgodnie z rekomendacją wytwórcy			
	ale pomiędzy 30 i 120 sekund	ale nie dłużej niż 60 minut	ale nie dłużej niż 5 lub 60 minut	ale nie dłużej niż 20 minut
Substancja obciążająca (szczegółowy opis wyboru warunków badania jest umieszczony w normie)				
- Warunki czyste badania to 0,3 g/l albuminy surowicy bydlęcej (BSA)				
- Warunki brudne badania to zawiesina erytrocytów baranich w roztworze albuminy bydlęcej (końcowe stężenie erytrocytów baranich i albuminy w procedurze badania wynosi odpowiednio – 3 ml/litr i 3 g/litr)				
- Dodatkowa substancja obciążająca – każda istotna lub stosowna substancja				

Na podstawie [33].

Tabela III
Wyniki badań aktywności wirusobójczej wybranych związków

Wirus	Badany związek	Badane stężenie i czas kontaktu	Współczynnik redukcji miana (RF)	Piśmienictwo
Test powierzchniowy				
Adenowirus typ 5	Aldehyd glutarowy	500 ppm; 5 minut	5,77 ± 1,23 log	[36]
	Etanol	55% (v/v); 5 minut	4,92 ± 1,11 log	
	N-propanol	30% (v/v); 5 minut	5,27 ± 0,87 log	
Wzw C (HCV)	N-propanol	30%; 1 minuta	> 4 log	[12]
	Izopropanol	50%; 1 minuta	> 4 log	
	Izopropanol	40%; 5 minut	> 4 log	
	Etanol	60%; 1 minuta	> 4 log	
	Etanol	50%; 5 minut	> 4 log	
Wirus Ebola; wariant Makoma	Podchloryn sodu	0,5%; 5 minut	> 4 log	[10]
	Etanol	67%; 10 minut	> 4 log	
Test zawiesinowy				
Mysi norowirus	Etanol	60%; 1 minuta	> 4 log	[4]
	Izopropanol	60%; 1 minuta	> 4 log	
	Izopropanol	80%; 0,5 minuty	> 4 log	[30]
	N-propanol	60%; 0,5 minuty	4,24 log	
SARS-CoV; izolat FFM-1	Etanol	78%; 0,5 minuty	≥ 5,01 log	[34]
	Aldehyd glutarowy	0,5%; 2 minuty	≥ 4,01 log	
Kaczy wzwB (DHBV)	Etanol	40%; 1 minuta	≥ 4,35 log	[44]
	Izopropanol	40%; 1 minuta	≥ 4,00 log	
	Kwas nadoctowy	0,05%; 1 minuta	≥ 4,08 log	
	Aldehyd glutarowy	0,1%; 0,5 minuty	≥ 4,05 log	
Wirus grypy A H1N1; szczep A/NMS/33	NaOH	0,1 mol/L; 1 minuta	≥ 6,55 log	[22]
	Etanol	70%; 1 minuta	≥ 4,84 log	
	N-propanol	70%; 1 minuta	≥ 5,06 log	
Wirus Zika; szczep MR766	Podchloryn sodu	1%; 1 minuta	> 4 log	[29]
	Aldehyd glutarowy	2%; 1 minuta	> 4 log	
	Etanol	70%; 1 minuta	> 4 log	
	Izopropanol	70%; 1 minuta	> 4 log	
Drobny wirus mysy – MVM; mysy parwowirus	Aldehyd glutarowy	2%; 10 minut	> 4,4 log	[15]
	Kwas nadoctowy	0,2%; 10 minut	4,2 ± 0,1 log	
	Podchloryn sodu	2500 ppm; 10 minut	4,4 ± 0,1 log	
Poliowirus typ 1; szczep LSc 2ab	Aldehyd glutarowy	2%; 10 minut	> 4,6 log	[15]
	Kwas nadoctowy	0,2%; 10 minut	> 4,8 log	
	Podchloryn sodu	2500 ppm; 10 minut	4,5 ± 0,2 log	
Wirus krowianki; szczep Ankara (MVA)	Etanol	50%; 1 minuta	≥ 5,40 ± 0,36 log	[35]
	Izopropanol	40%; 1 minuta	≥ 5,40 ± 0,36 log	
	Kwas nadoctowy	0,0025%; 1 minuta	4,75 ± 0,31 log	
Wirus krowianki; szczep Elstree (VACV)	Etanol	50%; 1 minuta	≥ 4,38 ± 0,37 log	[35]
	Izopropanol	40%; 1 minuta	≥ 4,38 ± 0,37 log	
	Kwas nadoctowy	0,005%; 1 minuta	≥ 4,50 ± 0,38 log	
Adenowirus typ 5	Podchloryn sodu	2500 ppm; 1 minuta	> 4,1 log	[15]
	Kwas nadoctowy	0,1%; 15 minut	5,1 log	[45]
	Kwas nadoctowy	0,2%; 5 minut	≥ 5,6 log	
	Kwas nadoctowy	0,5%; 2 minuty	≥ 5,6 log	
Wzw C (HCV)	Aldehyd glutarowy	0,5%; 1 minuta	> 4 log	[8]
	Kwas nadoctowy	0,05%; 1 minuta	> 4 log	

Tabela III. C.d.

Wirus	Badany związek	Badane stężenie i czas kontaktu	Współczynnik redukcji miana (RF)	Piśmiennictwo
Wirus Ebola; szczep Zaire	Jodopowidon – roztwór	10%; 15 sekund	> 6 log	[13]
	Jodopowidon – preparat do wcierania w rękę	7,5%; 15 sekund	> 6 log	
Enterowirus 71 (HEV71)	Etanol	95%; 10 minut	5,78 ± 0,23 log	[6]
Wirus herpes simplex typ 1	Etanol	62%; 0,5 minuty	≥ 5 log	[16]
Wirus paragrypy typ 2	Etanol	62%; 0,5 minuty	≥ 4,39 log	[16]
HIV-1	Etanol	62%; 0,5 minuty	≥ 4,14 log	[16]
Wirus grypy typ A H3N2; szczep A/Hong Kong/8/68	Etanol	62%; 0,5 minuty	> 5 log	[16]

2) w miejscu pracy i w domu; 3) może również dotyczyć zakładów usługowych, takich jak pralnie i kuchnie, które dostarczają produkty bezpośrednio do pacjenta.

Minimalne i dodatkowe warunki badania, stosowane obligatoryjne modele wirusowe oraz wytyczne dotyczące parametrów badania stosowane w metodyce opisanej w normie przedstawiono w Tabeli II. Zasadą badania jest określenie zdolności produktu do inaktywacji wirusa na podstawie spadku jego miana zakaźnego. Jako kryterium wirusobójczego działania badanego produktu wobec danego wirusa przyjmuje się spadek jego miana zakaźnego o co najmniej 4 log co jest równoznaczne z utratą zakaźności wirusa na poziomie 99,99%.

6. Dezynfekcja przeciwwirusowa – aspekty praktyczne

Stosując środki dezynfekcyjne w obszarze medycznym należy pamiętać o tym, że:

- W większości przypadków dany środek dezynfekcyjny jest zaprojektowany do stosowania w określony sposób i w ściśle określonym celu. Środki dezynfekcyjne nie są produktami uniwersalnymi przeznaczonymi do każdego zastosowania.
- Przy przygotowywaniu produktu do dezynfekcji należy bezwzględnie przestrzegać instrukcji producenta, ponieważ przygotowanie zbyt niskiego stężenia lub zastosowanie zbyt krótkiego czasu kontaktu może prowadzić do nieskutecznej dezynfekcji, a zbyt wysokie stężenie może uszkadzać dezynfekowane powierzchnie i narzędzia lub negatywnie wpływać na personel.
- Środki dezynfekcyjne stosowane w obszarze medycznym, zgodnie z obowiązującym w Polsce prawem, mogą należeć do różnych kategorii [11]: produkt biobójczy, czyli substancja czynna lub produkt zawierający co najmniej jedną substancję czynną; wyrób medyczny; produkt leczniczy lub kosmetyk.

Przykłady badania aktywności przeciwwirusowej niektórych związków chemicznych przedstawiono w Tabeli III.

Piśmiennictwo

1. Allegranzi B., Pittet D.: Role of hand hygiene in healthcare-associated infection prevention. *J. Hosp. Infect.* **73**, 305–315 (2009)
2. Barker J., Vipond I.B., Bloomfield S.F.: Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of norovirus contamination via environmental surfaces. *J. Hosp. Infect.* **58**, 42–49 (2004)
3. Bedell K., Buchaklian A.H., Perlman S.: Efficacy of an automated multiple emitter whole-room ultraviolet-C disinfection system against coronaviruses MHV and MERS-CoV. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **37**, 598–599 (2016)
4. Belliot G., Lavaux A., Souihel D., Agnello D., Pothier P.: Use of murine norovirus as a surrogate to evaluate resistance of human norovirus to disinfectants. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 3315–3318 (2008)
5. Calgua B., Carratalà A., Guerrero-Latorre L., de Abreu Corrêa A., Kohn T., Sommer R., Girones R.: UVC inactivation of dsDNA and ssRNA viruses in water: UV fluences and a qPCR-based approach to evaluate decay on viral infectivity. *Food Environ. Virol.* **6**, 260–268 (2014)
6. Chang S.C., Li W.C., Huang K.Y., Huang Y.C., Chiu C.H., Chen C.J., Hsieh Y.C., Kuo C.Y., Shih S.R., Lin T.Y.: Efficacy of alcohols and alcohol-based hand disinfectants against human enterovirus 71. *J. Hosp. Infect.* **83**, 288–293 (2013)
7. Chidambaranathan A.S., Balasubramaniam M.: Comprehensive review and comparison of the disinfection techniques currently available in the literature. *J. Prosthodont.* DOI:10.1111/jopr.12597 (2017)
8. Ciesek S., Friesland M., Steinmann J., Becker B., Wedemeyer H., Manns M.P., Steinmann J., Pietschmann T., Steinmann E.: How stable is the hepatitis C virus (HCV)? Environmental stability of HCV and its susceptibility to chemical biocides. *J. Infect. Dis.* **201**, 1859–1866 (2010)
9. Colorado L., Silva-Dias A., Azevedo M.M., Rodrigues A.G.: High-touch surfaces: microbial neighbours at hand. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **36**, 2053–2062 (2017)
10. Cook B.W.M., Cutts T.A., Nikiforuk A.M., Poliquin P.G., Court D.A., Strong J.E., Theriault S.S.: Evaluating environmental persistence and disinfection of the Ebola virus Makona variant. *Viruses*, **7**, 1975–1986 (2015)
11. Dalkowski P.: Dezynfekcja w medycynie – problemy prawne dawniej i dziś. *Forum Zakażeń*, 2015, **6**, 65–68 (2015)
12. Doerrbecker J., Friesland M., Ciesek S., Erichsen T.J., Mateu-Gelabert P., Steinmann J., Steinmann J., Pietschmann T., Steinmann E.: Inactivation and survival of hepatitis C virus on inanimate surfaces. *J. Infect. Dis.* **204**, 1830–1838 (2011)

13. Eggers M., Eickmann M., Kowalski K., Zorn J., Reimer K.: Povidone-iodine hand wash and hand rub products demonstrated excellent in vitro virucidal efficacy against Ebola virus and modified vaccinia virus Ankara, the new European test virus for enveloped viruses. *BMC Infect. Dis.* **15**, 375 (2015)
14. Eischeid A.C., Meyer J.N., Linden K.G.: UV disinfection of adenoviruses: molecular indications of DNA damage efficiency. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 23–28 (2009)
15. Eterpi M., McDonnell G., Thomas V.: Disinfection efficacy against parvoviruses compared with reference viruses. *J. Hosp. Infect.* **73**, 64–70 (2009)
16. Fendler E., Groziak P.: Efficacy of alcohol-based hand sanitizers against fungi and viruses. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **23**, 61–62 (2002)
17. Firquet S., Beaujard S., Lobert P.-E., Sané F., Caloone D., Izard D., Hober D.: Survival of enveloped and non-enveloped viruses on inanimate surfaces. *Microbes Environ.* **30**, 140–144 (2015)
18. Ganavadiya R., Chandra Shekar B.R., Saxena V., Tomar P., Gupta R., Khandelwal G.: Disinfecting efficacy of three chemical disinfectants on contaminated diagnostic instruments: A randomized trial. *Basic Clin. Pharma.* **5**, 98–104 (2014)
19. Gerhardts A., Mucha H., Höfer D.: Testing linen disinfection procedures in practice with phage-charged-bioindicators. *Int. J. Health Care Qual. Assur.* **25**, 519–531 (2012)
20. Han J.H., Sullivan N., Leas B.F., Pegues D.A., Kaczmarek J.L., Umscheid C.A.: Cleaning hospital room surfaces to prevent health care-associated infections: a technical brief. *Ann. Intern. Med.* **163**, 598–607 (2015)
21. Ijaz M.K., Rubino J.: Should test methods for disinfectants use vertebrate viruses dried on carriers to advance virucidal claims? *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2**, 192–194 (2008)
22. Jeong E.K., Sung H.M., Kim I.S.: Inactivation and removal of influenza A virus H1N1 during the manufacture of plasma derivatives. *Biologicals*, **3**, 652–657 (2010)
23. Karnik P.P., Dave N.M., Nataraj G., Gupta R., Garasia M.: Comparison of efficacy and cost-effectiveness of 0.55% ortho-phthalaldehyde and 2% glutaraldehyde for disinfection of laryngoscopes: A prospective pilot study. *Indian J. Anaesth.* **61**, 490–493 (2017)
24. Kingston LM, Slevin BL, O'Connell NH, Dunne C.P.: Attitudes and practices of Irish hospital-based physicians towards hand hygiene and hand rubbing using alcohol-based hand rub: a comparison between 2007 and 2015. *J. Hosp. Infect.* **97**, 17–25 (2017)
25. Komender J., Mossakowski M.J., Orłowski T., Ostrowski K., Rudowski W., Trzebski A.: *Wielki Słownik Medyczny*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 1996
26. Lemmer K., Howaldt S., Heinrich R., Roder A., Pauli G., Dorner B.G., Pauly D., Mielke M., Schwebke I., Grunow R.: Test methods for estimating the efficacy of the fast-acting disinfectant peracetic acid on surfaces of personal protective equipment. *J. Appl. Microbiol.* **123**, 1168–1183 (2017)
27. Lu R., Zhang C., Piatkovsky M., Ulbricht M., Herzberg M., Nguyen T.H.: Improvement of virus removal using ultrafiltration membranes modified with grafted zwitterionic polymer hydrogels. *Water Res.* **116**, 86–94 (2017)
28. McDonnell G., Burke P.: Disinfection: is it time to reconsider Spaulding? *J. Hosp. Infect.* **78**, 163–170 (2011)
29. Müller J.A., Harms M., Schubert A., Jansen S., Michel D., Mertens T., Schmidt-Chanasit J., Münch J.: Inactivation and Environmental Stability of Zika Virus. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 1685–1687 (2016)
30. Paulmann D., Steinmann J., Becker B., Bischoff B., Steinmann E., Steinmann J.: Virucidal activity of different alcohols against murine norovirus, a surrogate of human norovirus. *J. Hosp. Infect.* **79**, 378–379 (2011)
31. Pires D., Pittet D.: Hand hygiene mantra: teach, monitor, improve, and celebrate. *J. Hosp. Infect.* **95**, 335–337 (2017)
32. Pittet D., Allegranzi B., Sax H., Dharan S., Pessoa-Silva C.L., Donaldson L., Boyce J.M. WHO Global Patient Safety Challenge, World Alliance for Patient Safety: Evidence-based model for hand transmission during patient care and the role of improved practices. *Lancet Infect. Dis.* **6**, 641–652 (2006)
33. PN-EN 14476+A1:2015-10: Chemiczne środki dezynfekcyjne i antyseptyczne – ilościowa zawieszinowa metoda określania wirusobójczego działania w obszarze medycznym – Metoda badania i wymagania (Faza 2/Etap 1) (28.09.2016)
34. Rabenau H.F., Cinatl J., Morgenstern B., Bauer G., Preiser W., Doerr H.W.: Stability and inactivation of SARS coronavirus. *Med. Microbiol. Immunol.* **194**, 1–6 (2005)
35. Rabenau H.F., Rapp I., Steinmann J.: Can vaccinia virus be replaced by MVA virus for testing virucidal activity of chemical disinfectants? *BMC Infect. Dis.* **10**, 185 (2010)
36. Rabenau H.F., Steinmann J., Rapp I., Schwebke I., Eggers M.: Evaluation of a virucidal quantitative carrier test for surface disinfectants. *PLoS One*, **9**, e86128 (2014)
37. Rattanukul S., Oguma K., Takizawa S.: Sequential and simultaneous applications of UV and chlorine for adenovirus inactivation. *Food Environ. Virol.* **7**, 295–304 (2015)
38. Rutala W.A., Weber D.J.: Disinfection and sterilization in health care facilities: what clinicians need to know. *Clin. Infect. Dis.* **39**, 702–709 (2004)
39. Rutala W.A., Weber D.J.: Disinfection and sterilization: an overview. *Am. J. Infect. Control*, **41**, S2–S5 (2013)
40. Rutala W.A., Weber D.J.: Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities. CDC, 2008.
41. Rutala W.A., Weber D.J.: Selection of the ideal disinfectant. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **35**, 855–865 (2014)
42. Sassi H.P., Sifuentes L.Y., Koenig D.W., Nichols E., Clark-Greuel J., Wong L.F., McGrath K., Gerba C.P., Reynolds K.A.: Control of the spread of viruses in a long-term care facility using hygiene protocols. *Am. J. Infect. Contr.* **43**, 702–706 (2015)
43. Sattar S.A.: Hierarchy of susceptibility of viruses to environmental surface disinfectants: a predictor of activity against new and emerging viral pathogens. *J. AOAC Int.* **90**, 1655–1658 (2007)
44. Sauerbrei A., Schacke M., Glück B., Bust U., Rabenau H.F., Wutzler P.: Does limited virucidal activity of biocides include duck hepatitis B virucidal action? *BMC Infect. Dis.* **12**, 276 (2012)
45. Sauerbrei A., Sehr K., Brandstädt A., Heim A., Reimer K., Wutzler P.: Sensitivity of human adenoviruses to different groups of chemical biocides. *J. Hosp. Infect.* **57**, 59–66 (2004)
46. Schulster L.M.: Healthcare laundry and textiles in the United States: review and commentary on contemporary infection prevention issues. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **36**, 1073–1088 (2015)
47. Sexton J.D., Wilson A.M., Sassi H.P., Reynolds K.A.: Tracking and controlling soft surface contamination in health care settings. *Am. J. Infect. Control*, DOI: 10.1016/j.ajic.2017.08.002 (2017)
48. Steinmann J., Wolff M.H.: Testing virucidal activity in Germany: an update. *GMS Krankenhhyg Interdiszip*, **2**, Doc04 (2007)
49. Tomb R.M., Maclean M., Coia J.E., Graham E., McDonald M., Atreya C.D., MacGregor S.J., Anderson J.G.: New proof-of-concept in viral inactivation: virucidal efficacy of 405 nm light against feline calicivirus as a model for norovirus decontamination. *Food Environ. Virol.* **9**, 159–167 (2017)

50. Weber D.J., Anderson D., Rutala W.A.: The role of the surface environment in healthcare-associated infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **26**, 338–344 (2013)
51. Weber D.J., Rutala W.A., Anderson D.J., Chen L.F., Sickbert-Bennett E.E., Boyce J.M.: Effectiveness of ultraviolet devices and hydrogen peroxide systems for terminal room decontamination: Focus on clinical trials. *Am. J. Infect. Control*, **44**, e77–84 (2016)
52. Weber D.J., Rutala W.A., Miller M.B., Huslage K., Sickbert-Bennett E.: Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. *Am. J. Infect. Control*, **38**, S25–S33 (2010)
53. Weber D.J., Rutala W.A.: Understanding and preventing transmission of healthcare-associated pathogens due to the contaminated hospital environment. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **34**, 449–452 (2013)
54. Wetzker W., Walter J., Bunte-Schönberger K., Schwab F., Behnke M., Gastmeier P., Reichardt C.: Hand rub consumption has almost doubled in 132 German hospitals over 9 years. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **38**, 870–872 (2017)
55. World Health Organization and Pan American Health Organization. Decontamination and reprocessing of medical devices for health-care facilities, 2016, <http://www.who.int>; <http://www.paho.org> (29.05.2018)



Autor: **Mieczysław Kazimierz Błaszczyk**
Tytuł: **Biologiczne aspekty oczyszczania ścieków**
Redaktor PWN: **Urszula Pawłowska**
Projektant okładki: **Lidia Michalak**
Wydawnictwo naukowe PWN S.A.
Warszawa, 2019
ISBN 978-83-01-20426-6

W poprzednim, zesłorocznym numerze mieliśmy sposobność opublikować zapowiedź najnowszego podręcznika PWN z dziedziny mikrobiologii. Wydana na początku bieżącego roku książka jest podręcznikiem akademickim przeznaczonym dla studentów kierunków biologicznych i biotechnologicznych. W szczególności będzie przydatna dla studentów realizujących przedmioty z zakresu biotechnologii i mikrobiologii środowiskowej, bioinżynierii środowiska, inżynierii ekologicznej oraz ochrony środowiska.

Podręcznik *Biologiczne aspekty oczyszczania ścieków* zawiera charakterystykę wspólnot mikroorganizmów zaangażowanych

w oczyszczaniu ścieków uwzględniając ich metabolizm w trakcie trwania procesu oraz tworzone struktury. W recenzowanym podręczniku prof. Mieczysław Błaszczyk omawia wszystkie nowoczesne procesy biotechnologiczne wykorzystywane na świecie do oczyszczania ścieków, jak również te o znaczeniu historycznym. Pierwszy rozdział wprowadza czytelnika w podstawowe zagadnienia i mechanizmy biochemiczne oczyszczania ścieków. Kolejny rozdział opisuje różne rodzaje ścieków (nawet ścieki radioaktywne) pod względem fizykochemicznym. W następnym, rozbudowanym rozdziale Autor obszernie charakteryzuje wspólnoty mikroorganizmów (biofilm, osady, kłaczkę), tworzonych zarówno przez bakterie jak i eukarionty, które biorą udział w oczyszczaniu ścieków. Autor, w celu opisanego składu gatunkowego wspólnot mikroorganizmów, wykorzystał najnowsze wyniki badań metagenomicznych. W kolejnym rozdziale prof. M. Błaszczyk opisuje techniczny aspekt oczyszczania ścieków, czyli bioreaktory stosowane do hodowli mikroorganizmów. Warto podkreślić, że Autor wymienia prawdopodobnie wszystkie znane na świecie typy bioreaktorów oczyszczania ścieków (a jest ich kilkadziesiąt!) i następnie omawia wybrane systemy w zależności od sposobu wzrostu mikroorganizmów. W rozdziale tym znajduje się wiele bardzo przydatnych ilustracji obrazujących poszczególne urządzenia stosowane w różnych typach bioreaktorów. Autor podzielił metody oczyszczania na naturalne i nowoczesne, każdej z nich poświęcając osobny rozdział. W podręczniku szczegółowo i w interesujący sposób opisano usuwanie ze ścieków azotu i fosforu. Nie zabrakło tu opisu najnowocześniejszych technologii i kombinacji technik w celu wydajniejszego oczyszczania. W kolejnych rozdziałach znajdziemy szczegółowe opisy poświęcone oczyszczaniu ścieków przemysłu spożywczego i farmaceutycznego, rafineryjnych, papierniczych oraz oczyszczanie wód kopalnianych, odpadów organicznych i komunalnych. Co ważne, w opisanych procesach Autor przywiązuje dużą wagę do aspektów biologicznych. W ostatnim, 15. rozdziale prof. M. Błaszczyk opisuje oczyszczalnię w Ostrzeszowie jako przykład mechaniczno-biologicznej oczyszczalni.

Dużą zaletą podręcznika jest oryginalny pomysł zaprezentowania wiedzy związanej z biologicznymi metodami oczyszczania ścieków. Autor, jak to określił w tytule, prezentuje biologiczne aspekty oczyszczania ścieków skupiając się na biologii mikroorganizmów prowadzących te procesy. Polecamy podręcznik jako kompletne i kompetentne źródło informacji o wykorzystaniu mikroorganizmów do oczyszczania różnego rodzaju zanieczyszczeń, napisane przez uznanego specjalistę w dziedzinie.

Redakcja

Z dużą satysfakcją ogłaszamy zakończenie kolejnego etapu rozwoju naszego kwartalnika. Wraz z początkiem bieżącego roku rozpoczęliśmy współpracę ze zlokalizowanym w Nowym Jorku wydawnictwem Exeley, które będzie publikowało nasze czasopismo na swoim portalu. W tym roku będziemy kontynuować projekt tłumaczenia publikacji na wersje anglojęzyczne, ponadto spodziewamy się większej liczby artykułów już napisanych w języku angielskim, w tym od Autorów spoza naszego kraju, w związku z czym w dalszym ciągu powiększamy kolegium redakcyjne naszego kwartalnika.

Mamy dużą przyjemność przedstawić nowych członków Redakcji. W pierwszym kwartale bieżącego roku otworzyliśmy dział mikrobiologia molekularna, tworzony przez dwie specjalistki w dziedzinie: dr hab. Adriannę Raczkowską z Uniwersytetu Warszawskiego oraz dr Bożenę Nejman-Faleńczyk z Uniwersytetu Gdańskiego. Do istniejącego już działu biotechnologia dołączyła dr Agnieszka Szczepankowska z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN. Poszerzony został również dział mikrobiologia środowiskowa o redaktora z Uniwersytetu Warszawskiego – prof. Renatę Matlakowską. Dużym zainteresowaniem wśród naszych Czytelników i Autorów cieszą się prace z zakresu mikrobiologii medycznej. Dlatego też utworzyliśmy dział poświęcony tej specjalności, do którego dołączył w tym roku Dr hab. n. med. Aleksander Deptuła z Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Obecnie szukamy kandydata na jeszcze jednego redaktora do tego działu, zachęcamy do nadsyłania zgłoszeń do Redakcji. Więcej informacji o aktualnym składzie kolegium redakcyjnego znajdą Państwo w zakładce REDAKCJA na naszej stronie internetowej.

SPIS TREŚCI

Doktor Andrzej Kasprowicz (1943–2019)	5
A. Góralczyk-Bińkowska, A. Jasińska, J. Długoński – Charakterystyka i kierunki wykorzystania enzymów z grupy wielomiedziowych oksydaz	7
J. Deptuła, B. Tokarz-Deptuła, M. Malinowska-Borysiak, M. Stosik, W. Deptuła – Katelicyny u ludzi i zwierząt	19
A. Sękowska, E. Gospodarek-Komkowska – Nowo pojawiające się gatunki bakterii w zakażeniach u człowieka	29
W. Rogóż, D. Sypniewski, I. Bednarek – Analiza wybranych cech genetycznych, fenotypów i zagrożenia epidemiologicznego bakteriami z rodzaju <i>Enterococcus</i> opornymi na wankomycynę	35
S. Gnat, A. Nowakiewicz, P. Zięba – Taksonomia dermatofitów – systemy klasyfikacyjne się zmieniają, problemy identyfikacyjne pozostają te same	49
M. Woźniak, A. Gałązka – Mikrobiom ryzosfery i jego korzystny wpływ na rośliny – aktualna wiedza i perspektywy	59
D. Chlebek, K. Hupert-Kocurek – Bakterie endofityczne w fitodegradacji toksycznych zanieczyszczeń organicznych	70
W. Kurzątkowski, P. Górska, M. Główska, K. Woźnica, A. Zasada – Nowe szczegóły dotyczące kolokacji syntazy izopenicyliny N i peroksysomów w komórkach strzępeków grzybni szczepu <i>Penicillium chrysogenum</i> PQ-96 – peksofagia i egzocytoza	80
PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY	
A. Sobolewska-Ruta, P. Zaleski – Tworzenie banków komórek w produkcji biofarmaceutyków	87
A. Trzcicka – Dezynfekcja przeciwwirusowa w obszarze medycznym	101
RECENZJE	111
KOMUNIKATY, INFORMACJE	112

CONTENTS

Doktor Andrzej Kasprowicz (1943–2019)	5
A. Góralczyk-Bińkowska, A. Jasińska, J. Długoński – Characteristics and use of multicopper oxidases enzymes	7
J. Deptuła, B. Tokarz-Deptuła, M. Malinowska-Borysiak, M. Stosik, W. Deptuła – Cateelicidins in humans and animals	19
A. Sękowska, E. Gospodarek-Komkowska – New species of bacteria in human infections	29
W. Rogóż, D. Sypniewski, I. Bednarek – Analysis of selected genetic traits, phenotypes, and epidemiological threat of <i>Enterococcus</i> bacteria resistant to vancomycin	35
S. Gnat, A. Nowakiewicz, P. Zięba – Taxonomy of dermatophytes – classification systems change, identification problems remain the same	49
M. Woźniak, A. Gałązka – The rhizosphere microbiome and its beneficial effects on plants – current knowledge and perspectives	59
D. Chlebek, K. Hupert-Kocurek – Endophytic bacteria in phytodegradation of persistent organic pollutants	70
W. Kurzątkowski, P. Górska, M. Główska, K. Woźnica, A. Zasada – New data on isopenicillin n synthase and peroxisome co-location in the hyphal cells of <i>Penicillium chrysogenum</i> pq-96 – pexophagy and exocytosis	80
METHODS AND STANDARDS	
A. Sobolewska-Ruta, P. Zaleski – Cell banks preparation in biopharmaceuticals production	87
A. Trzcicka – Antiviral disinfection in the medical area	101
REVIEW	111
NEW REPORTS, INFORMATION	112

