



Zanieczyszczenia mikrobiologiczne podziemnych magazynow gazu i gazociagow

Agnieszka Staniszewksa, Alina Kunicka-Stycynska, Krzysztof Zieminski

► To cite this version:

Agnieszka Staniszewksa, Alina Kunicka-Stycynska, Krzysztof Zieminski. Zanieczyszczenia mikrobiologiczne podziemnych magazynow gazu i gazociagow. Polish journal of microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologów = The Polish Society of Microbiologists, 2017, 56, pp.94. hal-02736852

HAL Id: hal-02736852

<https://hal.inrae.fr/hal-02736852>

Submitted on 2 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Kwartalnik

Tom 56

Zeszyt 4•2017

PAŹDZIERNIK – GRUDZIEŃ

CODEN:

PMKMAV 56 (4)

2017

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Postępy Mikrobiologii

Advances in Microbiology

Index Copernicus ICV = 111,53 (2015)

Impact Factor ISI = 0,311 (2016)

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 RÓŻAŁSKI (Uniwersytet Łódzki),
ALEKSANDRA SKŁODOWSKA (Uniwersytet Warszawski), RADOŚLAW STACHOWIAK (Uniwersytet Warszawski),
BOHDAN STAROŚCIAK (Warszawski Uniwersytet Medyczny), BOGUSŁAW SZEWCZYK (Uniwersytet Gdański),
ELŻBIETA TRAFNY (Wojskowa Akademia Techniczna),
STANISŁAWA TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA (Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego), GRZEGORZ WĘGRZYN (Uniwersytet Gdański),
PIOTR ZALESKI (Instytut Biotechnologii i Antybiotyków), PIOTR ZIELENKIEWICZ (Uniwersytet Warszawski)

REDAKCJA

JACEK BIELECKI (redaktor naczelny), RADOŚLAW STACHOWIAK (zastępca), BOHDAN STAROŚCIAK (redaktor),
PIOTR ZALESKI (sekretarz), MARTA BRZÓSTKOWSKA (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:

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

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

Redaktor: Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Oczki 3 (parter), 02-007 Warszawa; tel.: 22 6280822, 22 6211351

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

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: mgr Paweł Bącal, Pracownia Teorii i Zastosowań Elektrood, Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej,
Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski.*

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

Nakład 820 egz., Objętość 14,5 ark. wyd., Papier offset 90 g

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

Podziękowania

Redakcja *Postępów Mikrobiologii* serdecznie dziękuje naszym Recenzentom
spoza Rady Redakcyjnej:

Pani Doktor Tamarze Aleksandrak-Piekarczyk
Pani Profesor Annie Brillowskiej-Dąbrowskiej
Pani Profesor Irenie Choroszy-Król
Panu Profesorowi Robertowi Czajkowskiemu
Pani Profesor Elżbiecie Dackowskiej-Kozon
Panu Profesorowi Łukaszowi Drewniakowi
Pani Doktor Iwonie Gientka
Pani Doktor Renacie Godlewskiej
Pani Profesor Katarzynie Jagusztyn-Krynckiej
Pani Doktor Małgorzacie Kęsik-Brodackiej
Pani Profesor Barbarze Kieliszewskiej-Rokickiej
Pani Doktor Monice Kordowskiej-Wiater
Pani Doktor Magdalenie Kowalczyk
Pani Profesor Gayane Martirosian
Pani Doktor Marzenie Matejczyk
Pani Profesor Magdalenie Popowskiej
Pani Profesor Beacie Sobieszczańskiej
Pani Profesor Agnieszce Szalewskiej-Pałasz
Panu Profesorowi Piotrowi Walczakowi
Pani Profesor Marcie Wróblewskiej

Agnieszka Staniszevska*, Alina Kunicka-Styczyńska, Krzysztof Ziemiński

Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii,
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka

Wpłynęło w styczniu, zaakceptowano w czerwcu 2017 r.

1. Wprowadzenie. 2. Drobnoustroje w podziemnych magazynach gazu. 3. Mikroorganizmy w gazociągach. 4. Podsumowanie

Microbiological contaminations of underground gas storage facilities and natural gas pipelines

Abstract: The growing demand for natural gas is primarily due to an increase in the share of gas in electricity production. Replacing coal with natural gas results in a significant decrease in emissions of greenhouse gases and dusts. The presence of microorganisms may be the cause of underground gas storage (UGS) facilities and pipelines deterioration. Microorganisms and their metabolic products contribute to the formation of sudden and unexpected failure causing loss of energy security by: decline in the quality of stored gas or disruption of its transmission. The paper presents a variety of microbiomes of the underground storage facilities and pipelines, showing that not only the sulfate-reducing bacteria are able to grow and develop in these extreme environments. Microorganisms producing CH_4 may change the composition of the gas, and the produced H_2S and CO_2 are not only gas pollutants, but also generate corrosion of transmission networks. At the same time, the presence of bacteria and archaea in pipelines hinders the correct operation of the network, through the accumulation of biofilm and reduction in the pipe diameter.

Introduction. 2. Microorganisms in underground gas storage facilities. 3. Microorganisms in natural gas pipelines. 4. Summary

Słowa kluczowe: gazociągi, gaz ziemny, mikroorganizmy, podziemne magazyny gazu

Key words: natural gas pipelines, natural gas, microorganisms, underground gas storage facilities

1. Wprowadzenie

Wzrost zużycia źródeł energii elektrycznej jest skutkiem postępu technologicznego, wzrostu standardu życia i szeroko rozumianego rozwoju gospodarczego. Zachowanie niezawodnego i trwałego sektora energetycznego jest czynnikiem warunkującym stabilny rozwój oraz funkcjonowanie każdego państwa oraz całej Wspólnoty Europejskiej [10, 11]. Zapewnienie bezpieczeństwa energetycznego jest istotne w sferze społecznej, ekonomicznej, gospodarczej i politycznej. Zgodnie z Ustawą „Prawo energetyczne” [45], bezpieczeństwo energetyczne definiuje się jako „stan gospodarki umożliwiający pokrycie bieżącego i perspektywicznego zapotrzebowania odbiorców na paliwa i energię w sposób techniczny oraz ekonomicznie uzasadniony, przy zachowaniu wymagań ochrony środowiska”. Zwiększenie dbałości o środowisko i konieczność ograniczenia emisji CO_2 w sektorze energetycznym, skutkuje wzrostem zużycia gazu ziemnego, a zapewnienie jego dostaw staje się kluczowe dla gospodarki kraju. Surowiec ten jest najbardziej ekologicznym paliwem spośród kopalnych źródeł energii.

Produkcja energii elektrycznej z gazu ziemnego rozwijana jest głównie w państwach o dużych własnych zasobach gazu ziemnego (USA, Norwegia) lub w tych, w których ceny importowanego surowca są stosun-

kowo niskie (Wielka Brytania, Włochy). Ponadto, przyjęte np. w Unii Europejskiej cele klimatyczne stymulują państwa członkowskie do podobnych działań. W 2014 roku w Polsce udział gazu ziemnego w strukturze wytwarzania energii elektrycznej stanowił 2,06%, jednak do roku 2030 planowany jest wzrost nawet do 10% [7]. W tabeli I przedstawiono zużycie gazu ziemnego do produkcji energii elektrycznej na przykładzie

Tabela I
Udział gazu ziemnego kierowanego do produkcji energii elektrycznej w wybranych państwach

Państwo	Gazu ziemny przeznaczony do produkcji energii elektrycznej (%)			
	Rok			
	2000	2005	2010	2014
USA	17,3	21,2	26,0	26,4
Kanada	6,6	7,3	11,2	11,2
Norwegia	0,7	1,2	10,0	7,0
Wielka Brytania	25,4	25,7	30,4	24,3
Włochy	18,2	20,0	16,2	10,6
Niemcy	11,6	6,1	7,7	2,7
Francja	0,7	1,2	7,6	2,2
Czechy	0,6	0,5	0,2	0,1

Opracowanie własne na podstawie [15, 16]. Przedstawiono dane procentowe w odniesieniu do całkowitego zużycia gazu w danym kraju.

* Autor korespondencyjny: Agnieszka Staniszevska, Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka, ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź; tel. 42 631 34 79; e-mail: 800075@edu.p.lodz.pl

wybranych państw [16]. Ze względu na intensywny rozwój odnawialnych źródeł energii, po roku 2010 obserwowano, zwłaszcza w Europie, obniżenie produkcji energii elektrycznej z gazu ziemnego. Jednak ciągle rosnące wydobywanie i konsumpcja surowca również na cele energetyczne, z 36% do 40,2% ogólnej konsumpcji (odpowiednio w 2000 i 2012 roku), świadczy o konkurencyjności gazu ziemnego w produkcji energii [15].

Na bezpieczeństwo energetyczne oparte na sektorze gazu ziemnego mogą wpływać awarie instalacji i urządzeń wykorzystywanych do magazynowania oraz transportu tego paliwa. Dodatkowym czynnikiem może być też ograniczenie inwestycji w odnawianie infrastruktury gazowej, jak również obniżenie jakości transportowanego i przechowywanego w podziemnych magazynach gazu (PMG) błękitnego paliwa. Jedną z przyczyn awarii, skutkujących obniżeniem stopnia bezpieczeństwa energetycznego, mogą być mikroorganizmy i produkty ich przemiany materii.

Drobnoustroje, szczególnie prokariotyczne, charakteryzują się elastycznością metabolizmu, a liczba i rodzaj wytwarzanych enzymów jest zwykle indukowana czynnikami środowiskowymi. Szybka odpowiedź komórki na silny, wielokierunkowy stres środowiskowy umożliwia rozwój specyficznych mikroorganizmów nawet w niesprzyjających rozwojowi niszach ekologicznych [40, 44, 46]. Drobnoustroje rozprzestrzeniają się w środowiskach ekstremalnych takich jak PMG i gazociągi, gdzie dostępność składników odżywczych (makro- i mikroelementów) i wody jest utrudniona [12, 17, 18, 20, 21, 42]. Zdolność do wytwarzania różnorodnych enzymów, którą charakteryzują się bakterie i archeony, pozwala na kolonizację niemal wszystkich powierzchni abiotycznych, pod warunkiem obecności przynajmniej śladowych ilości wody. Niewielkie ilości wody zgromadzonej w skalnych przestrzeniach porowatych czy też wody kondensacyjnej w rurociągach gazowych umożliwiają rozwój drobnoustrojów prokariotycznych. Mikroorganizmy powodują nie tylko uszkodzenia materiałów technicznych (osłabienie struktury), ale również wytwarzają związki lotne jak np. siarkowodor [14]. Aktywność metaboliczna drobnoustrojów może być początkiem i/lub zwiększać szybkość procesów chemicznych i elektrochemicznych, skutkiem których jest zanieczyszczenie i obniżenie jakości magazynowanego gazu ziemnego, korozyja mikrobiologiczna gazociągów oraz zmniejszenie wydajności systemu przesyłowego w wyniku „zarastania” rurociągów [20, 21, 23, 38]. Ponadto, powstałe na skutek nadmiernego rozwoju drobnoustrojów przerwy w pracy instalacji oraz ewentualne awarie niosą zagrożenie dla środowiska naturalnego i ludzi oraz generują koszty utrzymania sieci [5, 43].

W niniejszej pracy przedstawiono różnorodność mikrobiomów znajdujących w istniejących obiektach

podziemnego magazynowania gazu oraz w sieci gazociągów. Celem autorów było również wskazanie problemów generowanych przez nadmierny i niekontrolowany rozwój bakterii i archeonów w tych obiektach.

2. Drobnoustroje w podziemnych magazynach gazu

Podziemne magazyny gazu (PMG) są najdogodniejszym sposobem gromadzenia i przechowywania gazu ziemnego. Gaz magazynuje się w szczerpanych złożach gazu ziemnego, w kawernach solnych lub w warstwie wodonośnej. Każdy ze sposobów magazynowania ma inną charakterystykę ekonomiczną, techniczną, różniąc się: kosztami operacyjnymi i inwestycyjnymi, mocami napełniania i odbioru, pojemnością i przepuszczalnością [4, 34]. Rolą wszystkich PMG jest zapewnienie ciągłości dostaw i niwelowanie nagłych różnic pomiędzy popytem a podażą gazu, czyli zapewnienie krótkookresowego i sezonowego bezpieczeństwa energetycznego. Bardzo ważne jest, aby obiekty te działały sprawnie, a magazynowane w nich paliwo nie zmieniało jakości [19, 22]. Ze względu na funkcję jaką PMG pełnią w utrzymaniu bezpieczeństwa energetycznego oraz potencjalne zagrożenie ekologiczne jakie ze sobą niosą w przypadku rozszczelnienia, obiekty te są stale monitorowane.

Magazynowanie gazu w podziemnych obiektach, w warunkach naturalnych obarczone jest trudnościami wynikającymi ze zmiany składu magazynowanego gazu oraz pojawienia się biogenego siarkowodoru o silnych właściwościach korozyjnych. Za przyczynę tych zaburzeń uważa się mikroorganizmy, głównie bakterie redukujące siarczany (SRB – Sulfate-Reducing Bacteria). Ponieważ są one mikroflorą towarzyszącą powstawaniu naturalnych złóż węglowodorów, w tym gazu ziemnego, spodziewano się ich obecności również w PMG [39, 43]. Obecność tych drobnoustrojów w PMG potwierdziły m.in. badania przeprowadzone przez Ivanovą i wsp. [17, 18]. Wykazano, że zatłaczany do magazynów gaz zawiera do 10^6 komórek bakterii beztlenowych w 1 ml. W mikrobiomie stwierdzono zróżnicowane fizjologicznie bakterie anaerobowe, w tym: redukujące żelazo ($10^2 \div 10^6$ kom/ml) i siarczany (pojedyncze komórki $\div 10^6$ kom/ml), acetogenne ($10 \div 10^4$ kom/ml) oraz metanogenne archeony ($10 \div 10^2$ kom/ml). Dodatkowo zauważono, że wraz ze wzrostem liczby cykli zatłaczania gazu wzrasta zarówno liczba drobnoustrojów, jak i poziom wytwarzanych przez nie metabolitów [18]. Podczas odbioru zmagazynowanego gazu w tym samym obiekcie, potwierdzono obecność archeonów metanogennych oraz różnych grup bakterii beztlenowych (redukujących siarczany i azotany, acetogennych, fermentujących) i tlenowych (utleniających węglowodory) [17]. Odnotowano, że mikroorganizmy znajdujące się w gazie istotnie zmieniają jego skład podczas magazynowania.

W badaniach przeprowadzonych w latach 2008–2015 stwierdzono, że wśród bakterii kolonizujących PMG dominują te, które wykazują zdolność do redukcji siarczanów (SRB) i tiosiarczanów (TRB – Thio-sulfate Reducing Bacteria), ale również obecne są bakterie redukujące azotany i żelazo. W głębokich warstwach magazynów mogą żyć mikroorganizmy mezofilne, fermentujące, metanogenne czy kwasotwórcze. Właściwości te wykazują bakterie z rodzaju: *Mesotoga*, *Eubacterium*, *Desulfovibrio*, *Sporomusa*, *Desulfocurvus* i archeony *Methanobacterium* oraz *Methanosarcina*, które zidentyfikowano w mikrobiomach PMG zlokalizowanych na terenie Rosji [2, 3, 33, 38]. W badaniach podziemnych magazynów gazu na terenie Niemiec, jako dominujące wskazano bakterie z rodzaju *Eubacterium*, *Acetobacterium* i *Sporobacterium* [6]. Wyniki badań różnorodności mikrobiomów PMG zebrano w tabeli II.

Badania próbek wody, pobranych z największego na świecie PMG utworzonego w szcerpanym złożu gazu ziemnego North Stavropol w Rosji [38], wskazują na przewagę w strukturze mikrobiomu mikroorganizmów beztlenowych, zdolnych do produkcji octanów, metanu i redukcji siarczanów. Badania nie doprowadziły do

identyfikacji występujących tam bakterii i archeonów do poziomu gatunku, lecz wskazano ich bliskie podobieństwo do *Desulfovibrio desulfuricans*, *Eubacterium limosum*, *Methanobacterium formicicum*, *Methanosarcina barkeri*, czy *Sporomusa sphaeroides*. Jednakże, w przeciwieństwie do mikroorganizmów do których są porównywane, nowo poznane szczepy są odporne na wysokie stężenie metanolu (nawet powyżej 50 g/l) i mogą intensywnie rozmnażać się w środowisku zawierającym do 20 g metanolu/l. Z gazu ziemnego z PMG Severo-Stavropolskoye w rejonie Północnego Kaukazu (Rosja), wyizolowano, a następnie scharakteryzowano nowy gatunek bakterii określany jako umiarkowanie termofilny. Bakterie te w warunkach beztlenowych były zdolne do redukcji azotanów, tiosiarczanów i siarki (S^0). Jedną z ciekawych cech tych organizmów była zdolność do wzrostu w warunkach obniżonego do 10% stężenia tlenu w gazie ziemnym. Ze względu na właściwości metaboliczne, wyizolowane bakterie zaliczono do klasy *Bacilli*, charakteryzującej się znaczną różnorodnością. W oparciu o homologię 16S rRNA, stwierdzono wysokie podobieństwo (95%) do bakterii *Vulcanibacillus modesticaldus*. Jednak, ze względu na swoisty charakter

Tabela II
Mikroorganizmy znajdujące w wybranych podziemnych magazynach gazu – PMG

Mikroorganizmy	Charakterystyka mikroorganizmów	Lokalizacja PMG	Piśmien- nictwo
<i>Morella perchloratireducens</i> sp. nov	bakterie termofilne redukujące chlorany (ClO_3^-) i nadchlorany (ClO_4^-) do chlorków (Cl^-)	Rosja brak lokalizacji PMG	[3]
<i>Desulfovibrio</i> sp., <i>Desulfotomaculum</i> sp.	bakterie redukujące siarczany	Polska PMG Wierchowice (utworzony w szcerpanym złożu gazu ziemnego)	[39]
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	bakterie utleniające związki siarki i żelaza		
<i>Thiobacillus thioparus</i>	bakterie utleniające związki siarki		
<i>Sporomusa</i> sp. szczep An4	w obecności (nad)chloranów metabolizują substancje organiczne (tj. glukoza, celobioza, ryboza, maślane, szczawiooctany, glikol, glicerol, cytrynian) głównie do dwutlenku węgla i niewielkich ilości octanów	Rosja brak lokalizacji PMG (utworzony w szcerpanym złożu gazu ziemnego)	[2]
Szczep AG12 blisko spokrewniony z <i>Eubacterium limosum</i> Szczep AG8-2 blisko spokrewniony z <i>Sporomusa sphaeroides</i>	bakterie wytwarzające octany – acetogeny	Rosja PMG North Stavropol (największy na świecie PMG utworzony w szcerpanym złożu gazu ziemnego)	[38]
Szczep MG134 blisko spokrewniony z <i>Methanobacterium formicicum</i> Szczep MGZ3 blisko spokrewniony z <i>Methanosarcina barkeri</i>	bakterie wytwarzające metan – metanogeny		
Szczep SR12 blisko spokrewniony z <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	bakterie redukujące siarczany		
<i>Tepidibacillus fermentans</i> sp. nov.	bakterie umiarkowanie termofilne, w warunkach beztlenowych redukują tiosiarczany, siarkę (S^0) i azotany	Rosja PMG Severo- Stavropolskoye (utworzony w szcerpanym złożu gazu ziemnego) bakterie fermentujące	[33]
<i>Eubacterium</i> sp., <i>Acetobacterium</i> sp., <i>Sporobacterium</i> sp.		Niemcy brak lokalizacji PMG	[6]

szczepu wyodrębniono go jako nowy rodzaj *Tepidibacillus* sp. i gatunek *Tepidibacillus fermentans* [33].

Wśród mikroorganizmów zasiedlających PMG zlokalizowanych na obszarze Federacji Rosyjskiej, po raz pierwszy zidentyfikowano bakterie termofilne redukujące chlorany (ClO_3^-) i nadchlorany (ClO_4^-) do chlorków (Cl^-). Na podstawie homologii 16S rRNA oraz zawartości G+C w DNA stwierdzono, że są one najbliższymi spokrewnione ze szczepami *Moorella thermoacetica* i *Moorella thermoautotrophica* (97%). Jednakże, w odróżnieniu od nich, nowo zidentyfikowane bakterie nie były zdolne do wykorzystania kwasów: mrówkowego, szczawiowego i gliksalowego jako źródła węgla. Bakterie te sklasyfikowano jako nowy gatunek z rodzaju *Moorella* – *Moorella perchloratireducens* sp. nov [3]. Innymi mikroorganizmami, zdolnymi do redukcji (nad)chloranów do chlorków, zasiedlającymi PMG w Rosji są bakterie z rodzaju *Sporomusa*. Wyizolowany szczep w obecności chloranów (ClO_3^-) i nadchloranów (ClO_4^-) metabolizował glukozę, celobiozę, rybozę, szczawiooctan, maślan, glikol, glicerol i cytrynian głównie do ditlenku węgla i octanów wytwarzanych w niewielkich ilościach. Przy braku w środowisku chloranów i nadchloranów produktem metabolizmu były jedynie octany [2]. Nowo sklasyfikowane bakterie z rodzaju *Sporomusa* i *M. perchloratireducens* charakteryzują się zdolnością do redukcji azotanów w obecności chloranów (ClO_3^-).

W prowadzonych w Polsce badaniach podziemnych magazynów gazu w obiektach PMG Wierzchowice i PMG Mogilno, stwierdzono występowanie siarkowodoru (H_2S), któremu towarzyszyła obecność anaerobowych bakterii należących do grupy SRB [35, 42]. Bakterie z rodzaju *Desulfovibrio* i *Desulfotomaculum*, odpowiedzialne za tworzenie siarkowodoru zwykle charakteryzują się znaczną tolerancją na ekstremalne warunki środowiska i odpornością na biocydy. Ze względu na silne właściwości adaptacyjne i zdolność do tworzenia biofilmu, drobnoustroje te stosunkowo szybko nabywają oporność na aktywne składniki biocydów. Mikroorga-

nizmy te trudno jest usunąć z powierzchni magazynowych, a walka z nimi jest długa i kosztowna [37, 39].

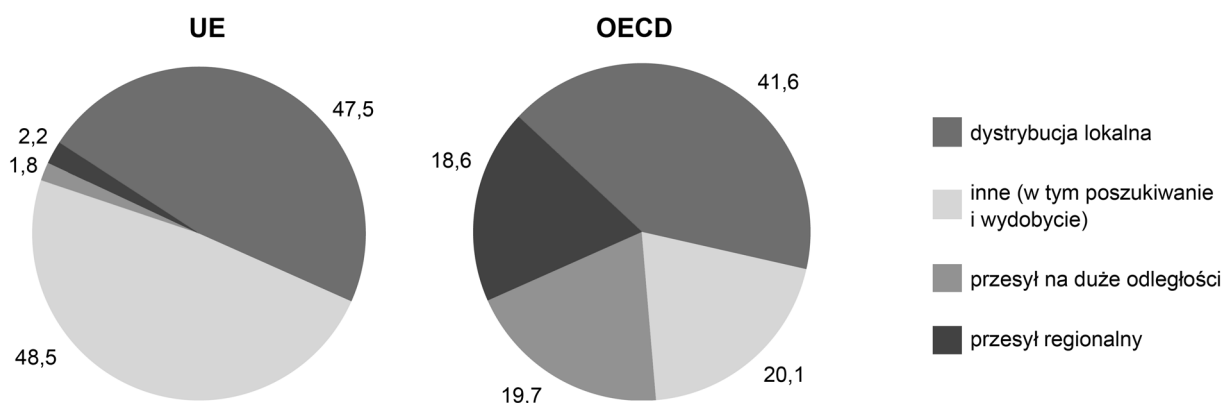
Dotychczasowe prace prowadzone w PMG, potwierdziły negatywny wpływ mikroorganizmów na jakość magazynowanego gazu i stan infrastruktury magazynowej [43]. Wytwarzany H_2S stanowi jedną z głównych przyczyn korozji mikrobiologicznej urządzeń i elementów, używanych w technologii magazynowania. Niekontrolowany i niczym nieograniczony rozwój mikroorganizmów i akumulacja biomasy może, skrajnych przypadkach, doprowadzić do zapychania urządzeń i spadku ciśnienia w magazynach, powodując straty ekonomiczne.

Eliminacja zaburzeń o charakterze mikrobiologicznym w czasie eksploatacji PMG jest bardzo ważna ze względu na zachowanie funkcji jakie spełniają te obiekty. Co gorsza, przenoszone wraz z gazem bakterie wywierają negatywny wpływ na stan techniczny i bezpieczeństwo gazociągów.

3. Mikroorganizmy w gazociągach

Najprostszym i najczęstszym sposobem przesyłu gazu ziemnego są gazociągi. Ta metoda transportu surowca do odbiorców ostatecznych jest stosunkowo tania, bezpieczna i przyjazna środowisku [28].

Gazociągi, którymi przesyłany jest gaz, różnią się zasięgiem, maksymalnym ciśnieniem roboczym, czy materiałem z którego zostały wykonane. Jednakże niezależnie od typu, są one poprowadzone na dużych głębokościach w glebie i pod wodą [37]. Taka lokalizacja utrudnia utrzymanie linii w dobrym stanie technicznym, monitorowanie powstałych uszkodzeń i wykonywanie niezbędnych napraw. Skutki wystąpienia awarii i powstałe zmiany w środowisku generują koszty. Tylko w ostatnich trzydziestu latach XX w. ok. 80% spośród odnotowanych wypadków w sektorze gazowym miało miejsce w czasie transportu gazu [31]. Rysunek 1



Rys. 1. Struktura wypadków w sektorze gazowym w latach 1969–2000

Dane wyrażone w %: UE – kraje Unii Europejskiej, OECD – kraje zrzeszone w Organisation for Economic Co-operation and Development [8].

przedstawia strukturę wypadków w sektorze gazowym w latach 1969–2000 w państwach ówczynie należących do Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju – OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development oraz w państwach Unii Europejskiej.

Najczęściej stosowanym materiałem do budowy linii gazowych są rury stalowe. Można je stosować niezależnie od przeznaczenia gazociągu i ciśnień w nim panujących. Szerokie możliwości eksploatacyjne rur stalowych wynikają z łatwości modyfikowania właściwości mechanicznych i technologicznych samej stali. Jedną z głównych przyczyn pojawienia się usterek i przerw w pracy gazociągów jest korozja. Rosnąca skala zjawiska jak i rozmiar strat z nią związanych przyczyniły się do rozwoju badań nad inicjacją i przebiegiem tego procesu. Dotychczasowe doniesienia i doświadczenia w zakresie ochrony sieci gazowych przed korozją ich powierzchni zewnętrznej, pozwoliły na ograniczenie rozwoju tego zjawiska [32]. Stosowane obecnie powłoki izolacyjne i wymuszony przepływ prądu elektrycznego od strony gleby do powierzchni gazociągu nie wyeliminowały jednak korozji wzbudzonej przez mikroorganizmy (MIC – Microbiologically Influenced/Induced Corrosion) po wewnętrznej stronie rurociągów.

Rozwojowi drobnoustrojów wewnątrz gazociągów sprzyja zarówno skład gazu ziemnego, jak i rur stalowych. Obecność azotu, czy śladowych ilości dwutlenku węgla i pary wodnej, których nie można całkowicie usunąć w procesie uzdatniania gazu ziemnego, stymuluje rozwój mikroorganizmów [12]. Ponadto, pierwiastki chemiczne wchodzące w skład rur stalowych (tabela III) są źródłem makroelementów (np.: siarki, fosforu, żelaza) i mikroelementów (m.in.: manganu) [9].

Korozja wywołana przez mikroorganizmy, obok strat materiałowych związanych z tzw. „cyklem życia” gazociągów, uważana jest za główną przyczynę usterek gazociągów. Korozja metalu stymulowana przez

drobnoustroje jest określona różnymi terminami i opisywana jako biodeterioracja, korozja biologiczna, biokorozja lub też korozja wywołana przez mikroorganizmy (MIC) [13]. Z dotychczasowych badań wynika, że około 40% przypadków korozji gazociągów to korozja wywołana przez mikroorganizmy [21, 26, 29]. Szacuje się również, że szkody spowodowane korozją biologiczną stanowią nawet 20–30% ogólnych kosztów ponoszonych na skutek korozji gazociągów [1].

Pierwszych obserwacji i wyjaśnienia zjawiska korozji w warunkach beztlenowych dokonali Van Wolzonghe Kühr i Van der Vlugt w 1934. Sformułowana przez nich teoria katodowej depolaryzacji metali opiera się na zdolnościach bakterii redukujących siarczany (SRB) do wykorzystania jonów wodorowych w procesach metabolicznych [9]. Od tego czasu bakterie redukujące siarczany (SRB) i tiosiarczany (TRB) są najczęściej opisywaną grupą mikroorganizmów odpowiedzialnych za biokorozję [13, 21, 29, 41, 42]. Jest to grupa obejmująca ponad 200 gatunków, zróżnicowana pod względem morfologicznym. Wytwarzany przez te bakterie enzym hydrogenaza, umożliwia komórkom wykorzystanie wodoru w procesie redukcji siarczanów. W efekcie powstaje siarkowodór, który powoduje silną korozję metali. W obecności anaerobowych bakterii redukujących siarczany szybkość korozji jest proporcjonalna do aktywności hydrogenaz [23, 28]. Porównując tempo korozji w środowisku sterylnym i w obecności SRB stwierdzono, że w obecności tych mikroorganizmów korozja postępuje nawet 70–90-krotnie szybciej [13].

Pomimo zdolności SBR do kolonizowania powierzchni stali i wywoływania biokorozji, nie stanowią one dominującej grupy bakterii w próbkach osadów i płynów pobranych z wnętrza gazociągów. Potwierdzają to badania mikrobiomu gazociągów przemysłowych w USA [44], jak i zlokalizowanych w rejonie Zatoki Meksykańskiej [20, 21]. W obu przypadkach

Tabela III

Skład chemiczny wybranych rur stalowych do mediów palnych stosowanych obecnie w przemyśle

Oznaczenie stali	Maksymalna zawartość [%]							
	C	Si	Mn	P	S	V	Nb	Ti
Stale dla rur ze szwem i bez szwu								
L245NB	0,16	0,40	1,10	0,025	–	–	–	–
L415NB	0,21	0,45	1,60	0,025	0,15	0,15	0,05	0,04
Stale dla rur bez szwu								
L360QB	0,16	0,45	1,40	0,025	0,02	0,08	0,05	0,04
L555QB	0,16	0,45	1,80	0,025	0,02	0,10	0,06	0,06
Stale dla rur ze szwem								
L245MB	0,16	0,45	1,50	0,025	0,02	0,04	0,50	–
L450MB	0,16	0,45	1,60	0,025	0,02	0,10	0,50	0,06

Na podstawie [25].

wśród SRB opisywanych jako bakterie odpowiedzialne za korozję, zidentyfikowano *Desulfovibrio desulfuricans*, a ponadto rozpoznano *D. aminophilus* (Meksyk) i *D. vulgaris* (USA). W gazociągach rejonu Zatoki Meksykańskiej wykryto również *Clostridium celer-crescens*, *C. sporogenes*, *C. perfringens*, jednakże są to bakterie odległe taksonomicznie od grupy clostridiów redukujących siarczany. Badane w Meksyku próbki biofilmu pochodziły z gazociągu transportującego kwaśny gaz ziemny (zawierający: siarkowodór, węglowodory o niskiej masie cząsteczkowej, ditlenek węgla i azot), możliwe więc, że mała różnorodność bakterii redukujących siarczany wynikała w tym przypadku ze specyficznych warunków środowiskowych. Badania prowadzone przez zespół pod kierownictwem Jan-Roblero [20, 21] wykazały ponadto obecność mikroorganizmów z rodziny *Enterobacteriace*, tj.: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, czy *Shewanella*. Bakterie te wykazują zdolność do produkcji pozakomórkowych polisacharydów (EPS – Extracellular Polymeric Substances), które ułatwiają formowanie biofilmu na powierzchniach wewnętrznych gazociągów. Ponadto, w wyniku przemian metabolicznych *Citrobacter freundii* i *C. amalonatus* powstaje biogeny H_2S , który jest silnym czynnikiem korozyjnym.

W próbkach pobranych z gazociągów przemysłowych USA [47] dominowały bakterie *Comomonas denitrificans* i *Escherichia coli*, do tej pory niespotykane w środowisku gazu ziemnego. Wysoka częstotliwość występowania *C. denitrificans* w badanych próbkach wskazuje, że zdolność do metabolizowania azotu determinuje skład gatunkowy bakterii występujących wewnątrz gazociągów. Analiza mikrobiomu wskazuje również na obecność bakterii z rodzaju *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Anaerofilum*, *Bacteroides* czy *Klebsiella*.

W skład konsorcjum mikroorganizmów zasiedlających gazociągi mogą również wchodzić metanogenne archeony, zaliczane do rzędu: *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales* [47].

Koegzystencję różnych gatunków bakterii i archeonów, wywołujących MIC wewnątrz rurociągów transportujących gaz ziemny, można obserwować w formie osadów luźno związanych z powierzchnią metalu, bądź narośli, a nawet wżerów i ubytków materiału [27]. Powstałe osady korozyjne mogą charakteryzować się różną barwą i zapachem [9, 29]. Objawem korozji, w której udział biorą bakterie żelazowe, są rude i brązowe osady. Czarne produkty MIC i towarzyszący im zapach siarkowodoru wskazuje, że w procesie biorą udział bakterie redukujące siarczany, a zewnętrzną powłokę guzka tworzy najczęściej magnetyt (Fe_3O_4). Objawem korozji biologicznej w gazociągach może być charakterystyczny dla tych instalacji czarny osad (tzw. „black powder”) [12]. Jest on bardzo drobny, lekki

i zwienny kiedy jest suchy, może też być smołowaty w obecności wilgoci. W jego skład wchodzi głównie tlenki i wodorotlenki żelaza, syderyt ($FeCO_3$) oraz zanieczyszczenia takie jak elementarna siarka, węglowodory, odłamki metali, piasek i kurz. Zarówno forma sucha, jak i mokra tego osadu przysparzają kłopotów operatorom gazociągów, ponieważ są czynnikami erozyjnymi materiałów, z których zbudowane są gazociągi. Ponadto, kumulacja „black powder” prowadzi do zapychania i zmniejszenia przepustowości rurociągów.

Zmiany powstałe w efekcie rozwoju mikroorganizmów wewnątrz linii gazowych zakłócają prawidłową i bezawaryjną pracę systemu przesyłu gazu. W wyniku rozwoju biofilmu, drobnoustrojów, czy narastania „black powder” może dochodzić nawet do zmniejszenia przekroju gazociągu i obniżenia jego przepustowości [12, 23], co generuje straty ponoszone w gałęziach przemysłu dla których gaz ziemny jest podstawowym surowcem. Ponadto, wpływają na obniżenie właściwości mechanicznych materiałów, a nawet powodują ich ubytki. Konsekwencją tych zmian może być pęknięcie gazociągu i gwałtowny wyciek gazu.

4. Podsumowanie

Z dotychczasowych badań wynika, że mikroorganizmy są często niedocenianym zagrożeniem dla podziemnych magazynów gazu i gazociągów, a ich działalność skutkuje zasiarczeniem gazu ziemnego oraz korozyjnymi zniszczeniami infrastruktury magazynowej i przesyłowej. Rozwój populacji mikroorganizmów prowadzi również do spadku ciśnienia w podziemnych magazynach gazu i zmniejszenia światła (zarastania) rur, którymi płynie gaz, a także nagłych awarii i niekontrolowanych wycieków paliwa. W konsekwencji, rosną koszty ponoszone przez operatorów systemu gazowego i użytkowników gazu ziemnego, obniża się bezpieczeństwo energetyczne i wzrasta zagrożenie skażenia środowiska naturalnego.

Obecnie nie ma jednego uniwersalnego i niezawodnego sposobu na zahamowanie korozji biologicznej w sektorze gazu ziemnego. Dostępne rozwiązania zapobiegające lub ograniczające rozwój drobnoustrojów, które wykorzystują np. nanocząsteczki i biocydy, w systemach magazynowania i przesyłu gazu ziemnego nie są stosowane w wystarczającym stopniu ze względu na rozmiar i lokalizację PMG i gazociągów. Do biocydów zalecanych do stosowania w przemyśle naftowym należą głównie substancje zawierające aminy czwartorzędowe oraz pochodne triazyny [39]. Korozję biologiczną wewnątrz sieci gazowej można ograniczyć poprzez osuszanie przesyłanego paliwa. Akceptowalna ilość wody dla gazu na terenie Europy wynosi 84 ppm [12]. Poza tym, operatorzy gazociągów i PMG mogą

jedynie monitorować stan podległej im infrastruktury i usuwać i/lub naprawiać skorodowane fragmenty.

Rozpoznane i opisane dotychczas mikroorganizmy rozwijające się w środowisku gazu ziemnego to głównie bakterie i archeony. Wyniki badań prowadzonych w podziemnych magazynach gazu i gazociągach wskazują na różnice w składzie konsorcjum poszczególnych siedlisk, ze względu na zróżnicowane warunki w PMG i liniach przesyłowych. Niektóre grupy mikroorganizmów wchodzi w skład zarówno mikrobiomów zbiorników gazu, jak i linii przesyłowych, co wskazuje na możliwość ich przemieszczania się wraz z tonią gazu i rozprzestrzeniania się w systemie gazowym. Chociaż badania nad strukturą konsorcjów mikroorganizmów funkcjonujących w gazociągach i PMG przyczyniły się do poszerzenia wiedzy na temat bioróżnorodności oraz wykrycia niespecyficznych dla atmosfery gazu ziemnego mikroorganizmów, to skład tych konsorcjów nie został jeszcze w pełni poznany.

Podjęte próby ograniczenia rozwoju mikroorganizmów w systemach składowania i przesyłu gazu ziemnego nie wyeliminowały problemu biokorozji. Dopiero rozpoznanie mikrobiomów tych środowisk i dokonanie ich charakterystyki umożliwi opracowanie nowych, skutecznych sposobów ochrony systemów gazu ziemnego przed biokorozją.

Podziękowania

Artykuł powstał w wyniku realizacji projektu finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2015/17/N/NZ9/03683.

Autorzy składają podziękowania prof. dr hab. Zofii Żakowskiej za merytoryczną korektę manuskryptu.

Piśmiennictwo

- Al Abbas F.M., Spear J.R., Kakpovbia A., Balhareth N.M., Olson D.L., Mishra B.: Bacterial attachment to metal substrate and its effects on microbiologically-influenced corrosion in transporting hydrocarbon pipelines. *J. Pipeline Eng.* **1**, 63–72 (2012)
- Balk M., Mehboob F., van Gelder A.H., Rijpstra W.I.C., Damsté J.S.S., Strams A.J.M.: (Per)chlorate reduction by an acetogenic bacterium, *Sporomusa* sp., isolated from an underground gas storage. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **88**, 595–603 (2010)
- Balk M., van Gelder T., Weelink S.A., Strams A.J.M.: (Per)chlorate reduction by the thermophilic bacterium *Moorella per-chloratireducens* sp. nov., isolated from underground gas storage. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 403–409 (2008)
- Banks N., Gaunce J.: Natural Gas Storage Regimes in Canada: A Survey. ISEEE Research Paper, December 2009, dostęp: http://www.law.ucalgary.ca/files/law/banks_and_gaunce_natural-gas_storage_regimes_in_canada-1.pdf (04.01.2017)
- Bartling C.: Microbially induced corrosion: The silent killer of infrastructure. *Pipeline Gas J.* **1**, 73–74 (2016)
- Bombach P., van Almsick T., Richnow H.H., Zenner M., Krüger M.: Microbial life in an underground gas storage reservoir. *Geophys. Res. Abstr.* **17**, EGU2015-15756 (2015)
- Bučko P.: Perspektywy wykorzystania gazu ziemnego do produkcji energii elektrycznej w Polsce. *Rynek Energii*, **3**, 17–22 (2015)
- Burgherr P., Hirschberg S.: Severe accident risks in fossil energy chains: A comparative analysis. *Energy*, **33**, 538–553 (2008)
- Cwalina B.: Metale i stopy (w) *Mikrobiologia materiałów*, red. B. Zyska, Z. Żakowska, Wyd. Politechniki Łódzkiej, Łódź, 2005, s. 413–445
- Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/72/WE z dnia 13 lipca 2009 r. dotycząca wspólnych zasad rynku wewnętrznego energii elektrycznej i uchylająca dyrektywę 2003/54/WE. Dz. U. UE L 09.211.55
- Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/73/WE z dnia 13 lipca 2009 r. dotycząca wspólnych zasad rynku wewnętrznego gazu ziemnego i uchylająca dyrektywę 2003/55/WE. Dz. U. UE L 09.211.94
- El-Sherik A.: Managing black powder in sales-gas transmission pipelines. *J. Pipeline Eng.* **1**, 19–24 (2016)
- Enning D., Garrelfs J.: Corrosion of iron by sulfate-reducing bacteria: New views of an old problem. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 1226–1236 (2014)
- Gutarowska B.: Niszczenie materiałów technicznych przez drobnoustroje. *LAB*, **18**, 10–14 (2013)
- International Energy Agency: Natural gas information 2016 edition, http://wds.iea.org/wds/pdf/Gas_documentation.pdf (04.01.2017)
- International Energy Agency: Statistics search, <https://www.iea.org/statistics/statisticssearch/> (04.01.2017)
- Ivanova A.E., Borzenkov I.A., Tarasov A.L., Milekhina E.I., Belyaev S.S.: A microbiological study of an underground gas storage in the process of gas extraction. *Microbiology*, **76**, 461–468 (2007a)
- Ivanova A.E., Borzenkov I.A., Tarasov A.L., Milekhina E.I., Belyaev S.S.: A microbiological study of an underground gas storage in the process of gas injection. *Microbiology*, **76**, 453–460 (2007b)
- Janusz P., Kaliski M., Szurlej A.: Role of underground gas storage in the EU natural gas market. *AGH Drilling, Oil, Gas*, **31**, 11–23 (2014)
- Jan-Roblero J., Romero J.M., Amaya M., Le Borgne S.: Phylogenetic characterization of a corrosive consortium isolated from a sour gas pipeline. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 862–867 (2004)
- Jan-Roblero J., Posadas A., Zavala Díaz de la Serna J., García R., Hernández-Rodríguez C.: Phylogenetic characterization of bacterial consortia obtained of corroding gas pipelines in Mexico. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 1775–1784 (2008)
- Kaliski M., Janusz P., Szurlej A.: Podziemne magazyny gazu jako element krajowego systemu gazowego. *Nafta – Gaz*, **5**, 325–332 (2010)
- Khan T.S., Al-Shehhi M.S.: Review of black powder in gas pipelines – An industrial perspective. *J. Natural Gas Sci. Eng.* **25**, 66–76 (2015)
- Mehanna M., Basséguy R., Déla M.-L., Bergel A.: Effect of *Geobacter sulfurreducens* on the microbial corrosion of mild steel, ferritic and austenitic stainless steel. *Corros. Sci.* **51**, 2596–2604 (2009)
- Materiały informacyjne firmy Mistal sp. z o.o. <http://mystal.pl/en10208#norma> (04.01.2017)
- Mori K., Tsurumaru H., Harayama S.: Iron corrosion activity of anaerobic hydrogen-consuming microorganisms isolated from oil facilities. *J. Biosci. Bioeng.* **110**, 426–430 (2010)
- Ossai Ch. I.: Advances In Asset Management Techniques: An overview of corrosion mechanisms and mitigation strategies for

- oil and gas pipelines. *Int. Schol. Res. Network ISRN Corrosion*, DOI: 10.5402/2012/570143 (2012)
28. Papavinasam S.: Oil and gas industry network (w) *Corrosion Control in the Oil and Gas Industry*, red. S. Papavinasam, Elsevier, Amsterdam, 2014, s. 41–132
29. Rajasekar A., Anadkumar B., Maruthamuthu S., Ting Y.-P., Rahman P.K.S.M.: Characterization of corrosive bacterial consortia isolated from petroleum-product-transporting pipelines. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 1175–1188 (2010)
30. Rubio C., Ott C., Amiel C., Dupont-Moral I., Traveret J., Mariey L.: Sulfato/thiosulfato reducing bacteria characterization by FT-IR spectroscopy: A new approach to biocorrosion control. *J. Microbiol. Methods*, **64**, 287–296 (2006)
31. Rusik A., Stolecka K.: Poważne uszkodzenia rurociągów i ich skutki. *Rynek Energii*, **6**, 97–102 (2009)
32. Rządowski J.: Uszkodzenia korozyjne rurociągów. *Rurociągi*, **34**, 12–15 (2004)
33. Sobodkina G.B., Panteleeva A.N., Kostrikina N.A., Kopitsyn D.S., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I.: *Tepidibacillus fermentans* gen. nov., sp. nov.: a moderately thermophilic anaerobic and microaerophilic bacterium from an underground gas storage. *Extremophiles*, **17**, 833–839 (2013)
34. Stopa J., Rychlicki S., Kosowski P.: Rola podziemnego magazynowania gazu w kawernach solnych. *Gospod. Surowcami Min.* **24**, 11–23 (2008)
35. Such P., Turkiewicz A., Kapusta P., Stopa J., Rychlicki S.: Zastosowanie biocydów w celu ograniczenia rozwoju flory bakteryjnej w PMG. *Wiertnictwo Nafta Gaz*, **24**, 553–558 (2007)
36. Szurlej A., Kamiński J., Janusz P., Iwicki K., Mirowski T.: Rozwój energetyki gazowej w Polsce a bezpieczeństwo energetyczne. *Rynek Energii*, **6**, 33–38 (2014)
37. Szymczyk K.: Tradycyjne a rozwojowe rozwiązania w metodach dystrybucji gazu ziemnego na świecie. *Logistyka*, **1**, 33–35 (2015)
38. Tarasov A.L., Borzenkov I.A., Chernykh N.A., Belyayev S.S.: Isolation and investigation of anaerobic microorganisms involved in methanol transformation in an underground gas storage facility. *Microbiology*, **80**, 171–179 (2011)
39. Turkiewicz A.: Metody przeciwdziałania procesom tworzenia się biogenego H_2S w podziemnych magazynach gazu. *Nafta – Gaz*, **3**, 220–227 (2009)
40. Turkiewicz A.: The role of microorganisms in the oil and gas industry. *Rocznik Ochrony Środowiska*, **13**, 227–239 (2011)
41. Turkiewicz A., Brzeszcz J., Kapusta P.: The application of biocides in the oil and gas industry. *Nafta – Gaz*, **2**, 103–111 (2013)
42. Turkiewicz A., Kania M., Janiga M.: Badanie mikrobiologiczne i analizy chemiczne zawartości związków siarki w mediach złożowych pochodzących z warstw solnych obiektu magazynowania gazu ziemnego. *Nafta – Gaz*, **8**, 588–598 (2013)
43. Turkiewicz A., Kapusta P., Brzeszcz J.: Mikroorganizmy i procesy mikrobiologiczne w przemyśle naftowym. *Nafta – Gaz*, **10**, 805–811 (2009)
44. Turkiewicz M.: Drobnoustroje psychrofilne i ich biotechnologiczny potencjał. *Kosmos*, **4**, 307–320 (2006)
45. Ustawa z dnia 10 kwietnia 1997 r. Prawo energetyczne, Dz. U. z 1997 r., Nr 54, poz. 348
46. Węgrzyn A., Żukrowski K.: Biotechnologiczne zastosowanie ekstremozymów pozyskiwanych z archeonów. *Chemicz.* **68**, 710–722 (2014)
47. Zhu X.Y., Lubeck J., Kilbane II J.J.: Characterization of microbial communities in gas industry pipelines. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5354–5363 (2003)

Paweł Mirosław*, Aleksandra Antos, Mirosław Polak

Zakład Wirusologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Wpłynęło w marcu, zaakceptowano w lipcu 2017 r.

1. Wprowadzenie. 2. Charakterystyka wirusa BVD. 3. Zróżnicowanie genetyczne. 4. Znaczenie zmienności genetycznej. 5. Podsumowanie

Genetic diversity of bovine diarrhea and mucosal disease virus

Abstract: Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is classified as a member of the *Pestivirus* genus of the *Flaviviridae* family. BVDV is one of the most important viral pathogens of ruminants worldwide, causing severe economic losses. Infection results in a wide range of clinical manifestations, ranging from mild respiratory disease to fetal death and mucosal disease. The virus particles are small and contain a single-stranded, positive-sense RNA molecule of approximately 12.3 kb with one large open reading frame flanked by two untranslated regions (5'UTR and 3'UTR). The polyprotein is proteolytically cleaved by viral and host proteases resulting in the formation of mature viral proteins. It is well established that BVDV strains show considerable genetic diversity. BVD viruses are classified as two species: BVDV-1 and BVDV-2. Quite recently, a new putative species, BVDV-3, was detected. The viruses exist as one of two biotypes: cytopathic or non-cytopathic, based on their activity in cell cultures. The phylogenetic analysis of the 5'UTR and N^{pro} region has revealed at least 21 distinct subtypes of BVDV-1 and 4 subtypes of BVDV-2. Genetic diversity of BVD viruses has serious clinical implications such as immune evasion, increase of virulence, host range alteration and also affects the efficacy of vaccination programmes and diagnostic methods.

1. Introduction. 2. Characteristics of BVD virus. 3. Genetic diversity. 4. The importance of genetic variation. 5. Conclusion

Słowa kluczowe: diagnostyka, podtypy, wirus biegunki bydła i choroby błon śluzowych, zmienność genetyczna
Key words: diagnostics, subtypes, bovine viral diarrhea and mucosal disease virus, genetic diversity

1. Wprowadzenie

Wirusy zawierające materiał genetyczny w postaci kwasu rybonukleinowego (RNA) charakteryzują się brakiem stabilności genetycznej oraz korzystają z wielu mechanizmów zmienności co zapewnia im przetrwanie w środowisku [8, 45, 57]. Cechy wyróżniające wirusy RNA to ogromna liczebność, produktywny cykl replikacyjny, niewielki oraz plastyczny genom podlegający nieprecyzyjnej replikacji. To sprawia, że egzystują w naturze jako wiele blisko spokrewnionych podtypów. Dynamikę ich zmienności charakteryzuje ciągłe powstawanie nowych wariantów i selekcja najlepiej przystosowanych szczepów do różnorodnych warunków środowiska [8, 45].

Wirus biegunki bydła i choroby błon śluzowych (Bovine Viral Diarrhea Virus – BVDV) jest patogenem ważnym z ekonomicznego punktu widzenia. Wirus ten wywołuje szerokie spektrum objawów klinicznych od łagodnych zachorowań z objawami najczęściej ze strony układu oddechowego, pokarmowego i rozrodczego aż do ciężkich infekcji, zamierania zarodków i poronień oraz rozwoju śmiertelnej choroby błon śluzowych (Mucosal disease – MD) [3]. Szacuje się, że ogólne straty wywołane przez BVDV oscylują na poziomie 10–40 milionów dolarów na jeden milion wycieleń [18].

2. Charakterystyka wirusa BVD

Wirus BVD należy do rodziny *Flaviviridae*, rodzaju *Pestivirus*. W oparciu o wspólne cechy genetyczne i strukturalne do rodziny *Flaviviridae* zakwalifikowano również m.in. wirusy Zachodniego Nilu, Denga, żółtej febry i wirus zapalenia wątroby typu C. Rodzaj *Pestivirus* zawiera cztery gatunki: wirus biegunki bydła i choroby błon śluzowych gatunków 1 i 2 (BVDV-1, BVDV-2), wirus choroby granicznej owiec (Border Disease Virus – BDV) oraz wirus klasycznego pomoru świń (Classical Swine Fever Virus – CSFV). Proponowana jest także nowa klasyfikacja uzupełniona o 4 nowo zidentyfikowane wirusy, które posiadają znamiona pestiwirusów, ale nie pasują do żadnego z czterech gatunków: BVDV-3 (atypowe pestiwirusy bydłace; wirusy HoBi-podobne), pestiwirus żyrafy, pestiwirus antylopy Pronghorn i wirus Bungowannah [23].

Wirion BVDV o wielkości 40–60 nm, zbudowany jest z rdzenia w postaci genomowego RNA pokrytego kapsydem, który otacza dwuwarstwowa błona lipidowa zawierająca glikoproteiny kodowane przez wirusowy materiał genetyczny [35].

Genom wirusa tworzy pojedynczą nić RNA o dodatniej polarności i długości około 12 300 par zasad [35]. Genomowe RNA nie jest poliadenylowane w końcu 3'

* Autor korespondencyjny: Paweł Mirosław, Zakład Wirusologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; tel. 81 889 31 21; e-mail: pawel.miroslaw@piwet.pulawy.pl

ani nie posiada czapeczki dołączanej na końcu 5'. RNA zawiera pojedynczą otwartą ramkę odczytu (Open Reading Frame – ORF), która koduje wszystkie białka wirusowe [6]. Powstająca poliproteina jest potranslacyjnie cięta zarówno przez wirusowe jak i komórkowe proteazy w celu uzyskania strukturalnych i niestrukturalnych białek wirusa. Na końcach 5' i 3' znajdują się regiony niekodujące (Untranslated Region – UTR) [14]. Tworzą one struktury drugorzędowe, które pełnią funkcje związane z procesami regulacji replikacji oraz translacji. 5'UTR zawiera wewnętrzne miejsce wiązania rybosomów (Internal Ribosomal Entry Site – IRES) uczestniczące w procesie inicjacji translacji [6, 13], z kolei w obrębie regionu 3'UTR zlokalizowane są elementy odpowiedzialne za terminację procesu translacji [19]. Regiony 5'UTR i 3'UTR są także niezbędne do efektywnej replikacji wirusa BVD [6, 19].

Otwarta ramka odczytu koduje około 4000 aminokwasów, z których po cięciu powstaje od 11 do 12 białek strukturalnych oraz niestrukturalnych. Do niestrukturalnych należą białka N^{pro}, NS2-3 (NS2, NS3), NS4A, NS4B, NS5A, NS5B i p7 do strukturalnych białka C, E^{ms}, E1, E2 [41]. N-końcowe białko (N^{pro}) jest autoproteazą cysteinową, która odcina samą siebie od kolejnego białka płaszcza (Core protein – C) oraz indukuje proteasomalną degradację czynnika transkrypcyjnego interferonu β – IRF3 (Interferon regulatory factor 3) [5, 14]. Kolejne białko E^{ms} jest silnie glikozylowane, wydzielane w postaci rozpuszczalnej przez zainfekowane komórki, występuje w postaci homodimerów [16]. Glikoproteina E^{ms} zawiera epitopy wykorzystywane do diagnostyki zakażeń BVDV [15, 35]. Białko to ma unikalną cechę RNazy, degradowe jednoniciowe jak i dwuniciowe fragmenty RNA [16]. Białko E^{ms} jest luźno umocowane na powierzchni wirionu poprzez amfipatyczną helisę znajdującą się na C-końcowej części białka. Ta słaba interakcja pozwala E^{ms} oddzielić się od wirionu [52]. Glikoproteiny błonowe, E1 i E2 są integralnymi białkami błonowymi, niezbędnymi w procesie zakażenia. Glikoproteina E2 jest podstawowym elementem konstrukcyjnym wirionu i zawiera główne determinanty antygenowe. Przeważająca część humoralnej odpowiedzi immunologicznej jest nakierowana właśnie na epitopy białka E2 znajdujące się na jego N-końcu. Uważa się, że C-koniec ektodomeny E2, posiada funkcję wiązania z receptorem komórkowym [27] CD46 oraz LDL-R [37]. Niecytopatyczne (Non-cytopathic – ncp) szczepy BVDV kodują białko niestrukturalne NS2-3, natomiast u szczepów o biotypie cytopatycznym (Cytopathic – cp) białko to jest cięte na dwa odrębne białka: NS2 i NS3. Białko NS3 określane jest jako marker cytopatyczności, gdyż występuje wyłącznie u szczepów cytopatycznych wirusa BVD [41]. Niestrukturalne białko NS3 posiada aktywność proteazy serynowej. Enzym ten jest odpowiedzialny za wiele cięć wirusowej poliproteiny. Pro-

teaza serynowa NS3 odcina białka niestrukturalne. Natomiast białko NS4A służy jako kofaktor tej proteazy [24]. Białko NS4B jest prawdopodobnie składnikiem kompleksu replikacyjnego RNA oraz jest zaangażowane w przegrupowanie błony komórkowej w zakażonej komórce [56]. NS5A i NS5B są kodowane na C-końcu poliproteiny BVDV. NS5A jest fosfoproteiną niezbędną w procesie replikacji jednak o nie do końca scharakteryzowanej funkcji. NS5B posiada aktywność RNA-zależnej polimerazy RNA i jest głównym białkiem biorącym udział w replikacji genomowego RNA [20]. Z kolei białko p7 odgrywa ważną rolę w cyklu życiowym pestiwirusów. Bez jego udziału nie jest możliwe wytworzenie zakaźnych wirusów, nie bierze ono jednak udziału w procesie replikacji RNA [28].

3. Zróżnicowanie genetyczne

Powszechnie uznaje się, że szczepy BVDV wykazują znaczne zróżnicowanie genetyczne [12, 34, 35]. Podstawowym czynnikiem warunkującym mutacje w genomach wirusowych są błędy wynikające z nieprecyzyjnej replikacji kwasu nukleinowego przez RNA-zależną polimerazę RNA (NS5B). Wirusowe polimerazy RNA nie posiadają w przeciwieństwie do polimeraz DNA zdolności korekty błędów powstających podczas syntezy nici potomnych. Liczba błędów popełnianych przez RNA-zależną polimerazę RNA, której aktywność w przypadku wirusa BVD wykazuje białko NS5B wynosi około 1 na 10⁴ nukleotydów w jednym cyklu replikacyjnym. Oznacza to, że każdy 12,5 kb nowo zsintetyzowany genom może różnić się od kolejnego w przybliżeniu o jeden nukleotyd [2].

Wirus biegunki bydła i choroby błon śluzowych można podzielić na biotypy oraz gatunki [35, 42]. Biotyp definiowany jest jako cecha fenotypowa w oparciu o obecność lub brak efektu cytopatycznego w zakażonej hodowli komórkowej obserwowanej w mikroskopie świetlnym [51]. Różnice w biotypach są w dużej mierze wynikiem zmian w wirusowych genomach spowodowanych procesem rekombinacji. Rekombinacja może zachodzić pomiędzy cząsteczkami RNA wirusów albo pomiędzy genomem wirusa, a komórkowym RNA gospodarza [42]. Pojawienie się szczepu o biotypie cytopatycznym (cp) może być również wynikiem transformacji wirusa niecytopatycznego (ncp) do wirusa cp w wyniku duplikacji fragmentu genomu. Izolacja szczepów cp możliwa jest tylko w przypadku osobników z chorobą błon śluzowych (MD) [21]. Choroba ta występuje rzadko, ale śmiertelność wynosi 100%. Dotyczy ona osobników zakażonych trwale szczepem ncp (Persistently Infected – PI), które ulegają nadkażeniu homologicznym szczepem cp w stosunku do szczepu ncp, który jest odpowiedzialny za wystąpienie zakaże-

nia trwałego. Większość osobników chorych na MD pada w ciągu pierwszych 6–24 miesięcy życia. Wirusy cp i ncp izolowane od takich osobników są identyczne antygenowo i określane jako szczepy homologiczne [41].

Zmienność genetyczna BVDV przejawia się w obecności dwóch gatunków tego wirusa: BVDV-1 oraz BVDV-2. Niedawno odkryto przypuszczalnie nowy gatunek: BVDV-3 (HoBi-like) [47].

Na podstawie analizy filogenetycznej regionów 5'UTR, N^{pro} i E2 genomu wirusa wyróżniono do tej pory 21 podtypów BVDV-1 (od BVDV-1a do BVDV-1u) [1, 7, 12, 32, 34, 47, 54]. Na podstawie podobnych analiz tych samych regionów zdefiniowano 4 podtypy gatunku BVDV-2: od 2a do 2d [7, 11, 13, 40]. Obszerny zbiór szczepów BVDV z Włoch poddano genotypowaniu w oparciu o fragmenty 5'UTR oraz N^{pro} i przydzielono je do poszczególnych podtypów. Większość ferm bydła zakażonych było podtypem BVDV-1a, oraz BVDV-1b i BVDV-1e. Pozostałe podtypy występowały sporadycznie. Wykryto obecność 4 dodatkowych podtypów, nie opisanych poprzednio a mianowicie BVDV-1r, BVDV-1s, BVDV-1t [12] oraz 1u [7]. W Niemczech 95% szczepów BVDV zaliczono do gatunku 1. Analiza około 600 szczepów wirusa z lat 2008–2014 wykazała, że podtypy BVDV-1b i BVDV-1d występowały najczęściej [46]. W Austrii większość szczepów należała do podtypów BVDV-1h i BVDV-1f [17]. Szwajcarskie szczepy uzyskane od zwierząt chorych na wirusową biegunkę bydła (BVD) sklasyfikowano jako gatunek 1 z podtypami 1e, 1h, 1k i 1b w porządku malejącym [49]. BVDV izolowane od bydła w Słowenii zaliczono do gatunku 1, a ponad 88% zbadanych szczepów należało do podtypów 1f oraz 1d [53]. Filogenetyczna analiza fragmentów 5'UTR genomów wirusa BVD-1 krążącego w Anglii i Walii, wykazała obecność podtypów 1a, 1b, 1e, 1f oraz 1i. Analiza filogenetyczna sekwencji nukleotydów w regionie N^{pro} potwierdziła wyniki uzyskane dla regionu 5'UTR [50]. Z kolei szczepy japońskie tego wirusa zaliczono do gatunku BVDV-1 i BVDV-2 z dominującymi podtypami 1b i 2a [1]. Podobne wyniki uzyskano badając próbki od bydła w Korei. Większość szczepów należała do podtypów 1a, 1b i 2a [36]. Wszystkie indyjskie szczepy wirusa BVD zaliczono do podtypu 1b [32]. Jako ciekawostkę można podać fakt, że jedyny szczep należący do gatunku 2 wirusa wykryto w Indiach u owcy i był to podtyp 2b [33]. Natomiast w Australii najbardziej rozpowszechnionym wariantem wirusa okazał się podtyp 1c [44]. Dominującymi podtypami wirusa w Brazylii okazały się podtypy BVDV-1a i BVDV-2b [47]. Na tym tle, różnorodność polskich szczepów BVDV jest na podobnym poziomie. Większość z nich zaliczono do dwóch podtypów: 1b i 1d [25]. Natomiast BVDV-2 wykryto w Polsce tylko w jednym gospodarstwie i był to podtyp 2a [40]. Badania przeprowadzone

w Europie, Azji, Afryce Południowej i Brazylii wykazały, że BVDV-2 nie jest ograniczony tylko do Ameryki Północnej, choć występuje tam znacznie częściej niż w Europie [40, 47].

Badania Vilcka i wsp. pokazują, że procent identyczności sekwencji nukleotydowych pomiędzy szczepami BVDV-2 w obrębie regionu 5'UTR mieści się w zakresie 81–99%. Podobny odsetek uzyskano w przypadku BVDV-1 (76–99%) [55]. Niektóre argentyńskie szczepy zaliczone na podstawie wysoce konserwatywnego regionu 5'UTR do tego samego podtypu 1b wykazywały znaczne zróżnicowanie antygenowe, co sugeruje konieczność uwzględnienia dodatkowych regionów kodujących w badaniach filogenetycznych [39].

Do tej pory opisano co najmniej dziewięć tzw. atypowych pestiwirusów (HoBi-like). Osiem jest prawdopodobnie brazylijskiego pochodzenia, a jeden pochodzenia tajskiego. Analiza filogenetyczna fragmentu regionu 5'UTR genomu tych wirusów wykazała genetyczne zróżnicowanie w obrębie tego gatunku, sugerując istnienie dwóch podgrup [31, 48]. Wirusy HoBi charakteryzują się wysokim stopniem podobieństwa sekwencji nukleotydowych, przekraczającym 93%. Najbardziej zmienny fragment genomu kodujący glikoproteinę E2 wirusów HoBi wykazuje większe podobieństwo do BVDV-2 niż BVDV-1 [4].

4. Znaczenie zmienności genetycznej

Genetyczna zmienność wirusów może prowadzić do dużych zmian w ich właściwościach biologicznych, w tym zmian ich zjadliwości, adaptacji do nowych gospodarzy, a nawet do pojawiania się chorób zakaźnych o nieznanym wcześniej przebiegu klinicznym. Szybka ewolucja wirusów stwarza poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Zakażenie zwierząt niektórymi szczepami BVDV-2 prowadzi do ciężkiej choroby, określanej jako zespół krwotoczny (Haemorrhagic Syndrome – HS) [40, 42]. Charakteryzuje się ona znaczną wybroczynowością oraz krwawieniami z miejsc iniekcji z powodu znaczącego spadku liczby trombocytów. Szczepy BVDV-2c prowadzą do pojawiania się objawów klinicznych typowych dla zjadliwych szczepów wirusa CSFV [11]. Podtyp BVDV-1b częściej niż inne podtypy izolowano od bydła z chorobami układu oddechowego. Podobna prawidłowość dotyczyła cieląt z objawami zapalenia płuc [10]. Także podtyp BVDV-1d wiązany jest z chorobami układu oddechowego cieląt. Podtyp BVD-1e często izolowano od martwo urodzonych cieląt oraz od poronionych płodów, co sugeruje, że podtyp ten może odgrywać istotną rolę w zaburzeniach prenatalnych i okołoporodowych [3]. BVDV-1e wykryto także w próbkach płynu pęcherzykowego jajników u brazylijskich krów. Zjawisko

to budzi obawy w odniesieniu do ryzyka transmisji choroby z zarodkami pozyskiwanymi do transferu [47].

Zmienność genetyczna wirusa BVD utrudnia wdrożenie czułych metod diagnostycznych oraz skutecznych programów profilaktycznych (szczepionek). BVDV jest często izolowany od zwierząt szczepionych przeciw zakażeniu tym patogenem [9] co nasuwa obawy, czy szczepionki, w większości zawierające podtyp 1a, mogą skutecznie chronić bydło przed innymi podtypami wirusa. Wyniki badań wykazały, że aktualnie stosowane szczepionki żywe, atenuowane (MLV) zawierające szczepki BVDV-1a indukują niższe miana przeciwciał dla BVDV-1b [9, 39]. W Polsce wirusy o podtypie 1b i 1f izolowano od zwierząt wykazujących objawy kliniczne, pomimo iż wcześniej zostały poddane szczepieniom z wykorzystaniem szczepionki opartej na podtypie 1a [25, dane nieopublikowane]. Kilka szczepionek, dostępnych w Brazylii zawiera szczepki BVDV-1 i BVDV-2 z USA i Europy, które nie są homologiczne do wirusów, krążących w tym kraju. Biorąc pod uwagę różnice genetyczne opisane powyżej, szczepionki przeznaczone do stosowania w innych krajach prawdopodobnie nie będą skuteczne w Brazylii (odmienne podtypy). Różnice antygenowe ograniczają ochronę krzyżową między odmiennymi gatunkami i podtypami pestiwirusów bydła [1]. Przegląd amerykańskich szczepów BVDV wyizolowanych od bydła oraz z zanieczyszczonych wirusem bydlęcych surowic płodowych (Fetal Bovine Serum – FBS) sugeruje, że odsetek BVDV-2 oraz BVDV-1 zbliżył się w USA do wartości 50/50 [43]. Niektórzy badacze stwierdzają iż może to mieć związek ze stosowaniem szczepionek żywych. Takie szczepionki nigdy nie były stosowane w Słowenii, Szwecji oraz Wielkiej Brytanii, gdzie nie stwierdzono obecności BVDV-2 w populacji bydła [53]. Z drugiej strony brak BVDV-1a w polskich stadach bydła może wskazywać, że prowadzone historycznie szczepienia z użyciem szczepionek opartych na tym podtypie wirusa skutecznie wyeliminowały go z krajowej populacji bydła [25].

Genetyczna zmienność BVDV jest także istotna dla skutecznej diagnostyki laboratoryjnej, która powinna umożliwiać wykrycie jak największej liczby gatunków i podtypów tego wirusa. Mutacje w regionie genu kodującego glikoproteinę E^{rns} gatunku BVDV-2 uniemożliwiają wykrycie antygeny tego wirusa w komercyjnym teście ELISA opartym na E^{rns} BVDV-1 [15]. W przypadku atypowych pestiwirusów rutynowo stosowana izolacja wirusa oraz badania testem ELISA dawały wyniki ujemne [38]. Aby umożliwić wykrywanie nowo pojawiających się podtypów wirusa potrzebne są nowe lub modyfikowane techniki biologii molekularnej [1]. Test PCR w czasie rzeczywistym umożliwia wykrywanie i klasyfikowanie szczepów należących do 1 i 2 gatunku wirusa BVD z użyciem pary starterów

w obrębie wysoce konserwatywnego regionu 5'UTR oraz dwóch sond TaqMan [29]. Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) produktów PCR pozwala różnicować polskie podtypy wirusa BVD z wykorzystaniem 3 enzymów restrykcyjnych. W badaniach tą techniką wykorzystano 60 szczepów gatunku BVDV-1, które zawierały podtypy: 1a, 1b, 1d, 1e, 1f i 1g oraz podtyp 2a gatunku BVDV-2 [26]. Zastosowanie RT-PCR z wykorzystaniem dedykowanych starterów dla atypowych pestiwirusów pozwoliło na wykrycie materiału genetycznego HoBi-like wirusów. Opracowano też metodę real-time RT-PCR, pozwalającą na selektywne wykrywanie wirusów HoBi [30] jak również alternatywny test LD-PCR (long distance – PCR) umożliwiający amplifikację całego genomu wirusa [22].

5. Podsumowanie

Podsumowując, wirus biegunki i choroby błon śluzowych bydła charakteryzuje się ogromną różnorodnością genetyczną. Na podstawie analiz filogenetycznych wyróżniono 3 gatunki wirusa obejmujące wiele podtypów. Tak duża zmienność ma swoje odzwierciedlenie w szerokiej gamie objawów klinicznych oraz trudnościach w opracowaniu czułych metod diagnostycznych jak i skutecznych szczepionek. Można przyjąć że w niedalekiej przyszłości zostaną odkryte dodatkowe warianty wirusa BVD, zwiększając tym samym jego zróżnicowanie genetyczne oraz potencjał przetrwania w środowisku.

Piśmiennictwo

1. Abe Y.: Genetic and antigenic characterization of bovine viral diarrhoea viruses isolated from cattle in Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **78**, 61–70 (2016)
2. Anderson J.P., Daifuku R., Loeb L.A.: Viral error catastrophe by mutagenic nucleosides. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 183–205 (2004)
3. Bachofen C., Braun U., Hilbe M., Ehrensperger F., Stalder H., Peterhans E.: Clinical appearance and pathology of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus of different genetic subgroups. *Vet. Microbiol.* **141**, 258–267 (2010)
4. Bauermann F.V., Flores E.F., Ridpath J.F.: Antigenic relationships between Bovine viral diarrhoea virus 1 and 2 and HoBi virus: Possible impacts on diagnosis and control. *J. Vet. Diagn. Invest.* **24**, 253–261 (2012)
5. Bauhofer O., Summerfield A., Sakoda Y., Tratschin J.D., Hofmann M.A., Ruggli N.: Classical swine fever virus Npro interacts with interferon regulatory factor 3 and induces its proteasomal degradation. *J. Virol.* **81**, 3087–3096 (2007)
6. Becher P., Orlich M., Thiel H.: Mutations in the 5' Nontranslated Region of Bovine Viral Diarrhoea Virus Result in Altered Growth Characteristics. *J. Virol.* **74**, 7884–7894 (2000)
7. Decaro N., Elia G. i wsp.: Evidence for Circulation of Bovine Viral Diarrhoea Virus Type 2c in Ruminants in Southern Italy. *Transbound. Emerg. Dis.* DOI: 10.1111/tbed (2016)

8. Domingo E., Holland J.: RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**, 151–178 (1997)
9. Fulton R.W., Ridpath J.F., Confer A.W., Saliki J.T., Burge L.J., Payton M. E.: Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmes. *Biologicals*, **31**, 89–95 (2003)
10. Fulton R.W., Ridpath J.F., Saliki J.T., Briggs R.E., Confer A.W., Burge L.J., Purdy C.W., Loan R.W., Duff G.C., Payton M.E.: Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 1b: predominant BVDV subtype in calves with respiratory disease. *Can. J. Vet. Res.* **66**, 181–190 (2002)
11. Gethmann J., Homeier T., Holsteg M., Schirrmeier H., Saßerath M., Hoffmann B., Beer M., Conraths F.J.: BVD-2 outbreak leads to high losses in cattle farms in Western Germany. *Heliyon*, **1**, e00019 (2015)
12. Giammarioli M., Ceglie L., Rossi E., Bazzucchi M., Casciari C., Petrini S., De Mia G.M.: Increased genetic diversity of BVDV-1: recent Findings and implications thereof. *Virus Genes*, **50**, 147–151 (2015)
13. Giangaspero M., Harasawa R., Weber L., Belloli A.: Genoepidemiological Evaluation of Bovine viral diarrhoea virus 2 Species Based on Secondary Structures in the 5' Untranslated Region. *J. Vet. Med. Sci.* **70**, 571–580 (2008)
14. Gottipati K., Acholi S., Ruggli N., Choi K.: Autocatalytic activity and substrate specificity of the pestivirus N-terminal protease N^{pro}. *Virology*, 452–453, 303–309 (2014)
15. Gripshover E.M., Givens M.D., Ridpath J.F., Brock K.V., Whitley E.M., Sartin E.A.: Variation in Erns viral glycoprotein associated with failure of immunohistochemistry and commercial antigen capture ELISA to detect a field strain of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.* **125**, 11–21 (2007)
16. Hausmann, Roman-Sosa G., Thiel H., Rümenapf T.: Classical Swine Fever Virus Glycoprotein Erns Is an Endoribonuclease with an Unusual Base Specificity. *J. Virol.* **78**, 5507–5512 (2004)
17. Hornberg A., Fernandez S.R., Vogl C., Vilcek S., Matt M., Fink M., Kofer J., Schopf K.: Genetic diversity of pestivirus isolates in cattle from Western Austria. *Vet. Microbiol.* **135**, 205–213 (2009)
18. Houe H.: Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals*, **31**, 137–143 (2003)
19. Isken O., Grassmann C.W., Yu H., Behrens S.E.: Complex signals in the genomic 3' nontranslated region of bovine viral diarrhoea virus coordinate translation and replication of the viral RNA. *RNA*, **10**, 1637–1652 (2004)
20. Isken O., Langerwisch U., Schönherr R., Lamp B., Schröder K., Duden R., Rümenapf T., Tautz N.: Functional Characterization of Bovine Viral Diarrhoea Virus Nonstructural Protein 5A by Reverse Genetic Analysis and Live Cell Imaging. *J. Virol.* **88**, 82–98 (2014)
21. Jenckel M., Hoper D., Schirrmeier H., Reimann I., Goller K., Beer M.: Mixed Triple: allied viruses in unique isolates of recent highly virulent type 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV-2) detected by deep sequencing. *J. Virol.* **88**, 6983–6992 (2014)
22. Jones L.R., Zandomeni R.O., Weber E.L.: A long distance RT-PCR able to amplify the Pestivirus genome. *J. Virol. Methods*. **134**, 197–204 (2006)
23. King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J.: Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2012
24. Klemens O., Dubrau D., Tautz N.: Characterization of the Determinants of NS2-3-Independent Virion Morphogenesis of Pestiviruses. *J. Virol.* **89**, 11668–11680 (2015)
25. Kuta A., Polak M.P., Larska M., Żmudziński J.F.: Predominance of bovine viral diarrhoea virus 1b and 1d subtypes during eight years of survey in Poland. *Vet. Microbiol.* **166**, 639–644 (2013)
26. Kuta A., Polak M.P., Larska M., Żmudziński J.F.: Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by restriction fragment length polymorphism (RFLP) and identification of a new subtype in Poland. *B. Vet. I. Pulawy*. **59**, 19–22 (2015)
27. Lang Y., Gao S., Du J., Shao J., Cong G., Lin T., Zhao F., Liu L., Chang H.: Polymorphic genetic characterization of E2 gene of bovine viral diarrhoea virus in China. *Vet. Microbiol.* **174**, 554–559 (2014)
28. Largo E., Gladue D., Huarte N., Borca M., Nieva J.: Pore-forming activity of pestivirus p7 in a minimal model system supports genus-specific viroporin function. *Antivir. Res.* **101**, 30–36 (2014)
29. Letellier C., Kerkhofs P.: Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol. Methods*. **114**, 21–27 (2003)
30. Liu L., Xia H., Belak S., Baule C.: A TaqMan real time RT-PCR assay for selective detection of atypical bovine pestivirus in clinical and biological products. *J. Virol. Methods*. **154**, 82–85 (2008)
31. Liu L., Xia H., Wahlberg N., Belák S., Baule C.: Phylogeny, classification and evolutionary insight into pestiviruses. *Virology*, **385**, 351–357 (2009)
32. Mishra N., Pattnaik B., Vilcek S., Patil S.S., Jain P., Swamy N., Bhatia S., Pradhan H.K.: Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus isolates from India. *Vet. Microbiol.* **104**, 207–212 (2004)
33. Mishra N., Rajukumar K., Vilcek S., Tiwari A., Satav J.S., Dubey S.C.: Molecular characterization of bovine viral diarrhoea virus type 2 isolate originating from a native Indian sheep (Oviesaries). *Vet. Microbiol.* **130**, 88–98 (2008)
34. Nagai M., Hayashi M., Sugita S., Sakoda Y., Mori M., Murakami T., Ozawa T., Yamada N., Akashi H.: Phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea viruses using five different genetic regions. *Virus Res.* **99**, 103–113 (2004)
35. Neill J.D.: Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus. *Biologicals*, **41**, 2–7 (2013)
36. Oem J., Chung J., Roh I., Kim H., Bae Y., Lee K., Jin Y., Lee O.: Characterization and phylogenetic analysis of Bovine viral diarrhoea virus in brain tissues from nonambulatory (downer) cattle in Korea. *J. Vet. Invest.* **22**, 518–523 (2010)
37. Ostachuk A.: Bovine viral diarrhoea virus structural protein E2 as a complement regulatory protein. *Arch. Virol.* **161**, 1769–1782 (2016)
38. Paletto S., Zuccon F., Pitti M., Gobbi E., Marco L., Caramelli M., Masoero L., Acutis P.L.: Detection and phylogenetic analysis of an atypical pestivirus, strain IZSPLV_To. *Res. Vet. Sci.* **92**, 147–150 (2012)
39. Pecora A., Malacari D.A., Ridpath J.F., Aguirreburualde M.S. Perez, Combessies G., Odeón A.C., Romera S.A., Golemba M.D., Widgorovitz A.: First finding of genetic and antigenic diversity in 1b-BVDV isolates from Argentina. *Res. Vet. Sci.* **96**, 204–212 (2013)
40. Polak M. P., Kuta A., Rybałowski W., Rola J., Larska M., Żmudziński J. F.: First report of bovine Viral diarrhoea virus-2 infection in cattle in Poland. *Vet. J.* **202**, 643–645 (2014)
41. Quadros V.L., Mayer S.V., Vogel E.S.F., Welblen R., Brum M.C.S., Arenhart S., Flores E.F.: A search for RNA insertions and NS3 gene duplication in the genome of cytopathic isolates of bovine viral diarrhoea virus. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **39**, 935–944 (2006)
42. Ridpath J.F.: BVDV genotypes and biotypes: practical implications for diagnosis and control. *Biologicals*, **31**, 127–131 (2003)
43. Ridpath J.F.: Practical significance of heterogeneity among BVDV strains: Impact of biotype and genotype on U.S. control programs. *Prev. Vet. Med.* **72**, 17–30 (2005)

44. Ridpath J.F., Fulton R.W., Kirkland P.D., Neill J.D.: Prevalence and antigenic differences observed between Bovine viral diarrhoea virus subgenotypes isolated from cattle in Australia and feedlots in the southwestern United States. *J. Vet. Invest.* **22**, 184–191 (2010)
45. Sanjuán R., Domingo-Calap P.: Mechanisms of viral mutation. *Cell Mol. Sci.* **73**, 4433–4448 (2016)
46. Schirrmeier H.: Three years of mandatory BVDV control in Germany – lessons to be learned. Proceedings of the 28th World Buiatrics Congress WBC, Australia, 2014
47. Silveira S., Weber M.N., Mosena A.C.S., Silva M.S., Streck A.F., Pescador C.A., Flores E.F., Weiblen R., Driemeier D., Ridpath J.F., Canal C.W.: Genetic Diversity of Brazilian Bovine Pestiviruses Detected Between 1995 and 2014. *Transbound. Emerg. Dis.* doi: 10.1111/tbed (2015)
48. Stahl K., Beer M., Schirrmeier H., Hoffman B., Belak S., Alenius S.: Atypical 'HoBi'-like pestiviruses-Recent findings and implications thereof. *Vet. Microbiol.* **142**, 90–93 (2010)
49. Stalder H.P., Meier P., Pfaffen G., Wageck-Canal C., Rufenacht J., Schaller P., Bachofen C., Marti S., Vogt H.R., Peterhans E.: Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. *Prev. Vet. Med.* **72**, 37–41 (2005)
50. Strong R., Errington J., Cook R., Ross-Smith N., Wakeley P., Steinbach E.: Increased phylogenetic diversity of bovine viral diarrhoea virus type 1 isolates in England and Wales since 2001. *Vet. Microbiol.* **162**, 315–320 (2013)
51. Tautz N., Meyers G., Thiel H.J.: Pathogenesis of mucosal disease, a deadly disease of cattle caused by a pestivirus. *Clin. Diagn. Virol.* **10**, 121–127 (1998)
52. Tews B.A., Meyers G.: The pestivirus glycoprotein Erns is anchored in plane in the membrane via an amphipathic helix. *J. Biol. Chem.* **282**, 32730–32741 (2007)
53. Toplak I., Sandvik T., Barlic-Maganja D., Grom J., Paton D.J.: Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus: most Slovenian isolates are of genotypes 1d and 1f. *Vet. Microbiol.* **99**, 175–185 (2004)
54. Uttenhal A., Stadejek T., Nylin B.: Genetic diversity of bovine viral diarrhoea viruses (BVDV) in Denmark during a 10-year eradication period. *Acta Path. Micro. Im.* **113**, 536–541 (2005)
55. Vilcek S., Durkovic B., Kolesarova M., Greiser-Wilke I., Paton D.: Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group. *Vet. Res.* **35**, 609–615 (2004)
56. Weiskircher E., Aligo J., Ning G., Konan K.V.: Bovine viral diarrhoea virus NS4B protein is an integral membrane protein associated with Golgi markers and rearranged host membranes. *Virol. J.* **3**, 185 (2009)
57. Worobey M., Holmes E.: Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *J. Gen. Virol.* **80**, 2535–2543 (1999)

Karol Abramczyk*, Anna Gałązka

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

Wpłynęło w marcu, zaakceptowano w lipcu 2017 r.

1. Wstęp. 2. Wąglik (*Bacillus anthracis*). 2.1. Patogenność *Bacillus anthracis*. 2.2. Diagnostyka i leczenie wąglika. 3. Dżuma (*Yersinia pestis*). 3.1. Patogenność *Yersinia pestis*. 3.2. Diagnostyka i leczenie dżumy. 4. Tularemia (*Francisella tularensis*). 4.1. Patogenność *Francisella tularensis*. 4.2. Diagnostyka i leczenie tularemii. 5. Wirus Ebola. 5.1. Patogenność wirusa Ebola (Ebola Virus Disease – EVD). 5.2. Diagnostyka i leczenie gorączki krwotocznej EVD. 6. Podsumowanie

Deadly microbes – microbes used as a biological weapon

Abstract: Due to the development of civilization, people's needs and expectations increase. The global development of civilization, the desire of some countries to expand their borders and achieve a higher political, social and military influence, cause insecurity among the people. Security is one of the main factors for the proper functioning of individuals and whole societies. Currently, a major threat to people is terrorism. Especially dangerous is the use of biological weapons for this purpose, which significantly interferes with a sense of security and restricts the freedom of human activities. Currently, biological terrorism is a global threat associated with the use of weapons for political or religious reasons. The threat from radical religious fundamentalists is particularly dangerous.

The most common biological threat agents are microorganisms causing zoonoses, i.e. diseases which can be transmitted from animals to humans. The most dangerous are *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* and *Francisella tularensis*. They are characterized by high virulence, ease of spread and the possibility to obtain and use them at low cost.

The aim of this paper is to characterize, based on the available literature, the most dangerous microorganisms which pose a potential threat to humans as biological warfare. The article also provides basic information on the diagnosis and treatment of diseases caused by pathogens which can be used in a bioterrorist attack.

1. Introduction. 2. Anthrax (*Bacillus anthracis*). 2.1. Pathogenicity of anthrax. 2.2. Diagnosis and treatment of anthrax. 3. Plague (*Yersinia pestis*). 3.1. Pathogenicity of *Yersinia pestis*. 3.2. Diagnosis and treatment of plague. 4. Tularemia (*Francisella tularensis*). 4.1. Pathogenicity of *Francisella tularensis*. 4.2. Diagnosis and treatment of *Francisella tularensis*. 5. Ebola virus. 5.1. Pathogenicity of Ebola virus. 5.2. Diagnosis and treatment of Ebola Virus Disease (EVD). 6. Summary

Słowa kluczowe: Broń biologiczna, mikroorganizmy, terroryzm, zagrożenie

Key words: Biological weapons, microorganisms, terrorism, threat

1. Wstęp

Dzisiejszy świat dostarcza ludzkości wiele wyzwań. W związku z ogromnym rozwojem cywilizacji potrzeby i oczekiwania ludzi są ogromne. Wiele udogodnień jakie współczesna cywilizacja oferuje ludziom, takich jak: dostępność zasobów naturalnych, nowinki technologiczne, coraz bardziej rozrastająca się sieć komunikacji czy nieograniczona możliwość przemieszczania się stwarza równocześnie obawy o zachowanie poczucia bezpieczeństwa. Bezpieczeństwo jest jednym z podstawowych czynników pozwalających na prawidłowe funkcjonowanie ludzi i całych społeczeństw. W obecnych czasach obserwuje się rosnące potrzeby militarne niektórych państw, dążenie do imperializmu i władzy totalitarnej. W znaczący sposób czynniki te powodują zachwianie poczucia bezpieczeństwa i ograniczają swobodę działania ludzi. Aktualnie wiele dyskusji w środowiskach politycznych, wojskowych i cywilnych wzbudza terroryzm jako zagrożenie globalne. Terroryzm

w najbardziej podstawowym znaczeniu kojarzony jest bowiem z użyciem lub groźbą użycia przemocy przede wszystkim w celach politycznych lub religijnych. Zagrożenie ze strony radykalnych fundamentalistów religijnych jest szczególnie niebezpieczne.

Wśród licznych mikroorganizmów wymienianych jako możliwe czynniki broni biologicznej, znaczny udział mają te, które wywołują u ludzi choroby odzwierzęce tzw. zoonozy. Do najczęściej wymienianych należą: pałeczka wąglika oraz pałeczki dżumy i tularemii [9]. Mikroorganizmy te są zaliczane w klasyfikacji CDC (Center for Disease Control), dotyczącej broni biologicznej do kategorii A tzn. odznaczają się znaczną zakaźnością i powodują wysoką śmiertelność. Patogeny te są rzadko spotykane w Stanach Zjednoczonych lecz ze względu na ogromne zagrożenie dla zdrowia publicznego wymagają specjalnych działań realizowanych przez rząd federalny [9].

Jedną z najbardziej szkodliwych bakterii służących jako potencjalna broń biologiczna jest wąglik.

* Autor korespondencyjny: Karol Abramczyk, Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Czarotoryskich 8, 24-100 Puławy; tel. 814 786 960; e-mail: kabramczyk@iung.pulawy.pl

Patogen ten charakteryzuje się łatwością hodowli oraz zdolnością do tworzenia niezwykle odpornych na warunki środowiska form przetrwalnych, które są łatwe do transportu, przechowywania i rozproszenia jako bioaerazol [9, 18]. Zastosowanie bioaerazolu zawierającego przetrwalniki jest najskuteczniejszą metodą użycia *Bacillus anthracis* jako broni biologicznej, ponieważ jest szybka, prosta w użyciu i prowadzi do rozwoju najcięższej (płucnej) postaci węglik. Aby wywołać tą postać choroby wystarczy wchłonięcie 8 000 do 50 000 zarodników, a okres wylegania wynosi od 1–6 dni. Do śmierci w przypadkach nie leczonych dochodzi w ciągu 3–5 dni u 97% chorych [9, 13]. Przykładem na skuteczność użycia węglik jako broni biologicznej była awaria w zakładzie opracowującym i magazynującym broń biologiczną w Swierdłowsku (Rosja) w 1979 r. Do atmosfery przedostało się wówczas około 1–2 g zarodników węglik w formie aerazolu, powodując zakażenie postacią płucną 79 osób, z których 68 zmarło [13]. Według oceny Office of Technology Assessment Kongresu USA rozproszenie 100 kg zarodników *B. anthracis* nad Waszyngtonem mogłoby spowodować śmierć od 130 tysięcy do 3 milionów ludzi i jest porównywalne z wybuchem bomby wodorowej. Mimo, że nie potwierdzono dotąd transmisji węglik wśród ludzi przykłady te pokazują jak bardzo groźną i skuteczną bronią biologiczną jest węgiel [13].

Kolejnym bardzo groźnym patogenem jest pałeczka dżumy – *Yersinia pestis*. „Zaletami” tej bakterii jako broni biologicznej jest jej wysoka zaraźliwość, łatwość w rozprzestrzenianiu się, powodowanie wysokiej śmiertelności i powszechna wrażliwość populacji z racji stosunkowo rzadkiego występowania dżumy w krajach rozwiniętych. Ponadto pałeczki dżumy w postaci aerazolu w świetle słonecznym zachowują swoją żywotność przez kilka godzin, a w glebie ponad 1 rok [12]. Pałeczki dżumy znane były jako broń biologiczna już od dawna. W 1346 roku Tatarzy oblegający twierdzę Kaffa na Półwyspie Krymskim zrezygnowali z oblężenia twierdzy z powodu wysokiej śmiertelności powodowanej przez dżumę (zakażenie przez gryzonie i pchły). Uciekając statkami do Konstantynopola, Genui, Wenecji i innych portów Morza Śródziemnego rozprzestrzenili tę chorobę [9]. Ostatnia większa epidemia dżumy miała miejsce w Mandżurii, w latach 1910–1911 gdzie zachorowało około 60 tys. ludzi. Podczas II wojny światowej również w Mandżurii Japończycy (tzw. oddział „Toro”) rozwinęli na znaczną skalę produkcję pałeczek dżumy oraz hodowlę pcheł i zarażonych szczurów. Skuteczność zadżumionych szczurów była następnie testowana wśród chińskich jeńców oraz chińskiej ludności z pobliskich 11 miast [9, 12]. Badania nad bronią biologiczną wykorzystującą pałeczki dżumy po II wojnie światowej prowadzili nadal USA i ZSRR. Stany Zjednoczone zaprzestały produkować broń biologiczną w postaci

Y. pestis w 1969 roku, natomiast w ZSSR produkcja taka była prowadzona co najmniej do 1992 roku. Trzeba nadmienić iż uczonym radzieckim udało się otrzymać genetycznie zmodyfikowaną pałeczkę dżumy, oporną na antybiotyki [9]. Pałeczki dżumy mogą być stosowane jako broń w postaci bioaerazolu i rozprzestrzeniać się drogą kropelkową gdyż dowiedziono, że istnieje możliwość transmisji zarazka z człowieka na człowieka. W przypadku użycia formy aerazolowej (dawka zakażająca wynosi 100 do 900 bakterii w aerazolu) po 1–6 dniach rozwiną się objawy ciężkiej infekcji układu oddechowego, a w pełnym obrazie klinicznym nieleczeni pacjenci umierają [9]. Powyższe fakty pozwalają stwierdzić iż pałeczki *Y. pestis* są obok węglik drugim wyjątkowo groźnym patogenem, który może być potencjalnie stosowany jako broń biologiczna.

Francisella tularensis również może być wykorzystana jako „klasyczny” arsenał broni biologicznej. Świadczą o tym takie cechy patogenu jak m.in.: duża szybkość rozprzestrzeniania się, wysoka zakaźność i wnikanie do organizmu ludzkiego wieloma drogami (np. skóra, błony śluzowe, układ pokarmowy, droga inhalacyjna) oraz wysoki współczynnik śmiertelności. Najgroźniejszą drogą zakażenia mogącą mieć skutki masowego rażenia jest droga inhalacyjna [59, 67]. Prace nad wykorzystaniem pałeczek *F. tularensis* jako broni biologicznej były prowadzone w USA, ZSRR i Japonii już przed II wojną światową. Istnieją dane, że bakterie te mogły być wykorzystane przez Rosjan w latach 1942–1943 podczas walk o Stalingrad. U żołnierzy walczących po obydwu stronach frontu w ówczesnym czasie notowano znaczną liczbę zachorowań na ciężkie zapalenie płuc [59]. Pałeczki tularemii testowane były także przez Japonię w Mandżurii w latach 1932–1945. Po II wojnie światowej w USA i ZSRR trwały jeszcze prace badawcze nad wykorzystaniem tych patogenów jako broni biologicznej. W Stanach Zjednoczonych zaprzestano badań i zniszczono wszystkie zapasy *F. tularensis* w 1973 r. W przypadku ZSRR badania trwały do roku 1990. Uzyskano wtedy warianty bakterii opornych na antybiotyki [59].

W przypadku wirusa gorączki krwotocznej (EVD – Ebola Virus Disease) brak jest danych literaturowych o wykorzystaniu tego patogenu jako broni biologicznej. Jednak cechy wirusa takie jak: wysoka patogenność i zakaźność, zdolność transmisji wśród ludzi, możliwość zakażenia wieloma drogami [42], niska dawka zakaźna (1–400 cząsteczek wirusa) oraz szybkość rozprzestrzeniania się [21] świadczą, o tym, że mikroorganizmy te mogą stanowić poważne zagrożenie dla zdrowia ludności w przypadku użycia ich jako broni masowego rażenia. Ostatnio (2013 r.) notowanymi ogniskami gorączki krwotocznej były kraje Afryki Zachodniej (w Gwinei, Sierra Leone i Liberii), następnie w 2014 r. także w Senegalu i Nigerii. W tym samym czasie (23.10.2014 r.) zano-

towano pierwszy przypadek choroby wywołanej przez wirus Ebola w Mali. Zachorowania zarejestrowano też w Europie i w USA. Jednocześnie w Demokratycznej Republice Konga miała miejsce kolejna, odrębna epidemia. Wydaje się, że głównym czynnikiem odpowiedzialnym za szerzenie zakażeń jest aktywność człowieka, a szczególnie jego migracja oraz coraz intensywniejsza ingerencja w dziką przyrodę [72].

Perspektywy użycia broni biologicznej w dzisiejszych czasach lub w przyszłości są bardzo niepokojące. Broń biologiczna charakteryzuje się stosunkowo niewielkimi kosztami produkcji (stąd bywa nazywana bronią masowego rażenia ubogich), dużą skutecznością, słabą wykrywalnością w początkowym etapie ataku oraz możliwością preparowania w szczególny sposób (np. przez modyfikacje genetyczne), aby zwiększyć śmiertelność lub zdolność do przetrwania w środowisku [13]. Biorąc pod uwagę aktualne problemy polityczne, społeczne, kulturowe i militarne na świecie możliwość użycia broni masowego rażenia w postaci ataku bioterrorystycznego wydaje się być bardzo realna i prawdopodobna.

Celem opracowania jest charakterystyka najbardziej niebezpiecznych mikroorganizmów, które stanowią potencjalne zagrożenie dla ludzi jako broń biologiczna.

2. Wąglik (*Bacillus anthracis*)

Pałeczka (d. laseczka) wąglika (*Bacillus anthracis*) została odkryta w pierwszej połowie XIX wieku. Forma wegetatywna to Gram-dodatnia, przetrwalnikująca bakteria [68]. *B. anthracis* wywołuje chorobę zakaźną o szczególnie ostrym przebiegu. Pałeczka ta stanowi źródło zakażenia dla zwierząt roślinożernych, a pośrednio dla mięsożernych i ludzi [18]. Dane epidemiologiczne wskazują, że w pierwszej połowie XX wieku wągliki stanowiły duże zagrożenie w Polsce. W latach 1923–1927 chorobę tą stwierdzono u 19 tys. zwierząt w 4,5 tys. gospodarstwach w Polsce, a u ludzi notowano w tym czasie około 60 zakażeń rocznie [55]. Najliczniejsze epidemie wąglika notowano w Polsce w latach 1950–1960. Szczególnie narażeni na tą chorobę byli ludzie, którzy zajmowali się obróbką towarów pochodzenia zwierzęcego lub pozostający w ich bezpośrednim kontakcie [55]. Na początku stulecia wągliki były poważnym problemem w Rosji. Zachorowania zwierząt wiązały się bezpośrednio z chorobą ludzi. Obserwowano tam 40–60 tys. przypadków rocznie wśród zwierząt i około 10–20 tys. zachorowań wśród ludzi ze śmiertelnością 25% [7]. W Europie wśród zwierząt naturalne epidemie wąglika występują obecnie we Włoszech [23]. Choroba ta występuje także endemicznie w Turcji [40], Indiach i Pakistanie [60], niektórych stanach USA i Chinach [64]. Obecnie wągliki występują bardzo rzadko i jest

traktowany jako odzwierzęca choroba ludzi. Według ekspertów, od momentu wybuchu w 2001 roku w USA epidemii tej choroby u ludzi, wągliki stały się bakterią niosącą masowe zagrożenie dla ludzkości [35].

2.1. Patogenność *Bacillus anthracis*

Optymalnym środowiskiem bytowania *B. anthracis* jest gleba. Z uwagi na zdolność wytwarzania przetrwalników (spor) wągliki mogą w niej pozostawać nawet kilkadziesiąt lat i charakteryzuje się dużą odpornością na niesprzyjające warunki środowiska [18]. Przetrwalniki, w przypadku opadów deszczu, mogą być wraz z wodą transportowane do zagłębień terenu i osadzać się na roślinach [18]. Zanieczyszczone rośliny stają się pożywieniem dla zwierząt roślinożernych, u których po pewnym czasie rozwijają się formy wegetatywne wąglika [68]. Formy wegetatywne *B. anthracis* bardzo szybko namnażają się w organizmie, przechodzą do krwi i płynów ustrojowych i w ciągu 2–4 dni powodują śmierć zwierzęcia. Następnie wraz z płynami ustrojowymi i krwią wypływają z padłych zwierząt do gleby i stają się źródłem kolejnych zakażeń zwierząt mięsożernych i ludzi [68]. Zjadliwość pałeczki jest związana z otoczką i zdolnością wytwarzania toksyny. Otoczką jest zbudowana z polimeru kwasu D-glutaminowego [51]. Natomiast toksyna *B. anthracis* składa się z trzech czynników: czynnika obrzęku (Edema factor) czynnika letalnego (Lethal factor) oraz antygenu ochronnego (Protective antigen) [47]. To właśnie toksyna wąglikowa powoduje pojawienie się objawów chorobowych i śmierć. Badania u naczelnych dowodzą, że toksyna wąglikowa obniża aktywność elektryczną kory mózgowej, co zaburza funkcjonowanie ośrodkowego i może prowadzić do niedotlenienia, zapaści, wstrząsu i nagłej śmierci [1].

U ludzi, w zależności od drogi zakażenia, rozróżnia się trzy postacie wąglika: skórną, płucną i żołądkowo-jelitową [38].

Najczęściej spotykaną postacią kliniczną jest postać skórna. Do zakażenia przetrwalnikami dochodzi przez skórę w zranionych miejscach. Wysokie zagrożenie chorobotwórcze tą postacią występuje u ludzi mających kontakt z chorymi lub padłymi zwierzętami oraz zajmujących się uprawą roli na terenach skażonych. W zranionym miejscu na skórze, po wnikięciu przetrwalników, pojawia się czarna plama ze strupem otoczona pęcherzami [38]. Rokowania co do wyleczenia postaci skórnej wąglika zależą od umiejscowienia zmian. W przypadku kończyn często obserwuje się ustąpienie choroby po kilku tygodniach. Gdy zmiany występują w pobliżu głowy dochodzi do zakażenia krwi, posocznicy i najczęściej śmierci w ciągu kilku dni [68].

Na postać płucną wąglika najczęściej narażeni są ludzie bezpośrednio wdychający przetrwalniki wraz

z powietrzem oraz trudniący się obróbką surowców zwierzęcych (skóry, sierść, wełna) [38]. Objawy w postaci płucnej początkowo przypominają grypę lecz bardzo szybko pojawia się ostre zapalenie dróg oddechowych, które po kilku dniach przechodzi w ciężką niewydolność oddechową z towarzyszącą posocznicą. Nawet przy podawaniu antybiotyków śmierć następuje w ciągu kolejnych dwóch dni [38].

Do zachorowania na postać żołądkowo-jelitową u ludzi dochodzi najczęściej po spożyciu zakażonego mięsa. Objawami choroby są: bóle brzucha, gorączka, nudności, wymioty, krwawa biegunka. Ponad połowa chorujących osób (nawet 60%) na skutek toksemii umiera w ciągu 2–5 dni od momentu wystąpienia objawów [38].

Z uwagi na wysoką śmiertelność jaką niesie ze sobą *B. anthracis* ważne jest zapobieganie szerzeniu się choroby wśród zwierząt i ludzi. W przypadku zwierząt hodowlanych stosuje się izolację zakażonych sztuk, ubój sanitarny i utylizację (spalenie lub zakopanie) [38]. W poprzednich latach w celu zapobiegania szerzenia się *B. anthracis* stosowane było posypywanie zwłok wapnem chlorowanym, ale obecnie nie jest to zalecane [31].

Pomimo, że obecnie wąglik w Europie i Polsce nie występuje, to ze względu na ogromną zjadliwość i możliwość wykorzystania jako broń biologiczna, powinien pozostawać pod szczególną uwagą służb epidemiologicznych. Trzeba pamiętać, że przetrwalniki tej bakterii mogą przetrwać w glebie wiele lat i przez dziesięciolecia są zdolne do zakażenia zwierząt i ludzi.

2.2. Diagnostyka i leczenie wąglika

Rozpoznanie pojedynczego przypadku wąglika jest trudne. Na etiologię *B. anthracis* może wskazywać nagłe pojawienie się wielu zachorowań na ciężką, grypopodobną chorobę o piorunującym przebiegu i dużej śmiertelności. Zalecane w takim wypadku jest wykonanie radiogramu klatki piersiowej z poszerzeniem cienia śródpiersia [13]. Diagnostyka polega na pobraniu krwi (lub innych tkanek) i identyfikacji bakterii widocznych pod mikroskopem. Rozpoznanie zakażenia wąglikiem sugeruje obecność Gram-dodatnich pałeczek w rozmazie krwi barwionej metodą Grama oraz badanie anatomopatologiczne, wykazujące krwotoczne zapalenie śródpiersia, krwotoczne zapalenie węzłów chłonnych klatki piersiowej i krwotoczne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych. Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych jest bardzo rzadkim powikłaniem pierwotnej infekcji, może jednak towarzyszyć nawet 50% postaci płucnej [13, 73]. W diagnostyce wąglika oraz innych chorób zakaźnych powszechnie stosowane są również techniki molekularne (np. amplifikacja DNA w łańcuchowej reakcji polimerazy PCR) [3].

W przypadku stwierdzenia zakażenia wąglikiem należy przeprowadzić badania nad lekoopornością gdyż istnieją szczepy *B. anthracis* odporne na wybrane antybiotyki. Do chwili przeprowadzenia badań nad lekoopornością należy zakładać, że użyty szczep jest odporny na penicyliny i tetracykliny. Po ustaleniu lekooporności należy podać najłatwiej dostępny i najmniej toksyczny antybiotyk, na który bakteria jest wrażliwa [73].

W leczeniu, w przypadku małej ilości zachorowań, wskazane jest podawanie antybiotyku w postaci doustnej: cyprofloksacyna – 400 mg *i.v.* co 12 godzin, do chwili ustalenia oporności, z ewentualną zmianą na antybiotyk o mniejszej toksyczności, czas leczenia – 60 dni. W przypadku masowych zachorowań (np. atak biologiczny) zaleca się leczenie doustne [73]. W leczeniu można rozważać zastosowanie antybiotyków, na które *B. anthracis* mogą być wrażliwe. Są to: chloramfenikol, erytromycyna, klindamycyna, penicyliny, makrolidy, chlorowoderek wankomycyny, cefalosporyny I generacji [34]. Dostępna jest także bezkomórkowa, inaktywowana szczepionka przeciwko *B. anthracis*, która jest zarejestrowana od 1970 r. w USA (Bioport Corp. Michigan, USA) i jest stosowana jedynie w przypadku grup zawodowych szczególnie narażonych [73].

3. Dżuma (*Yersinia pestis*)

Rodzaj *Yersinia* należy do Gram-ujemnych pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* i obejmuje obecnie 15 gatunków, w tym trzy patogenne dla ssaków i człowieka: *Yersinia pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* oraz *Y. pestis*. Pałeczka dżumy, *Y. pestis* jest tlenową pałeczką mającą zdolność do namnażania się wewnątrz komórek gospodarza [11, 52]. Powoduje zakaźną, ogólnoustrojową chorobę o bardzo ciężkim przebiegu [11, 12]. Dżuma była notowana już w starożytności. Ostatnia pandemia tej choroby, która objęła swym zasięgiem na początku XX wieku prawie cały świat, rozpoczęła się w Chinach w 1860 roku [39]. Aktualnie, w postaci rezerwuaru wśród zwierząt, dżuma zachowała swe ogniska w: Wietnamie, Chinach, Indiach, Ameryce Północnej i Południowej, Afryce, na Madagaskarze i na terenach Stanów Zjednoczonych, gdzie obserwowano niewielkie epidemie tej choroby wśród ludzi [6, 39, 46, 62]. W Polsce zachorowań na dżumę nie notowano od ponad 250 lat, nie można jednak wykluczyć zawleczenia zakażenia przez osobę podróżującą na tereny, gdzie choroba ta występuje endemicznie [39].

3.1. Patogenność *Yersinia pestis*

Naturalnym rezerwuarem *Y. pestis* są głównie gryzonie (szczury, myszy, morniki), a także dziko żyjące zwierzęta, takie jak pieski preriowe czy wiewiórki [6, 66].

Istnieje możliwość przeniesienia drobnoustrojów za pośrednictwem pcheł szkurzych na ludzi i zwierzęta domowe (koty, psy). Wśród zwierząt domowych choroba może szerzyć się drogą kropelkową [6, 66]. Człowiek od zwierząt domowych może się zakażać poprzez pokąsanie, zadrapanie, bezpośredni kontakt [22]. Możliwą drogą zakażenia ludzi jest również kontakt z tkankami i płynami ustrojowymi padłych zwierząt, gdyż *Y. pestis* może w nich przeżyć nawet pół roku [52]. *Y. pestis* ma zdolność syntezy endotoksyny (lipopolisacharyd – LPS) oraz innych antygenów umożliwiających unikanie przez nią fagocytozy i warunkujących jej zjadliwość [20, 52, 58]. Wirulencję pałeczki warunkuje obecność trzech plazmidów charakterystycznych dla tego gatunku. Antygen otoczkowy (F1) pałeczki dżumy, kodowany przez plazmid pMT1 ma zdolność hamowania fagocytozy, natomiast plazmid pPCP1 syntetyzuje proteazę serynową, odpowiedzialną za wnikanie do komórek nabłonkowych żywiciela i możliwość zakażenia drogą inhalacyjną [11].

W przypadku pogryzienia człowieka przez chore zwierzę lub pchłę, pałeczki *Y. pestis* przez naczynia limfatyczne trafiają do pobliskich węzłów chłonnych, gdzie ulegają fagocytozie [52]. Następnie zarazki namnażają się w fagocytach, a po ich rozpadzie nabywają oporność na fagocytozę i mnożą się w tkankach gospodarza [12, 52]. W zajętych węzłach chłonnych obserwuje się rozpad struktur tkankowych, obfite nacieki obojętnochłonne, zmiany krwotoczne i martwicze oraz obecność licznych pałeczek dżumy [52]. Postępująca choroba obejmuje zmianami kolejne narządy, pojawia się endotoksemia prowadząca do wstrząsu. W części przypadków obserwowane jest zakażenie ogólnoustrojowe organizmu (posocznica) [52].

W zależności od drogi zakażenia rozróżnia się postaci pierwotne i wtórne dżumy. Do postaci pierwotnych należą: przy zakażeniu drogą śródskórną – postać dymienicza oraz posocznicowa, przy zakażeniu drogą kropelkową – postać płucna [39]. Natomiast do postaci wtórnych należą: posocznicowa, płucna oraz zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, rozwijające się jako powikłanie dżumy dymienicznej [39].

Postać dymienicza dżumy jest stosunkowo łagodną i najczęściej występującą formą tej choroby. W postaci tej zarazki wnikają drogą śródskórną i umiejscawiają się w węzłach chłonnych pachwinowych, pachowych lub w okolicy szyi [6]. W ciągu kilku godzin zajęte węzły chłonne ulegają powiększeniu i powstają obrzęki. Porażone węzły chłonne wraz z obrzękami tworzą bolesne, owalne zmiany skórne nawet do 10 cm średnicy [12, 33, 52]. W miejscu wniknięcia zarazków pojawia się ropna krosta lub owrzodzenie, natomiast rzadko widoczne są objawy zapalenia naczyń limfatycznych [33, 52]. Czas wylegania choroby trwa od 2 do 8 dni i charakteryzuje się nagłym przebiegiem. Towarzyszyć temu mogą

osłabienie, dreszcze oraz bóle głowy [12, 33] a także: wysoka gorączka (38,5–40°C), zaburzenia świadomości (senność, pobudzenie), podwyższone tętno, powiększenie śledziony i wątroby oraz hipotensja [22, 52]. W przypadku zajęcia przez chorobę większych partii węzłów chłonnych następuje rozwój wtórnej posocznicy i śmierć w ciągu 2–4 dni [33]. W korzystnym przebiegu choroby stan chorego poprawia się po kilku dniach a zmiany skórne ulegają samowyleczeniu [22].

Postać posocznicowa charakteryzuje się bardzo gwałtownym przebiegiem. Nie obserwuje się zmian w węzłach chłonnych, natomiast szybko rozwija się niewydolność krążenia [52] oraz dolegliwości związane z układem pokarmowym (bóle brzucha, nudności, wymioty, biegunka) [66].

Postać płucna dżumy przebiega w formie pierwotnego lub wtórnego zapalenia płuc. Pierwotna postać dżumy płucnej rozwija się po wniknięciu do organizmu zarazków przenoszonych przez chore zwierzęta lub ludzi drogą kropelkową. Okres wylegania tej postaci trwa 1–6 dni [52]. Choroba rozpoczyna się nagłą gorączką i kaszlem, następnie obserwuje się ciężkie zapalenie płuc z ostrą niewydolnością oddechową i krążeniową [33]. Objawom niewydolności oddechowej towarzyszą bóle brzucha, nudności i wymioty [33]. Postać pierwotna dżumy od postaci wtórnej różni się brakiem występowania dymienic (obrzęki zapalne węzłów chłonnych) [52, 66].

Wtórna postać dżumy płucnej występuje stosunkowo rzadko i rozwija się wskutek zakażenia płuc drogą rozsiewu hematogennego (przez naczynia krwionośne) [52]. O rozwoju tej formy choroby świadczą: pojawienie się osłabienia, bólu w klatce piersiowej, kaszlu oraz odkrztuszanie krwistej lub wodnistej płwociny [66].

Z uwagi na dużą liczebność pałeczek *Y. pestis* w płwocinie w przebiegu postaci płucnej (pierwotnej i wtórnej) chory stanowi dużo większe zagrożenie zakaźne dla otoczenia niż w przypadku postaci dymienicznej i posocznicowej [52].

Śmiertelność na dżumę płucną przy braku antybiotykoterapii sięgała nawet 100% (Los Angeles w 1924 r.) [69]. W obecnych czasach śmiertelność zmniejszyła się o połowę a wyleczenie uwarunkowane jest podaniem odpowiedniego antybiotyku w pierwszym dniu choroby [33, 66]. Do bardzo rzadkich postaci dżumy należy zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych (wtórne w postaci dymienicznej) oraz zapalenie migdałów i gardła w formie ostrej anginy z dużym stanem zapalnym szyjnych węzłów chłonnych [52].

3.2. Diagnostyka i leczenie dżumy

Pałeczka dżumy jest niebezpiecznym patogenem, który był przyczyną wielu ofiar w ludziach i nadal stanowi potencjalne duże zagrożenie dla społeczeństwa.

Terminowe, szybkie i niezawodne wykrywanie zarazka *Y. pestis* jest zatem sprawą kluczową. W obrazie klinicznym rozpoznanie dżumy obejmuje wydzielenie czystej kultury *Y. pestis* i określenie liczebności komórek bakteryjnych. Swoista diagnostyka bakteriologiczna obejmuje badanie kału, płynu otrzewnowego, materiału z ropni, aspiratów z dymienic, krwi obwodowej, płwociny lub płynu mózgowo rdzeniowego, zależnie od postaci klinicznej [27, 33]. Metody badania materiału mikrobiologicznego na obecność pałeczek dżumy nie odbiegają od standardowych metod badania pałeczek jelitowych. Posiewy wykonywane w warunkach tlenowych na standardowe podłoża mikrobiologiczne np. na podłoże Mac Konkeya powszechnie używane w posiewach pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* (wzrost po 24–48 godzinach) [53]. Dobrym rozwiązaniem jest zastosowanie wysoce wybiórczego podłoża CIN (zawierającego cefsulodynę, irgasan i nowobiocynę), które hamuje wzrost innych bakterii [53] oraz wykorzystanie lizy komórek przez bakteriofagi [62]. Szybka i czuła metodą wykrywania komórek *Y. pestis* jest również zastosowanie różnych wariantów metod genetycznych. Jedną z nich jest łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym qPCR (Real-time PCR) [62].

W leczeniu dżumy ważna jest antybiotykoterapia oraz szybkie zwalczanie pojawiających się dysfunkcji ogólnoustrojowych. *Y. pestis* jest wrażliwa na streptomycynę i gentamycynę, którą podaje się z wyboru kobietom w ciąży. Antybiotykami stosowanymi w leczeniu są także ciprofloksacyna, doksycyklina oraz chloramfenikol [27]. Antybiotyk należy podać jak najszybciej. W obecnych zaleceniach jest to gentamycyna podawana domięśniowo przez 10 dni [12, 27, 33, 52]. Jednocześnie powinno się kontrolować szybko rozwijające się zakażenie ogólnoustrojowe organizmu (posocznica) [52]. W niektórych przypadkach konieczne jest wspomaganie oddechu i podanie leków presyjnych [22, 33]. W przypadku zachorowań na dużą skalę (atak biologiczny) stosuje się alternatywne schematy leczenia, obejmujące leki stosowane doustnie: doksycylinę (2×100 mg), ciprofloksacynę (2×500 mg) lub chloramfenikol [33].

4. Tularemia (*Francisella tularensis*)

Po raz pierwszy tularemia została opisana w Japonii w 1837 roku. Bakterie początkowo były zaliczane do rodzaju *Brucella*, następnie *Pasteurella* a od 1947 roku zaliczono je do nowo utworzonego rodzaju – *Francisella*. Nazwa patogenu pochodzi od nazwiska Edwarta Francisa, który zajmował się tularemią [28].

Tularemia (dżuma gryzoni) to odzwierzęca choroba zakaźna o ostrym przebiegu. Czynnikiem etiologicznym choroby jest Gram-ujemna, względnie tlenowa pałeczka

Francisella tularensis, należąca do rodziny *Francisellaceae* [56, 67]. Jak podaje Steiner i wsp. [65] ma ona zdolność namnażania się wewnątrz komórek gospodarza i może być obecna w cytoplazmie komórkowej.

Obecnie *F. tularensis* występuje jedynie na terenach wiejskich w Ameryce Północnej, Europie i Azji. W Polsce, w 1996 roku, u 0,13% pracowników służby leśnej w Białowieskim Parku Narodowym odnotowano obecność swoistych przeciwciał, natomiast w 2000 roku przeciwciał przeciwko *F. tularensis* już nie stwierdzono [50].

Optymalną temperaturą wzrostu *F. tularensis* jest 30–35°C. Pałeczki są wrażliwe na wysoką temperaturę i ogrzewanie (giną w ciągu 10 min. w 58°C) oraz środki dezynfekcyjne [9, 59]. Mogą przeżywać w zbiornikach wodnych i glebie nawet do 3 miesięcy, a w wybranych produktach spożywczych od 14 do 133 dni [9].

4.1. Patogenność *Francisella tularensis*

Rezerwuarem *F. tularensis* są głównie gryzonie (myszy, wiewiórki, zające, króliki) [59], które mogą się zakażać poprzez ukąszenia komarów, much lub kleszczy, a także kontakt ze skażonym środowiskiem [17, 67]. Ponadto infekcji mogą ulegać m.in. ryby, łasice, lisy, norki, owce, koty, psy, konie, świnie oraz ponad 25 gatunków ptactwa [28]. Wśród ludzi szczególnie narażeni na zakażenie są myśliwi, rolnicy, leśnicy, pracownicy zakładów futrzarskich, garbarze, rzeźnicy, służba weterynaryjna oraz pracownicy laboratoriów [24, 57]. Pałeczka tularemii posiada ogromne możliwości zakażenia organizmu różnymi drogami. Człowiek zakaża się poprzez bezpośredni kontakt z chorym zwierzęciem lub jego tkankami. Zarazki dostają się do organizmu przez skórę lub błony śluzowe. Zakażenie może nastąpić również drogą inhalacyjną (skażony pył roślinny i zwierzęcy), pokarmową (spożycie zakażonej żywności, wody) oraz przez spojówki [17, 67]. Źródłem i rezerwuarem *F. tularensis* są także kleszcze. Zagrożeniem nie jest ukąszenie tych owadów lecz wcieranie w skórę ich odchodów [10].

U ludzi objawy kliniczne tularemii mogą się różnić w zależności od liczebności bakterii i stopnia ich wirulencji oraz drogi dostania się do organizmu i odporności człowieka [28]. Do zakażenia może dochodzić wieloma drogami. Jedną z najbardziej niebezpiecznych, z powodu łatwości rozprzestrzeniania się, jest inhalacja aerozolu [65]. Rozpoznanych jest 6 postaci klinicznych tularemii [59].

Postać wrzodząco-węzłowa stanowi 45–85% wszystkich przypadków tej choroby. Zakażenie następuje przez kontakt z chorymi zwierzętami. W miejscu wniknięcia zarazków powstają początkowo małe zaczerwienione grudki, które po ok. 2 dniach przekształcają się we wrzody [59]. Po okresie inkubacji (5–6 dni) obserwuje się bóle mięśni i głowy, dreszcze

oraz gorączkę. Pałeczki przedostają się następnie do węzłów chłonnych i za pośrednictwem układu chłonnego do płuc, wątroby, śledziony, nerek, czasami również mózgu [59].

Postać durowa tularemii występuje w mniej niż 5% przypadków [59]. Zakażenie następuje drogą pokarmową poprzez spożycie skażonej żywności. Chory odczuwa osłabienie i objawy ze strony układu pokarmowego (nudności, biegunka). Często występują bóle mięśni i głowy, kaszel i gorączka do 40°C. U większości pacjentów (50–80%) stwierdza się zapalenie płuc i duszności. Śmiertelność tej postaci choroby sięga 50% [59].

Postać płucna podobnie jak durowa występuje rzadko (mniej niż 5% przypadków) lecz jest najostrejszą formą tularemii. Do zakażenia dochodzi drogą inhalacyjną lub w wyniku powikłań innych postaci tej choroby [59]. Choroba ma zazwyczaj przebieg ostry lub przewlekły a jej objawy są następujące: wysoka gorączka, bóle mięśni i głowy, dreszcze, suchy kaszel, zapalenie gardła, ból w klatce piersiowej oraz ostre zapalenie płuc z wysiękami w jamie opłucnej [59, 14].

W postaci żołądkowo-jelitowej zakażenie następuje poprzez spożycie skażonej żywności i wody. Powstaje zapalenie jelit i miejscowe owrzodzenia o intensywności zależnej od stopnia inwazji zarazków [59, 67].

Postać oczno-węzłowa występuje stosunkowo rzadko a droga zakażenia prowadzi przez spojówki oczu, które ulegają owrzodzeniu. Drobnoustroje przedostają się do okolicznych węzłów chłonnych i powodują ich zapalenie [59].

Postać anginowa stanowi mniej niż 5% wszystkich przypadków tularemii. Zakażenie następuje poprzez spożycie skażonej wody lub jedzenia. Objawami tej formy choroby są: silne zapalenie błony śluzowej jamy ustnej i gardła oraz powstawanie miejscowych owrzodzeń [59, 67]. Towarzyszy temu powiększenie szyjnych węzłów chłonnych, gorączka, bóle mięśni i dreszcze.

4.2. Diagnostyka i leczenie *Francisella tularensis*

Działania profilaktyczne w przypadku tularemii sprowadzają się do ograniczania źródeł zakażenia (unieszkodliwianie gryzoni i kleszczy) oraz przestrzegania zasad BHP w grupie zawodów szczególnie narażonych (np. rolnik, leśnik) [56]. We właściwej profilaktyce wszystkich chorób odzwierzęcych, w tym tularemii, ważne jest współdziałanie służby zdrowia i pracowników weterynaryjnych. Umożliwia to skuteczną walkę z chorobą [43].

Diagnoza kliniczna tularemii może być problematyczna lub bardzo utrudniona, ponieważ jest to stosunkowo rzadkie zakażenie z niespecyficznymi objawami. Często lekarze pracujący na terenach nieendemicznych mają duże trudności w rozpoznaniu choroby. Do badań laboratoryjnych często pobiera się materiał z biopsji

węzłów chłonnych, krew, mocz, wymazy z gardła i ran, płyn opłucnowy itp. [43].

Mimo że *F. tularensis* mogą być hodowane w warunkach laboratoryjnych, istnieją duże trudności w izolacji czystych kultur tych bakterii [36]. Laboratoria muszą spełniać wymogi 2 klasy bezpieczeństwa biologicznego (BSL-2). Ze względu na te wymagania tylko kilkanaście laboratoriów klinicznych na świecie może rutynowo wykonywać izolację *F. tularensis* [43].

Jedną ze skutecznych metod laboratoryjnych stosowanych w diagnostyce tularemii jest wykrywanie swoistych przeciwciał IgG i IgM, np. testem immunoenzymatycznym ELISA. Testy ELISA mogą być także wykorzystywane do wykrywania tych bakterii w tkankach zwierząt i próbkach środowiskowych. Są to metody bardzo wiarygodne ponieważ wzrost miana IgG świadczy o zakażeniu, natomiast obecność IgM informuje o aktualnej, nieodległej w czasie infekcji [36, 65].

Bakterie *F. tularensis* mają zdolność produkcji beta-laktamaz rozkładających antybiotyki beta-laktamowe (penicyliny, cefalosporyny, karbapenemy). Są one również odporne na klindamycynę i makrolidy. Zarazek wykazuje wrażliwość na teracykliny, fluorochinolony, chloramfenikol i aminoglikozydy [15, 44, 45]. Przy bezpośrednim kontakcie z osobą chorą nie jest konieczne podawanie antybiotyku, ponieważ tularemia nie przenosi się z człowieka na człowieka [43]. Jednak przy kontakcie z zakażonym materiałem oraz w przypadku wystąpieniu objawów grypopodobnych chorzy poddawani są antybiotykoterapii. Profilaktyczne podawanie antybiotyków jest efektywne jedynie wtedy, gdy rozpocznie się w ciągu 24 godzin po ekspozycji [15, 41].

W przypadku osób narażonych na zakażenie istnieje możliwość zastosowania szczepionki przeciwko *F. tularensis*. Szczepionka LVS (Live Vaccine Strain) zawierająca żywy szczep *F. tularensis* jest jedyną szczepionką zapobiegającą tularemii. Jednak z powodu prac trwających nad wprowadzeniem jej do obrotu nie jest jeszcze w pełni dostępna [44].

5. Wirus Ebola

Wirus Ebola należy do rodziny *Filoviridae* (łac. *Filus*: nić). Wirusy te mają wydłużony kształt o wymiarach ok. 80 × 800–1400 nm. Zbudowane są z pojedynczej nici RNA a wykształcony nukleokapsyd posiada osłonkę [72]. Wirus Ebola został po raz pierwszy wyizolowany w 1976 roku w Zairze (obecnie Demokratyczna Republika Konga), w pobliżu rzeki o tej samej nazwie. W tym samym czasie pierwsze przypadki zachorowań wystąpiły w Sudanie [25].

W skład rodziny *Filoviridae* wchodzi 5 gatunków wirusów: wirus Bundibugyo (BDBV), wirus Sudan (SUDV), wirus Tai Forest (TAFV), wirus Ebola (EBOV,

dawniej Zair), wirus Reston (REBOV). Wszystkie gatunki (oprócz wirusa Reston), występują w Afryce i wywołują choroby u ludzi [48]. Możliwość zachorowania na gorączkę krwotoczną EVD na terytorium Polski jest niewielka lecz istnieje możliwość zawleczenia choroby z krajów afrykańskich [72]. Rozwój epidemii wirusa Ebola obserwowany jest głównie w krajach afrykańskich takich jak: Nigeria, Sierra Leone i Liberia (odnotowano tam 22 tys. przypadków EVD, w tym 9 tys. zgonów) oraz Gwinea (49 przypadków) [63]. Notowano także pojedyncze przypadki w Wielkiej Brytanii i Stanach Zjednoczonych [71].

5.1. Patogenność wirusa Ebola

Naturalnym rezerwuarem wirusa EVD są nietoperze owocożerne, u których nie stwierdza się objawów chorobowych a także gryzonie i małpy (szympansy, goryle) [49]. Wirusem można zarazić się przez kontakt z krwią, płynami ustrojowymi, wydalaminami osób już wcześniej zakażonych. Do zakażenia może także dojść drogą pokarmową, przez uszkodzoną skórę i nienaruszone błony śluzowe [42, 71]. Chore lub padłe zwierzęta mogą również być przyczyną infekcji wśród ludzi. W przypadku epidemii choroba przenosi się z człowieka na człowieka [4].

Dawka zakaźna dla człowieka jest stosunkowo niska lecz nie została jeszcze dokładnie ustalona. Przypuszcza się, że może to być od 1 do 10 cząsteczek wirusa [21] lub nawet 400 cząsteczek [37]. Ebola jest wirusem wywołującym gorączkę krwotoczną (Viral Haemorrhagic Fever – VHF) o ostrym przebiegu. Choroba ta jest uważana za wysoce zakaźną [42]. Gorączka krwotoczna jest ostro przebiegającą chorobą ogólnoustrojową. Inkubacja choroby trwa 2–21 dni a w niektórych przypadkach nawet 25 dni [70].

Objawy EVD obserwuje się zwykle w 4–8 dniu od zakażenia [2]. Początek choroby ma charakter objawów grypopodobnych tj. bóle stawów i mięśni, dreszcze, gorączka, ucisk i ból w klatce piersiowej, brak łaknienia, nudności, wymioty i biegunka. U około połowy zainfekowanych osób wymioty i biegunki są krwiste co powoduje odwodnienie organizmu i znaczną utratę masy ciała [70].

Czasami obserwowana jest chwilowa poprawa stanu zdrowia lecz potem następuje niewydolność wielonarządowa oraz wstrząs, który może zakończyć się śmiercią [48]. Wzmoczona obecność wirusa Ebola w różnych tkankach i narządach jest wspomagana poprzez upośledzenie układu immunologicznego [32]. Jak podaje Dowell i wsp. [16] możliwość zakażenia rośnie wraz z przebiegiem choroby i jest najwyższa w jej końcowej fazie oraz po śmierci pacjenta. Śmierć następuje głównie z powodu dysfunkcji wielu narządów. Zazwyczaj dochodzi również do znacznego spadku ciśnienia tę-

niczego i martwicy ogniskowej komórek [26]. Blisko w 50% przypadków infekcji obserwowane są objawy krwotoczne a śmiertelność choroby wśród osób zakażonych wynosi zazwyczaj ponad 80%. Nawet w przypadku osób hospitalizowanych i leczonych prawie połowa chorych umiera [61].

5.2. Diagnostyka i leczenie gorączki krwotocznej EVD

Objawy gorączki krwotocznej w pierwszej fazie choroby są niespecyficzne (bóle głowy, mięśni i brzucha, gorączka, wymioty i biegunka) i podobne do symptomów duru brzuszego czy malarii [54]. Z powodu niespecyficznych objawów potwierdzenie, że chorobę wywołał wirus Ebola wymaga specjalnych badań. W tym celu stosuje się testy: do wykrywania antygeny, test immunosorpcyjny (ELISA) do wykrywania przeciwciał IgG, IgM, test odwrotnej transkryptazy reakcji łańcuchowej polimerazy (RT-PCR) oraz test neutralizacji surowicy. Stosuje się także hodowle komórkowe wirusa EVD [19].

Nie istnieje lek przeciwwirusowy, który mógłby być zastosowany w razie wystąpienia zakażenia wirusem Ebola. W razie wykrycia infekcji osoby chore powinny być niezwłocznie poddane izolacji i obserwacji a także ścisłej opiece lekarskiej. Należy zmniejszyć ryzyko zakażenia i rozprzestrzeniania się wirusa wśród ludzi [42].

Ze względu na brak możliwości stosowania specyficznych leków przeciw wirusowi Ebola leczenie polega na uzupełnianiu płynów ustrojowych aby nie dopuścić do odwodnienia organizmu. Podaje się antybiotyki, leki przeciwwrzędicze i przeciwzakrzepowe. Należy również zaznaczyć, że szczepionka przeciwko EVD jest jeszcze w fazie testów i nie ma potwierdzenia jej skuteczności [42].

6. Podsumowanie

Wśród licznych mikroorganizmów wymienianych jako czynniki broni biologicznej, stanowiących ogromne zagrożenie dla ludzi największy udział mają te, które wywołują choroby odzwierzęce (zoonozy). Do najczęściej wymienianych należą: *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*. Charakteryzują się one znaczną zakaźnością i powodują wysoką śmiertelność. Z uwagi na ogromne zagrożenie dla zdrowia publicznego, wymagają specjalnych działań profilaktycznych, diagnostycznych i szybkiego leczenia.

Mimo iż choroby te występują endemicznie to konieczny jest monitoring występowania ognisk tych chorób i trafna identyfikacja czynnika etiologicznego. Szczególną uwagę należy zwrócić na możliwość wykorzystania mikroorganizmów jako broni biologicznej ponieważ groźba ich użycia obecnie i w przyszłości

jest bardzo prawdopodobna. W związku z powyższym pożądaną jest utrzymywanie na jak najwyższym poziomie funkcjonowania wszelkich procedur związanych z ochroną ludności przed atakami bioterrorystycznymi.

Podziękowania

Opracowanie wykonano w ramach realizacji **zadanie 1.4. Ocena i kształtowanie bioróżnorodności środowiska glebowego oraz aktywności mikrobiologicznej gleb z uwzględnieniem różnych warunków siedliskowych i systemów gospodarowania**. Program Wieloletni IUNG-PIB na lata (2016–2020).

Piśmiennictwo

- Arciuch H.: Stale aktualne zagrożenie węglik. *Przegl. Epid.* **55**, 169–179 (2001)
- Bah E.I., Fowler R.A. i wsp.: Clinical presentation of patients with Ebola virus disease in Conakry, Guinea. *New Eng. J. Med.* **372**, 40–47 (2014)
- Bartkowiak J.: Badania molekularne w rozpoznawaniu i różnicowaniu chorób zakaźnych. *Przegl. Epid.* **57**, 381–389 (2003)
- Bausch D.G., Towner J.S., Dowell S.F. i wsp.: Assessment of the risk of Ebola virus transmission from bodily fluids and fomites. *J. Infect. Dis.* **196**, 142–147 (2007)
- Bente D., Gren J., Strong J.E., Feldmann H.: Disease modeling for Ebola and Marburg viruses. *Dis. Models Mech.* **2**, 12–17 (2009)
- Chantau S., Ratsifasoamanana L., Rosoamanana B., Rahalison L., Randrianbelosoa J., Roux J. i wsp.: Plague a reemerging disease in Madagascar. *Emerg. Infect. Dis.* **4**, 101–104 (1998)
- Cherkasskiy B.L.: A national register of historic and contemporary anthrax foci. *J. Appl. Microbiol.* **87**, 192–195 (1999)
- Chomiczewski K.: Zagrożenie bioterroryzmem. *Przegl. Epid.* **57**, 349–353 (2002)
- Chomiczewski K.: Patogeny zwierzęce jako broń biologiczna. *Przegl. Epid.* **57**, 355–361 (2003)
- Cisak E., Chmielewska-Badora J., Zwoliński J., Dutkiewicz J.: Choroby przenoszone przez kleszcze. *Med. Ogol.* **14**, 280–289 (2008)
- Cowan C., Jones H.A., Kaya Y.H., Perry R.D., Straley S.C.: Invasion of epithelial cells by *Yersinia pestis*: evidence for a *Y. pestis* – specific invasin. *Infect. Immun.* **68**, 4523–4530 (2000)
- Daniszewski P.: Dżuma (*Yersinia pestis*) – jako broń biologiczna. *Intern. Letter Soc. Human. Sciences*, **9**, 84–94 (2013)
- Daniszewski P.: Węgliki (*Bacillus anthracis*) – jako broń biologiczna. *Intern. Letter Soc. Human. Sciences*, **9**, 74–83 (2013)
- Dennis D.T.: Tularemia as a biological weapon. *JAMA*, **285**, 2763–2773 (2001)
- Dennis D.T., Toner K. i wsp.: Tularemia as a biological weapon – medical and public health management. *JAMA*, **285**, 2763–2773 (2001)
- Dowell S.F., Ksiazek T.G. i wsp.: Transmission of Ebola hemorrhagic fever: a study of risk factors in family members, Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. Commission de Lutte contre les Epidémies Kikwit. *J. Infect. Dis.* **179**, 87–91 (1999)
- Erricsson M.: Persistence of cell-mediated immunity and decline of humoral immunity to the intracellular bacterium *Francisella tularensis* 25 years after natural infection. *J. Infect. Dis.* **170**, 110–114 (1994)
- Fasanella A., Galante D., Garofolo G., Jones M.H.: Anthrax undervalued zoonosis. *Vet. Microbiol.* **140**, 318–331 (2010)
- Feldmann H., Geisbert T.W.: Ebola hemorrhagic fever. *Lancet*, **377**, 849–862 (2011)
- Fields K.A., Nilles M.L., Cowan C., Straley S.C.: Virulence role of V antigen of *Yersinia pestis* at the bacterial surface. *Infect. Immun.* **67**, 5395–5408 (1999)
- Franz D.R., McClain D.J. i wsp.: Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents. *Clin. Lab. Med.* **21**(3), 435–473 (2001)
- Gage K.L., Reynolds P.J. i wsp.: Cases of cat-associated human plague in the Western US, 1977–1998. *Clin. Infect. Dis.* **30**, 893–900 (2000)
- Garofolo G., Ciammaruconi A., Fasanella A., Scasciamacchia S., Adone R., Pittiglio V., Lista F.: SNR analysis: molecular investigation of an anthrax epidemic. *BMC Vet. Res.* **28**, 6–11 (2010)
- Geyik M.F., Akalin H.: Dünyada Tularemi (w) *Francisella tularensis* ve Tularemi, red. Ş. Gürcan, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2009, s. 99–106
- Giraldi G., Marsella L.T.: Ebola Virus Disease Outbreak: What's going on. *Ann Ig.* **27**, 82–86 (2015)
- Grolla A., Lucht A., Dick D., Strong J.E., Feldmann H.: Laboratory diagnosis of Ebola and Marburg hemorrhagic fever. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, **98**, 205–209 (2005)
- Grygorczuk S., Hermanowska-Szapkowicz T.: Pałeczka *Yersinia pestis* jako niebezpieczna broń biologiczna. *Med. Pr.* **53**, 343–348 (2002)
- Gürcan Ş.: Epidemiology of Tularemia. *Balkan Med. J.* **31**, 3–10 (2014)
- Haas C.N.: On the quarantine period of Ebola. *PLoS Curr. Out.* DOI:10.1371/currents.outbreaks.2ab4b76ba7263ff0f084766e43abbd89 (2014)
- Hermanowska-Szapkowicz T., Pancewicz S.: Obecność przeciwciał przeciwko *Francisella tularensis* u osób zamieszkujących północnowschodnią Polskę. *Przegl. Epid.* **50**, 55–59 (1996)
- Himsworth C.G.: The danger of lime use in agricultural anthrax disinfection procedures: the potential role of calcium in the preservation of anthrax spores. *Can. Vet. J.* **49**, 1208–1210 (2008)
- Hutchinson K.L., Rollin P.E.: Cytokine and chemokine expression in humans infected with Sudan Ebola virus. *J. Infect. Dis.* **196**, 357–363 (2007)
- Inglesby T.V., Eitzen E. i wsp.: Plague as a biological weapon. Medical and public health management. *JAMA*, **283**, 2281–2290 (2000)
- Inglesby T.V., Parker G. i wsp.: Anthrax as a biological weapon. Medical and public health management. *JAMA*, **281**, 1735–1737 (1999)
- Jernigan D.B., Raghunathan P.L. i wsp.: Investigation of bioterrorism-related anthrax, United States, 2001: epidemiologic findings. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 1019–1028 (2002)
- Johansson A., Forman M., Sjöstedt A.: The development of tools for diagnosis of tularemia and typing of *Francisella tularensis*. *Apmis*, **112**, 898–907 (2004)
- Johnson E., Jaax N., White J., Jahring P.: Lethal experimental infections of rhesus monkeys by aerosolised Ebola virus. *Int. J. Exp. Pathol.* **76**, 227–236 (1995)
- Kałużewski S.: Węgliki (w) Choroby zakaźne i pasożytnicze-epidemiologia i profilaktyka, red. Magdżik W., Naruszewicz-Lesiuk D., Zieliński A., Alfa-Medica Press, Bielsko-Biała, 2007, s. 317–322
- Kałużewski S.: Zagrożenia związane z zakażeniem pałeczkami z rodzaju *Yersinia*. Ogólnopolska Konferencja Naukowo-Szkoleniowa pt. „Biologiczne zagrożenia bezpieczeństwa kraju – ryzyko zagrożenia szczególnie niebezpiecznymi patogenami” 15–16 marca 2001, Warszawa [materiały konferencyjne] (2001)
- Karahocagil M.K., Akdeniz N., Akdeniz H., Calka O., Karsen H., Bilici A., Bilgili S.G., Evirgen O.: Cutaneous anthrax in Eastern

- Turkey: a review of 85 cases. *Clin. Exp. Dermatol.* **33**, 406–411 (2008)
41. Kilic S., Wagner D.M i wsp.: Water as Source of *Francisella tularensis* Infection in Humans, Turkey. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 2213–2216 (2015)
 42. Kiszmal E., Van Damme-Ostapowicz K.: Czy wirus Ebola jest nowym zagrożeniem epidemiologicznym świata? *Pol. Przegl. Nauk o Zdrowiu*, **1**, 88–91 (2016)
 43. Kłapeć T., Cholewa A.: Tularemia – wciąż groźna zoonoza, *Med. Ogólna i Nauki o Zdrowiu*, **17**, 155–160 (2011)
 44. Knap J.: Tularemia (w) Choroby zakaźne i pasożytnicze – epidemiologia i profilaktyka, red. Magdzik W., Naruszewicz-Lesiuk D., Zieliński A., Alfa-Medica Press, Bielsko-Biała, 2004, s. 288–293
 45. Knap J.: Tularemia. (w): Choroby zakaźne i pasożytnicze – epidemiologia i profilaktyka. red. Magdzik W., Naruszewicz-Lesiuk D., Zieliński A., Alfa-Medica Press, Bielsko-Biała, 2007, s. 312–317
 46. Kumar S.: Bubonic plague in Surat? *Lancet*, **345**, 663–738 (1995)
 47. Lacy D.B., Collier R.J.: Structure and function of anthrax toxin (w) Anthrax red. T.M. Koehler, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 2002, s. 61–85
 48. Leroy E.M., Gonzalez J.P., Baize S.: Ebola and Marburg haemorrhagic fever viruses: major scientific advances, but a relatively minor public health threat for Africa. *Clin. Microbiol Infect.* **17**, 964–976 (2011)
 49. Leroy E.M., Pourrut X., Kumulungui B., Pourrut X., Rouquet P., Hassanin A., Yaba P., Délicat A., Paweska J.T., Gonzalez J.P., Swanepoel R.: Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature*, **438**, 575–576 (2005)
 50. Łapiński T.W., Mięgoć H., Prokopowicz D., Kowalczyk-Kot A.: Zagrożenia toxokarozy i tularemią pracowników Białowieskiego Parku Narodowego. *Przegl. Epid.* **54**, 367–374 (2000)
 51. Makino S.I., Uchida I., Terakado N., Sasakawa C., Yoshikawa M.: Molecular characterization and protein analysis of the cap region, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* **171**, 722–730 (1989)
 52. Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R.: Principles and Practice of Infectious Diseases. *Church. Livingstone*, **1**, 1–41 (1995)
 53. Mielczarek P., Baślak M.: Jersinioza – rzadko rozpoznawana choroba układu pokarmowego. *Gastroenterologia Polska*, **11**, 69–74 (2004)
 54. Murray B.E., Duchin J.S., Neill M.A.: IDSA Ebola Summary – August Open Forum. *Infect. Dis.* **1** (2014)
 55. Naruszewicz-Lesiuk D.: Wąglik (w) Choroby zakaźne w Polsce i ich zwalczanie w latach 1919–1962, red. Kostrzewski J., PZWL, Warszawa, 1964, s. 140–147
 56. Osiak B., Bartoszcze M., Gawel J.: *Franciscella tularensis* – cechy zarazka, patogenez, diagnostyka. *Przegl. Epid.* **60**, 601–608 (2006)
 57. Pacewicz S., Zajkowska M., Świerzbńska R., Kondrusik M., Grygorczuk S.S., Hermanowska-Szpakowicz T.: Czy kleszcze są wektorami tularemii u mieszkańców Połnocno-Wschodniej Polski? *Med. Pr.* **55**, 189–192 (2004)
 58. Parkhill J., Barrell B.G.: Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature*, **413**, 523–526 (2001)
 59. Rastawicki W., Jagielski M.: Tularemia. *Post. Mikrobiol.* **44**, 265–273 (2005)
 60. Ray T.K., Hutin Y.J., Murhekar M.V.: Cutaneous anthrax, West Bengal, India, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 497–499 (2009)
 61. Rymer W., Wroczyńska A., Nahorski W.L.: Co powinniśmy wiedzieć o zakażeniu wirusem Ebola? *Med. Praktyczna*, **9**, 92–107 (2014)
 62. Sergueev K.V., Yunxiu He., Borschel R.H., Mikeljon P., Nikolic, A., Filippov A.: Rapid and Sensitive Detection of *Yersinia pestis* Using Amplification of Plague Diagnostic Bacteriophages Monitored by Real-Time PCR. *PLoS One*, **5**, e11337 (2010)
 63. Siedner M.J., Gostin L.O., Cranmer H.H., Kraemer J.D.: Strengthening the Detection of and Early Response to Public Health Emergencies: Lessons from the West African Ebola Epidemic. *PLoS Med.* **12**, e1001804 (2015)
 64. Simonson T.S., Okinaka R.T. i wsp.: *Bacillus anthracis* in China and its relationship to worldwide lineages. *BMC Microbiol.* **9**, 1–11 (2009)
 65. Steiner D.J., Furuya Y., Metzger D.W.: Host-pathogen interactions and immune evasion strategies in *Francisella tularensis* pathogenicity, *Infect. Drug Resist.* **7**, 239–251 (2014)
 66. Titball R.W., Leary S.E.: Plague. *Br. Med. Bull.* **54**, 625–633 (1998)
 67. Tokarska-Rodak M.: Tularemia – infekcja wywołana przez *Francisella tularensis*, *Med. Ogólna i Nauki o Zdrowiu*, **21** 56–61 (2015)
 68. Turnbull P.C.B.: Anthrax history, disease and ecology (w) Anthrax, red. T.M. Koehler, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 2002, s. 1–19
 69. Werner S.B., Weidmer C.E., Nelson B.C., Nygaard G.S., Goethals R.M., Poland J.D.: Primary plague pneumonia contracted from a domestic cat at South Lake Tahoe, California. *JAMA*, **251**, 929–931 (1984)
 70. West T.E., von Saint André-von Arnim A.: Clinical Presentation and Management of Severe Ebola Virus Disease. *Ann. American Thoracic Soc.* **11**, 1341–1350 (2014)
 71. World Health Organization (WHO): WHO risk assessment. Human infections with Zaire Ebolavirus in West Africa, 24 June 2014, http://www.who.int/csr/disease/ebola/EVD_WestAfrica_WHO_RiskAssessment_20140624.pdf (26.07.2017)
 72. Wróblewska M., Pancer K.: Wirus Ebola – aktualne zagrożenia i perspektywy kontroli zakażeń. *Post. Nauk Med.* **28**, 34–41 (2015)
 73. Zajkowska J., Hermanowska-Szpakowicz T.: Wąglik jako broń biologiczna. *Med. Pr.* **53**, 167–172 (2002)

Ewelina Pawlikowska*, Dorota Kręgiel

Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka

Wpłynęło w marcu, zaakceptowano w maju 2017 r.

1. Wstęp. 2. Taksonomia. 3. Ekologia. 4. Morfologia i fizjologia. 5. Cykl paraseksualny. 6. *Metschnikowia pulcherrima* – aktywność biochemiczna oraz potencjał aplikacyjny. 7. Podsumowanie

Non-conventional yeast *Metschnikowia pulcherrima* and its application in biotechnology

Abstract: *Metschnikowia* spp. are extensively studied “non-conventional” yeasts. Strains belonging to these genera are considered as non-pathogenic and safe. The unique properties of *Metschnikowia* spp. allow us to look at these microorganisms as a promising subject for evolutionary genetics, taxonomy, ecology, as well as a natural biocontrol agent in biotechnology. This article provides a synthesis of the systematics, morphology, ecology and physiology of *Metschnikowia* spp., with special attention to *M. pulcherrima*. These yeasts are able to produce a number of important metabolites, including organic acids, aroma compounds, oil or pulcherrimic acid. In addition, this review discusses possible applications of these non-conventional yeasts in biotechnology.

1. Introduction. 2. Taxonomy. 3. Ecology. 4. Morphology and physiology. 5. Parasexual cycle. 6. *Metschnikowia pulcherrima* – biochemical activity and application potential. 7. Summary

Słowa kluczowe: *Metschnikowia pulcherrima*, fermentacja, lipidy, biokontrola, pulcherrimina

Key words: *Metschnikowia pulcherrima*, fermentation, lipids, biocontrol, pulcherrimin

1. Wstęp

Drożdże są wykorzystywane przez człowieka już od starożytności. Pod względem badań oraz wykorzystania przemysłowego dominują konwencjonalne szczepy *Saccharomyces* sp., jednak w ostatnich latach można zaobserwować coraz większe zainteresowanie drożdżami należącymi do innych rodzajów. Drożdże niekonwencjonalne wykazują lepsze właściwości adaptacyjne do zmiennych warunków środowiskowych, są zdolne do metabolizowania nietypowych źródeł węgla, a więc i biosyntezy wielu unikalnych produktów.

2. Taksonomia

Drożdże *Metschnikowia* sp. zostały wyizolowane po raz pierwszy w 1884 roku. Wtedy to Ilja Metschnikoff w czasopiśmie „*Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin*” opisał pewien gatunek mikroorganizmów i nazwał go *Monospora bicuspidata*. Szczególną uwagę zwrócił on na charakterystyczne zarodniki w kształcie igieł, które jak później wykazano, stanowiły istotny element pasożytnictwa tych drożdży w organizmie rozwielitek *Daphnia* sp. [31, 43, 48, 73]. W 1899 roku Kamiński zmienił nazwę rodzajową *Monospora* na *Metschnikowia*, ponie-

waż pierwsza z nich była już stosowana w nazewnictwie glonów. Gdy okazało się, że nazwa *Metschnikowia* była również stosowana wcześniej dla innej grupy organizmów, w 1913 roku Genkel zaproponował zmianę nazwy na *Metschnikowiella* [44]. Prace nad taksonomią tych mikroorganizmów rozwijały się systematycznie od lat 20. XX wieku, ale warto zauważyć, że do lat 70. stosowano aż cztery nazwy rodzajowe dla tych charakterystycznych drożdży: *Metschnikowiella*, *Monosporella*, *Monospora* oraz *Metschnikowia* [67]. Taksonomia szczepów w obrębie rodzaju *Metschnikowia* podlegała ciągłym, dynamicznym zmianom. Mikrobiolodzy Miller i Phaff w 4. edycji „*The Yeasts. A Taxonomic Study*” opisali 10 gatunków należących do *Metschnikowia* sp.: *M. agaves*, *M. australis*, *M. bicuspidata*, *M. gruessii*, *M. hawaiiensis*, *M. krissii*, *M. lunata*, *M. pulcherrima*, *M. reukauffii*, *M. zobellii* [44]. Trzynastę lat później 5. edycja tego wydawnictwa opisywała już dodatkowe 29 gatunków: *M. aberdeeniae*, *M. andauensis*, *M. arizonensis*, *M. borealis*, *M. cerradonensis*, *M. chrysoperlae*, *M. colocasiae*, *M. continentalis*, *M. corniflorae*, *M. dekoratum*, *M. drosophilae*, *M. fructicola*, *M. hamakuensis*, *M. hibisci*, *M. kamakouana*, *M. koreensis*, *M. kunwiensis*, *M. lachancei*, *M. lochheadii*, *M. mauinuiana*, *M. noctiluminum*, *M. orientalis*, *M. santaceciliae*, *M. shanxiensis*, *M. similis*, *M. sinensis*, *M. vanudenii*, *M. viticola*, *M. ziziphicola* [30]. Obecnie analizując rodzaj *Metschnikowia*

* Autor korespondencyjny: Ewelina Pawlikowska, Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka, ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź; e-mail: ewelina.pawlikowska@dokt.p.lodz.pl

można doliczyć się aż 49 gatunków, gdyż do rodzaju *Metschnikowia* dołączyły: *M. bowlesiae*, *M. caudata*, *M. chrysomelidarum*, *M. cibodasensis*, *M. colchici*, *M. cubensis*, *M. drakensbergensis*, *M. henanensis*, *M. ipomoeae*, *M. laotica*, *M. matae*, *M. shivogae*, *M. unicuspidata* [22, 23, 53]. Rodzaj *Metschnikowia* tworzy zasadniczą część rodziny *Metschnikowiaceae*, obok kilkudziesięciu innych gatunków z rodzajów *Clavispora* i *Candida*, których taksonomia wymaga wyjaśnienia i weryfikacji na podstawie pełnych danych genomów [21, 31].

Wraz z rozwojem prac nad taksonomią drobnoustrojów miał miejsce również systematyczny postęp w procedurach diagnostycznych [33, 53]. Od czasów badań Ilji Metschnikoff'a aż do lat 60. XX wieku procedury identyfikacyjne polegały wyłącznie na ocenie cech morfologicznych i fizjologicznych mikroorganizmów. Warto tu jednak wspomnieć, że szczepy z rodzaju *Metschnikowia* wykazują wiele cech wspólnych do gatunków z rodzaju *Clavispora*, *Pichia* czy *Chlamydomyza*. Podobne cechy morfologiczne i fizjologiczne wykazują także niektóre gatunki *Candida* sp. (*C. hawaiiiana* i *C. kipukae*, *C. kofuensis*) [32, 52].

Jeden z podstawowych elementów diagnostycznych drożdży, jakim jest udział zasad G+C w genomowym DNA, ocenia się obecnie jako mało precyzyjny, ze względu na fakt występowania u drożdży wartości bardzo zróżnicowanych, wynoszących od 27 mol% do nawet 70 mol%. Zatem sytuacja, w której ma miejsce „nakładanie się” tych wartości wśród niespokrewnionych gatunków jest nieunikniona. Udział G+C w DNA u drożdży z gromady *Ascomycota* wynosi 27–50 mol%, natomiast wśród *Basidiomycota* 50–70 mol%. Ze względu na dość wąski zakres wartości wspólnych (48–52 mol%) diagnostykę drożdży można uzupełnić poprzez analizę struktury ściany komórkowej za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego lub poprzez wykorzystanie klasycznego testu B z błękitem diazoniowym. Zakres zawartości zasad G+C wśród gatunków w obrębie rodzaju *Metschnikowia* wynosi często mniej niż 10 mol%. Rodzaje, u których zakres tych par zasad jest większy niż 10 mol% mogą być uznane za polifiletyczne, jednak warto podkreślić, że węższy zakres nie decyduje o monofiletyzmie [28].

Analizę genetyczną można wykonać także w oparciu o rybosomalny RNA. W 1993 roku Mendonça-Hagler i wsp. dokonali analizy filogenetycznej gatunków przypisanych do rodzaju *Metschnikowia*, badając sekwencje rybosomalnego rRNA [42]. Stwierdzili oni różnice u gatunków należących do tego rodzaju w porównaniu do innych *Ascomycetes* powstałe w wyniku delecji w dużej podjednostce rRNA (25S), obejmującej nukleotydy od 434 do 483. Podobne prace były prowadzone w Japonii przez zespół Yamada, który analizował relacje filogenetyczne między gatunkami rodzaju *Metschnikowia* na podstawie analizy 18S i 26S rRNA [72].

Obecnie stosowane metody molekularne, pozwalające na dokonanie możliwie najbardziej precyzyjnej charakterystyki taksonomicznej drożdży, opierają się także na analizie konserwatywnych sekwencji DNA i białek. Najczęściej stosowane są te sekwencje powtórzeń fragmentów rDNA, gdyż powszechnie przyjmuje się, że są one identyczne w obrębie gatunku, a więc mogą być wykorzystywane do szacowania przynależności gatunkowej drożdży [15]. Sipiczki i wsp. wykazali jednak, że sekwencje gatunkowe rDNA u *Metschnikowia* sp. nie są homogenne i mogą składać się z różnych powtórzeń oraz zmian w domenach D1/D2 [61]. Z kolei Seino i wsp. analizowali powtarzające się kilkunukleotydowe sekwencje DNA u *M. reukaufii*, a wykryte różnice świadczyły o zmienności osobniczej w obrębie gatunku [58]. Zatem analiza filogenetyczna drożdży z rodzaju *Metschnikowia*, zwłaszcza tych nowo izolowanych, może okazać się trudna, zwłaszcza gdy izolaty pochodzą z różnych środowisk geograficznych, znacznie od siebie oddległych [34].

3. Ekologia

Drożdże z rodzaju *Metschnikowia*, podobnie jak inne rodzaje drożdży, nie występują losowo w całej biosferze, lecz tworzą zbiorowiska, w skład których wchodzi mikroorganizmy należące do różnych rodzajów i gatunków. Niektóre gatunki są typową mikrobiotą roślin i owadów, a inne są patogenami zwierząt wodnych (Tabela I) [11]. Warto również wspomnieć, że niektóre gatunki *Metschnikowia* sp. są izolowane w każdej strefie klimatycznej, zaś inne charakteryzuje skrajny endemizm, gdyż zajmują jedynie określone, bardzo specyficzne nisze ekologiczne [31].

Mendonça-Hagler i wsp., analizując już w latach 90. różnice filogenetyczne w obrębie rodzaju *Metschnikowia*, uznali znane wówczas gatunki *M. australis*, *M. bicuspidata*, *M. krissii* i *M. zobellii* za typowo „wodne”, tzn. bytujące w wodach morskich i słodkich, natomiast gatunki *M. hawaiiensis*, *M. lunata*, *M. pulcherrima* i *M. reukaufii* jako typowo „lądowe”, występujące jako naturalna mikrobiota kwiatów, owoców i owadów [42]. W 2011 roku Naumow wyróżnił już 3 odrębne grupy drożdży z rodzaju *Metschnikowia*. Pierwsza z nich obejmuje gatunki bytujące w środowiskach wodnych: *M. bicuspidata*, *M. australis*, *M. zobellii* i *M. krissii*, druga to gatunki najczęściej izolowane jako mikrobiota owoców, kwiatów i owadów: *M. pulcherrima*, *M. reukaufii*, *M. andauensis*, *M. chrysoperlae*, *M. fruticola*, *M. shanxiensis*, *M. koreensis*, *M. lachancei*, *M. noctiluminum*, *M. vanudenii* oraz *M. viticola*. Dodatkowo można dołączyć do tej grupy drożdże tworzące niewielkie zarodniki: *M. corniflorae*, *M. kunwiensis* i *M. lunata*. Trzecią grupę stanowią gatunki klimatu tropikalnego,

Tabela I
Ekologia drożdży z rodzaju *Metschnikowia*

Środowisko naturalne	Gatunek	Pierwsze doniesienie
Wodne	<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	Metschnikoff, 1884
	<i>M. krissii</i>	van Uden i Castelo-Branco, 1961
	<i>M. zobellii</i>	van Uden i Castelo-Branco, 1961
Lądowe	<i>M. aberdeeniae</i>	Lachance i wsp., 2006
	<i>M. agaves</i>	Lachance, 1993
	<i>M. andauensis</i>	Manso i Nunes, 2011
	<i>M. caudata</i>	de Vega i wsp., 2014
	<i>M. chrysomelidarum</i>	Nguyen i wsp., 2006
	<i>M. chrysoperlae</i>	Suh i wsp., 2004
	<i>M. cibodasensis</i>	Sjamsuridzal i wsp., 2013
	<i>M. colchici</i>	Gouliamova i wsp., 2015
	<i>M. corniflorae</i>	Nguyen i wsp., 2006
	<i>M. drakensbergensis</i>	de Vega i wsp., 2014
	<i>M. drosophilae</i>	Lachance i wsp., 2001
	<i>M. fructicola</i>	Kurtzman i Droby, 2001
	<i>M. gruessii</i>	Giménez-Jurado, 1992
	<i>M. henanensis</i>	Hui i wsp., 2013
	<i>M. hibisci</i>	Lachance i wsp., 1998
	<i>M. kunwiensis</i>	Brysch-Herzberg, 2004
	<i>M. lachancei</i>	Giménez-Jurado i wsp., 2003
	<i>M. laotica</i>	Sipiczki, 2014
	<i>M. lunata</i>	Golubev, 1978
	<i>M. noctiluminum</i>	Nguyen i wsp., 2006
	<i>M. orientalis</i>	Lachance i wsp., 2006
	<i>M. pulcherrima</i>	Pitt i Miller, 1968
	<i>M. reukaufii</i>	Pitt i Miller, 1968
	<i>M. shanxiensis</i>	Xue i Zhang, 2006
	<i>M. shivogae</i>	Lachance i wsp., 2008
	<i>M. sinensis</i>	Xue i wsp., 2006
	<i>M. unicuspidata</i>	Keilin, 1920, van Uden, 1962
	<i>M. vanudenii</i>	Giménez-Jurado i wsp., 2003
	<i>M. viticola</i>	Péter i wsp., 2005
	<i>M. ziziphicola</i>	Xue i wsp., 2006
Tropikalne	<i>M. arizonensis</i>	Lachance oraz Bowles, 2002
	<i>M. bowlesiae</i>	Lachance, 2013
	<i>M. cerradonensis</i>	Rosa i wsp., 2007
	<i>M. colocasiae</i>	Lachance i Bowles, 2004
	<i>M. continentalis</i> <i>M. continentalis</i> var. <i>continentalis</i>	Lachance i wsp., 1998
	<i>M. cubensis</i>	Fidalgo-Jimenez i wsp., 2008
	<i>M. dekortorum</i>	Lachance i Bowles, 2002
	<i>M. hamakuensis</i>	Lachance M., 2005
	<i>M. hawaiiensis</i>	Lachance i wsp., 1990
	<i>M. ipomoeae</i>	Lachance i wsp., 1998
	<i>M. kamakouana</i>	Lachance, 2005
	<i>M. lochheadii</i>	Lachance i wsp., 2001
	<i>M. matae</i>	de Oliveira Santos i wsp., 2015
	<i>M. mauinuiana</i>	Lachance, 2005
	<i>M. santaceciliae</i>	Lachance i wsp., 2003
	<i>M. similis</i>	Lachance i Bowles, 2004

Na podstawie [23, 30, 49]

charakteryzujące się tworzeniem zarodników o szczególnie dużych rozmiarach [29, 48]. Według de Oliveira-Santos'a „grupa tropikalna” drożdży *Metschnikowia* sp., których askospory osiągają długość nawet 17 µm, liczy kilkanaście gatunków: *M. arizonensis*, *M. bowlesiae*, *M. cerradonensis*, *M. colocasiae*, *M. continentalis*, *M. continentalis* var. *continentalis*, *M. cubensis*, *M. dekortorum*, *M. hamakuensis*, *M. hawaiiensis*, *M. ipomoeae*, *M. kama-kouana*, *M. lochheadii*, *M. matae*, *M. mauinuiana*, *M. santaceciliae*, *M. similis* [23, 49]. Są one najczęściej izolowane jako mikrobiota owadów odwiedzających efemeryczne kwiaty, a większość z nich jest endemicznie związana z określonymi regionami geograficznymi [33].

Gatunki „lądowe” z rodzaju *Metschnikowia*, obok innych rodzajów drożdży, np. *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera* oraz *Pichia* występują na powierzchni skórki zdrowych owoców, a ich poziom wynosi 10–10³ jtk/cm². Charakteryzują się one wysoką odpornością na wysuszenie, światło słoneczne, czy też wahania temperatury. Drożdże *M. pulcherrima* rzadko powodują psucie świeżych owoców, za proces ten odpowiedzialne są głównie grzyby strzępkowe. Drożdże *Metschnikowia* sp., występując jako naturalna mikrobiota owoców, są nieodłącznie związane z mikrobiotą moszczy i win. Uczestniczą one w pierwszym etapie spontanicznej fermentacji, kiedy to mogą stanowić nawet 18% populacji drożdży uczestniczących w tym procesie [1, 47].

W ekosystemach lądowych drożdże z rodzaju *Metschnikowia* uczestniczą w złożonych relacjach z innymi organizmami. Główne czynniki, które mogą kształtować złożone konsorcja drożdży opisali Starmar i wsp. na przykładzie systemu roślina-drożdże-*Drosophila* [64]. Pierwszym czynnikiem kształtującym takie relacje jest specyficzność, ponieważ owady żywią się tylko niektórymi gatunkami roślin. Drożdże rozwijają się w fytosferze roślin tylko wtedy, gdy w tkance gospodarza nie będzie obecnych związków toksycznych, takich jak np. saponiny (amensalizm). Ponadto mikrobiota już obecna w tkance roślinnej, może oddziaływać na nowo wprowadzane do nich gatunki (interakcje międzydrobnoustrojowe). W niektórych przypadkach interakcje mają charakter mutualistyczny, lecz w innych może dochodzić do konkurencji o składniki odżywcze [16].

Ciekawym przykładem mutualizmu jest związek pomiędzy drożdżami z rodzaju *Metschnikowia* i małymi (2–6 mm) owadami z rodziny *Nitidulidae*. Charakter tej symbiozy nie jest jeszcze do końca wyjaśniony, lecz wyniki wstępnych eksperymentów sugerują, że dorosłe chrząszcze mogą przetrwać bez tych mikroorganizmów w środowisku bogatym w substancje odżywcze, ale przeżycie larw zależy już od obecności komórek drożdży [32].

Wodne gatunki *Metschnikowia* sp. występują dość powszechnie w morzach i oceanach, choć ich liczebność nie jest tak duża jak bakterii. Gatunki należące

do tego rodzaju stanowią mikrobiotę morskich bezkręgowców, ryb oraz alg. Badania wskazują na możliwe relacje symbiotyczne między omawianymi drożdżami, a organizmami wodnymi. Jednak niektóre gatunki *Metschnikowia* sp. mogą być chorobotwórcze dla ryb i planktonowych skorupiaków, stanowiąc np. pasożyty rozwielitek *Daphnia* sp. [46]. Doniesienia literaturowe na ten temat są jednak nieliczne, gdyż występowanie interakcji między drożdżami i organizmami wodnymi nie było tak intensywnie badane jak w przypadku organizmów lądowych. Jako pierwszy pasożytnictwo drożdży *M. bicuspidata* wykrył Metschnikoff, który zaobserwował, że ich komórki wytwarzają charakterystyczne długie askospory w formie igieł. Wnikają one do rozwielitek jako gospodarza przez co ich spory mogą znajdować się w każdej części organizmu tych małych skorupiaków, nawet w czułkach. Zainfekowane rozwielitki w późnych stadiach zakażenia stają się opalizująco białe i wyglądają tak, jakby były wypełnione słomą. Infekcje drożdżami *M. bicuspidata* u *Daphnia* sp. trwają zwykle 2–3 tygodnie i kończą się najczęściej śmiercią gospodarza. W czasie infekcji zdolność *Daphnia* sp. do rozmnażania ulega znacznej redukcji i postępuje wraz z rozwojem zakażenia [13, 44].

4. Morfologia i fizjologia

Komórki wegetatywne drożdży z rodzaju *Metschnikowia* charakteryzuje bardzo zróżnicowana morfologia. Mogą być one kuliste, elipsoidalne, owalne, w kształcie gruszki lub wydłużone, występujące pojedynczo, w parach lub czasami w krótkich łańcuchach. Ich rozmiary są również bardzo zróżnicowane, wynosząc od 2–8 µm szerokości do 3–35 µm długości [62]. Kształt komórek jest specyficzny dla niektórych gatunków, np. komórki w kształcie półksiężyca tworzy *M. lunata*, a bardzo wydłużone komórki *M. gruessii* występują w grupach po 3 lub 4, tworząc charakterystyczne „trójkąty” lub „samoloty” [18].

Komórki drożdży rozmnażają się wegetatywnie przez pączkowanie wieloboczne, tworzą słabo rozbudowaną pseudogrzybnię, ale nie tworzą mycelium. W starszych hodowlach tworzone są chlamydospory, odznaczające się grubszą ścianą i występowaniem jednej lub kilku kuleczek tłuszczu. Pozostaje kwestią otwartą odporność chlamydospor na warunki stresogenne, natomiast, w odróżnieniu od innych rodzajów, chlamydospory *Metschnikowia* sp. dają początek zarówno aktywnym, pączkującym komórkom wegetatywnym, jak i tworzeniu worków z zarodnikami (1–2). Gatunki *Metschnikowia* sp. tworzą charakterystyczne długie askospory w kształcie igły, a same worki z zarodnikami są o wiele większe niż komórki wegetatywne. U gatunków *M. pulcherrima*, *M. reukauffii* i *M. koreen-*

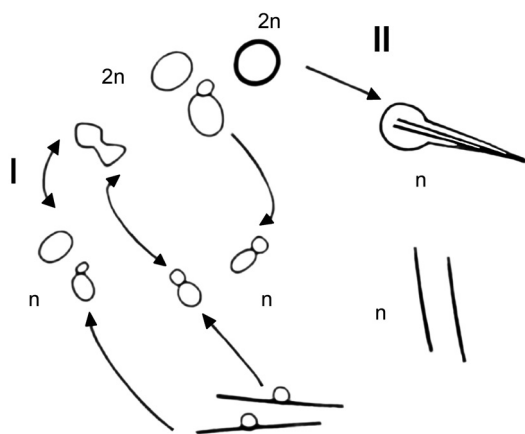
sis tworzenie zarodników jest poprzedzone przejściem komórek diploidalnych w chlamydospory. Ta podwójna rola tzw. „pulcherrima cells”, funkcjonujących zarówno jako chlamydospory, jak i komórki macierzyste dla worków, jest unikalną cechą wśród drożdży [31].

Gatunki należące do tzw. „grupy tropikalnej” wytwarzają zarodniki, których rozmiary są nie tylko do 50 razy większe od pączkujących komórek wegetatywnych, ale także same worki mają charakterystyczne helikalnie ułożone wypustki [33, 49]. Charakterystyczna morfologia askospor sugeruje, iż kształt igły może być wynikiem adaptacji środowiskowej. Niewykluczone, że kształt ten odgrywa istotną rolę w procesie inwazji drożdży w komórkach gospodarza, choć niewiele jest dowodów na to, że gatunki inne niż *M. bicuspidata* wykorzystują unikalny kształt askospor dla adaptacji do różnorodnych warunków środowiskowych [12, 30].

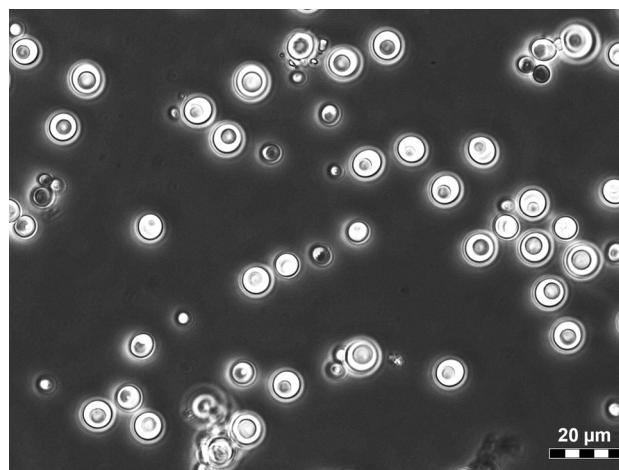
Sporulacja omawianych drożdży jest najlepiej widoczna na naturalnym podłożu agarowym V8, inaczej niż u drożdży *Saccharomyces*, dla których stosuje się zwykle syntetyczny agar octanowy. Unikalna kompozycja pożywki V8, złożonej z soków warzywnych, zapewnia odpowiednie składniki odżywcze ułatwiające wywołanie i utrzymanie pełnego procesu seksualnego. Warto zaznaczyć, że u większości gatunków *Metschnikowia* optymalna temperatura dla zarodnikowania jest niższa od optymalnej temperatury wzrostu i wynosi 12–17°C [30].

5. Cykl paraseksualny

Podstawowy materiał genetyczny mieszczący się w haploidalnych komórkach drożdży z rodzaju *Metschnikowia* zawarty jest w dwóch chromosomach o wielkości 1,8 Mb (I) i 2,0 Mb (II) [9]. Udowodniono, że w obrębie niektórych szczepów diploidalnych *Metschnikowia* sp., np.: *M. bicuspidata*, *M. pulcherrima* i *M. reukaufii* możliwe jest istnienie zarówno komórek haplo-, jak i diploidalnych (Rys. 1) [48]. Po kopulacji komórek



Rys. 1. Cykl życiowy drożdży *Metschnikowia* sp. (opis w tekście)



Rys. 2. Chlamydospory drożdży *M. pulcherrima* z widocznymi kropelkami tłuszczu

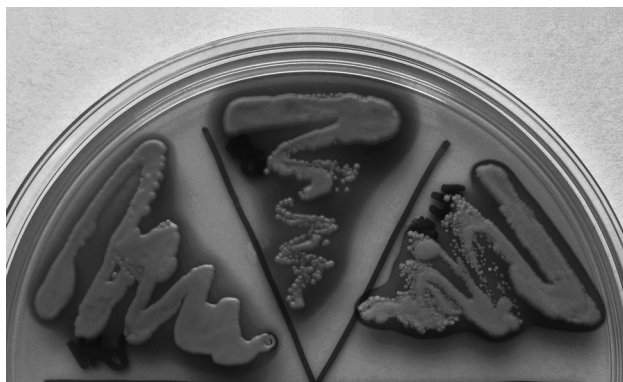
występuje faza heterokarionów, która może mieć różną długość, w zależności od szczepu i warunków hodowli. Heterokarion o haploidalnych jądrach może generować haploidalne komórki przeciwnych typów lub, po kariogamii, mogą tworzyć się komórki diploidalne.

Badając cykl komórkowy gatunków z rodzaju *Metschnikowia* stwierdzono, że *M. drosophilae*, *M. orientalis*, *M. agaves* oraz gatunki izolowane w strefie klimatu tropikalnego są haploidalne, heterotaliczne i ulegają fuzji. Z kolei komórki *M. bicuspidata* mogą istnieć zarówno jako diploidalne, jak i haploidalne [31]. Występujące zmiany w poszczególnych fazach cyklu życiowego *Metschnikowia* sp. mogą być związane z ich zróżnicowaną ekologią, np. występowaniem w środowiskach słodkich substratów roślinnych lub w organizmach owadów [48].

6. *Metschnikowia pulcherrima* – aktywność biochemiczna oraz potencjał aplikacyjny

Drożdże z gatunku *Metschnikowia pulcherrima* są gatunkiem „lądowym”, dość często izolowanym jako typowa mikrobiota owoców, kwiatów oraz soków roślinnych. Komórki wegetatywne są kuliste lub elipsoidalne o wymiarach 2,5–6 µm szerokości na 4–10 µm długości. W starszych hodowlach widoczne są kuliste komórki zawierające jedną lub kilka kropel tłuszczu (Rys. 2). Kolonie rosnące na agarze słodowym przybierają barwę kremową, ale w obecności jonów Fe^{3+} ich kolor zmienia się na czerwono-brązowy, wskutek wytwarzania barwnika pulcherriminowego, który zwykle dyfunduje do podłoża (Rys. 3) [53, 60].

W hodowlach tlenowych *M. pulcherrima* nie tworzy pseudomycelium, natomiast szczątkową pseudogryźnię może wytwarzać w warunkach ograniczonego dostępu tlenu. Starsze komórki wegetatywne przekształcają się w sferyczne chlamydospory, z których z kolei powstają wydłużone, cylindryczne worki o wymiarach



Rys. 3. Tworzenie barwnika – pulcherriminy przez drożdże *Metschnikowia pulcherrima* w obecności soli FeCl_3

(4–11) × (15–55) μm . Zwykle zawierają one jeden lub dwa zarodniki w kształcie igły [31, 45].

M. pulcherrima asymiluje glukozę, galaktozę, sorbozę, sacharozę, maltozę, celobiozę, trehalozę, melezytozę, czasem rybozę. Drożdże te są także zdolne do wykorzystywania etanolu, glicerolu, mannitolu, salicyny i heksadekanu. Inne źródła węgla, np.: inulina, rafinoza, laktoza, skrobia, ramnoza, arabinoza, metanol, erytrytol, inozytol i kwas glukuronowy nie są przez nie przyswajane. Mimo dość szerokiego spektrum asymilowanych źródeł węgla, fermentują jedynie glukozę, fruktozę, czasami galaktozę. Udział zasad G+C w DNA tego gatunku wynosi 45,6% [30].

Głównymi związkami azotu wykorzystywanymi przez drożdże są wolne aminokwasy i nieorganiczne związki amonowe. Są one asymilowane, umożliwiając wzrost drożdży, produkcję wyższych alkoholi, kwasów organicznych oraz estrów. Drożdże *Metschnikowia* sp. nie asymilują azotanów, ale mogą wykorzystywać etyloaminę oraz lizynę [30, 44]. Warto podkreślić, że omawiane drożdże są zdolne do produkcji pozakomórkowych proteaz i lipaz, a cecha ta odgrywa ważną rolę w adaptacji komórek do warunków środowiskowych, tworzeniu związków aromatu oraz ich aktywności anty-drobnoustrojowej [30].

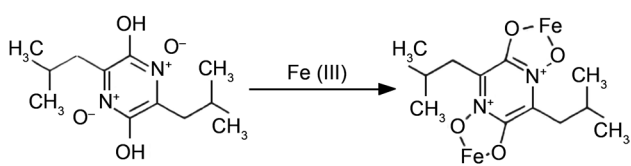
Amensalizm, pulcherrimina i procesy biokontroli

Drożdże *Metschnikowia* sp. charakteryzuje wyjątkowa zdolność do wygrywania konkurencji z innymi mikroorganizmami o kolonizację określonych nisz ekologicznych. Antagonistyczne własności tych drożdży można wytłumaczyć: (1) konkurencją o składniki odżywcze, (2) zmianą pH środowiska wskutek produkcji kwasów organicznych, (3) tolerancją komórek na etanol oraz (4) wydzielaniem i uwalnianiem pozakomórkowych związków anty-drobnoustrojowych [47, 63]. Drożdże-antagoniści, namnażając się w środowisku, nie tylko ograniczają pulę łatwo dostępnych składników pokarmowych, ale także zmniejszają potencjalną prze-

strzeń życiową dla innych drobnoustrojów, co w efekcie wpływa na ograniczenie ich rozwoju [20].

Stwierdzono, że drożdże *Metschnikowia* sp. charakteryzują się dość silną aktywnością przeciwgrzybiczą, wykazując zdecydowanie słabszy antagonizm w stosunku do bakterii i pierwotniaków [2, 33, 35]. Kilka wcześniejszych doniesień dotyczących wytwarzania toksyn killerowych przez te drożdże, zostało ostatnio zweryfikowanych. Wskazano, że w wielu przypadkach działanie antybakteryjne *M. pulcherrima* wywołane jest zmianą pH środowiska wskutek produkcji kwasów organicznych, natomiast antagonizm w stosunku do drożdży oraz pleśni związany jest głównie z produkcją kwasu pulcherriminowego wiążącego deficytowe żelazo [50]. Występowanie aktywności killerowej zostało potwierdzone u rodzajów: *Saccharomyces*, *Debaryomyces* (*Schwanniomyces*), *Kluyveromyces*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Williopsis*, *Saccharomycodes*. Warto jednak tutaj wspomnieć, że drożdże *Metschnikowia* sp. wykazują oporność na toksyny killerowe [20].

Na unikatowe zdolności *M. pulcherrima* do wygrywania konkurencji z innymi drobnoustrojami o miejsce w środowisku i związaną z nimi produkcję zabarwionych na czerwono związków wskazał już w 1959 roku MacWilliam [38]. Cook zidentyfikował czerwony barwnik jako sól kwasu pulcherriminowego [8]. Kwas ten jest wydzielany przez komórki do środowiska zewnętrznego, a tam z jonami żelaza (III) tworzy kompleks o czerwonym zabarwieniu (Rys. 4) [41]. Według Naumowa zdolne do tworzenia kwasu pulcherriminowego są tylko komórki haploidalne *Metschnikowia pulcherrima*. Obserwował on bowiem powstawanie czerwonych mikroobszarów w białych koloniach drożdży diploidalnych [48].



Rys. 4. Tworzenie pulcherriminy w reakcji kompleksowania jonów Fe^{3+} i kwasu pulcherriminowego

Pulcherrimina może być produkowana również przez niektóre gatunki bakterii z rodzaju *Bacillus* (*B. licheniformis*, *B. subtilis*) oraz szczepy drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Produkcja barwnika ma miejsce w pożywkach zawierających sole żelaza (III), ale ubogich w biotynę i inne potrzebne stymulatory wzrostu [3, 8, 26, 60, 68]. Inne drożdże, np. *Rhodotorula* sp. i *Sporobolomyces* sp. również charakteryzują się wytwarzaniem czerwonych barwników, jednak związki te odbiegają znacznie od pulcherriminy, zarówno pod względem budowy, jak i właściwości. Pulcherrimina jest praktycznie nierozpuszczalna w wodzie, kwasach

i typowych rozpuszczalnikach organicznych. Związek ten rozpuszcza się natomiast dość dobrze w silnych roztworach alkalicznych, a dodatek kwasu powoduje ponowne zmniejszenie jej rozpuszczalności i wytrącanie z roztworu. Procedura otrzymywania pulcherrimy, opisana została już w 1953 roku przez Kluyver'a i wsp. Pozwoliła ona na otrzymanie 250–300 mg barwnika ze 100 g mokrej biomasy drożdży [26].

Uważa się, że reakcja kompleksowania kwasu pulcherriminowego i jonów żelaza Fe (III) wyczerpuje dostępność tych jonów w środowisku. Żelazo jest ważnym pierwiastkiem dla wzrostu wszystkich organizmów żywych, zatem jego niedobór w środowisku stymuluje mechanizmy konkurencji. Zdolność do produkcji związków o niskiej masie cząsteczkowej warunkuje taką przewagę w konkurencyjnym nabyciu jonu żelazowego [6]. Właśnie brakiem jonów Fe^{3+} tłumaczy się zahamowanie wzrostu drożdży „dzikich”, zanieczyszczających środowiska roślinne, choć nie wyklucza się występowania również innych mechanizmów antagonistycznego działania *M. pulcherrima* [57]. Istnieją bowiem dowody wskazujące, że omawiane drożdże wydzielają także enzymy lityczne, np. chitynazę, co może wiązać się z ich właściwościami antydrobnoustrojowymi [66].

Stwierdzono, że obecność CaCl_2 i NaHCO_3 w środowisku ma pozytywny wpływ na potencjał antagonistyczny szczepów *Metschnikowia* sp. [10]. Macarisin i wsp. wykazali, że szczepy omawianych drożdży generują wysoki poziom nadtlenu na powierzchniach nienaruszonych owoców. Taka odpowiedź oksydacyjna drożdży może być elementem antagonistycznych zachowań *M. pulcherrima* w stosunku do innych drobnoustrojów [37].

Różne szczepy *M. pulcherrima* zostały uznane jako wysoce skuteczny środek kontroli biologicznej przeciwko liczным gatunkom grzybów atakujących owoce i warzywa, np. *Penicillium expansum* i *Botrytis cinerea* [24, 60]. Antagonistyczne działanie omawianych drożdży zostało także odnotowane dla innych rodzajów grzybów: *Candida*, *Aspergillus*, *Trichosporon*, *Trichoderma* oraz bakterii: *Escherichia coli* i *Proteus vulgaris* [50, 59, 66]. Dostępna literatura opisuje szczepy drożdży należące do gatunków: *M. pulcherrima* i *M. fructicola* jako skuteczne w zwalczaniu *B. cinerea*, *P. expansum*, *Alternaria alternata* na jabłkach, *P. digitatum* i *P. italicum* na cytrusach oraz *B. cinerea* na winogronach, truskawkach i pomidorach [20, 57, 66]. Ponadto *M. pulcherrima* okazały się skuteczne w zapobieganiu rozwojowi bakterieryjnych patogenów: *Listeria* sp. i *Salmonella* sp. [39].

Drożdże *Metschnikowia* sp. o szerokiej tolerancji temperaturowej, nie wytwarzają spor o działaniu alergizującym oraz szkodliwych mikotoksyn, a więc mogą wchodzić w skład komercyjnych preparatów zapewniających ochronę owoców i warzyw zarówno przed, jak i po zbiorze [4, 47, 66].

W obszernym artykule przeglądowym, opracowanym przez największe światowe jednostki opiniotwórcze i przemysłowe, laboratoria i stowarzyszenia sektora spożywczego, drożdże *M. pulcherrima* znalazły się na liście mikroorganizmów technologicznie przydatnych [4]. Opracowane wcześniej preparaty Shemer (Holandia) oraz ProYeast-ST i ProYeast-ORG (Izrael) skutecznie zwalczają patogeny kwiatów i owoców już na polu, kiedy stosowane są kilkakrotnie w czasie okresu wegetacyjnego. Wykazano, że są one aktywne w stosunku do pleśni z rodzajów: *Botrytis*, *Penicillium*, *Rhizopus* i *Aspergillus* rozwijających się na truskawkach, jabłkach, owocach cytrusowych i winogronach [24, 71]. Obecnie EFSA (European Food Safety Authority) prowadzi konsultacje w sprawie aktywnych substancji *M. fructicola*, o potencjalnym zastosowaniu jako naturalne biopestycydy [14].

Badania prowadzone przez Csutak'a i wsp. sugerują, że szczepy *M. pulcherrima*, izolowane bezpośrednio jako mikrobiota owoców, wykazują lepszą aktywność antagonistyczną w stosunku do patogenów, w porównaniu ze szczepami kolekcyjnymi. Wynika to prawdopodobnie z możliwości występowania u izolatów zmian genotypowych i fenotypowych, związanych z adaptacją do różnych środowisk naturalnych [10].

Występowanie oddziaływań antagonistycznych *M. pulcherrima* w stosunku do szczepów *Candida* sp. izolowanych z ludzkiego materiału klinicznego może przyczynić się do rozszerzenia aplikacji drożdży *Metschnikowia* sp. w preparatach farmaceutycznych dla ludzi i zwierząt [10]. Jednak takie zastosowanie wymaga wielu badań. Warto zaznaczyć, że w obrębie rodzaju *Metschnikowia* mogą znaleźć się również szczepy atypowe. Kuan i wsp. opisali pierwszy przypadek wyizolowania od pacjenta z zapaleniem skóry szczepu drożdży, wykazującego duże podobieństwo do *Metschnikowia drosophilae*. Fakt ten wskazuje na potrzebę rozwijania kompleksowej analizy molekularnej oraz charakterystyki fenotypowej szczepów należących do rodzaju *Metschnikowia* [27].

Aktywność fermentacyjna

Drożdże *M. pulcherrima* charakteryzuje słaba aktywność fermentacyjna, choć stanowią one często rodzinę mikrobiotę moszczy winiarskich. Liczne badania wykazały, że rodzaj *Saccharomyces* dominuje w etapie głównej fermentacji alkoholowej, zaś inne rodzaje, m.in. *Metschnikowia* są aktywne podczas pierwszych stadiów procesu.

Położenie geograficzne, warunki klimatyczne, odmiany owoców, a także specyficzne technologie produkcji win, czy cydrów mogą istotnie wpływać na różnorodność rodzajową i gatunkową drożdży obecnych w moszczu [5, 69]. Znajomość gatunków drożdży, które

prowadzą procesy fermentacji alkoholowej, stanowi kluczowy element wiedzy o ich wpływie na jakość wina. Świeży moszcz gronowy zawiera wiele gatunków drożdży, głównie z rodzajów: *Hanseniaspora* (*Kloeckera*), *Pichia*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* oraz *Metschnikowia*. Drożdże te stanowią zarówno rodzimą mikrobiotę winogron, jak i środowiska winnicy. *Metschnikowia* sp. oraz inne drożdże niekonwencjonalne inicjują spontaniczną fermentację soku, ale bardzo szybko w procesie fermentacji zaczynają dominować *S. cerevisiae* [5, 36].

Liczba komórek drożdży, innych niż *Saccharomyces* sp., już na wczesnych etapach fermentacji osiąga maksimum wynoszące 10^5 jtk/ml. Poziom taki jest jednak wystarczający, by wywierać wpływ na skład chemiczny wina. Zatem znaczenie drożdży niekonwencjonalnych w ogólnym charakterze wina jest bardziej istotne niż wcześniej sądzono. Wiele badań w różnych regionach winiarskich na świecie potwierdza istotny wkład, jaki gatunki drożdży nie należące do *Saccharomyces* sp. wnoszą do procesów fermentacji, zarówno spontanicznych, jak i kierowanych. Drożdże niekonwencjonalne wprowadzają do procesu fermentacji element różnorodności ekologicznej, która znacznie wykracza poza rodzaj *Saccharomyces* [17].

Aktywność enzymatyczna drożdży odgrywa kluczową rolę w kształtowaniu charakteru produktu finalnego. Szczególnie ważna jest produkcja pozakomórkowych enzymów hydrolitycznych: pektynaz, proteaz, β -glukanaz, β -glukozydaz, celulaz, celobiaz oraz amylaz. Aktywność proteolityczna ma istotne znaczenie dla redukcji zmętnień w piwie, czy winie. Ponadto obecność aktywnych proteaz zwiększa dostępność przyswajalnych źródeł azotu dla mikrobioty win [54]. W badaniach Strauss'a i wsp. drożdże *M. pulcherrima* wykazały dobrą aktywność tych enzymów, obok innych drożdży niekonwencjonalnych. *Metschnikowia* sp. wykazuje także aktywność β -glukozydazy, która ma istotne znaczenie w tworzeniu związków aromatu [19, 65]. Aktywność tego enzymu w moszczu skutkuje zwiększeniem zawartości α -terpineolu, nerolu oraz geraniolu. Jednakże, w winach wytworzonych przez mieszane kultury drożdży *M. pulcherrima* oraz *S. cerevisiae*, stężenie dwóch ostatnich związków było zdecydowanie niższe, prawdopodobnie wskutek przekształcenia nerolu i geraniolu do α -terpinolu przez *S. cerevisiae* [51].

Przemysł fermentacyjny poszukuje nowych technologii, które umożliwiają produkcję win o obniżonej zawartości alkoholu. Jednym ze sposobów byłoby wykorzystanie szczepów drożdży, które są mniej wydajne w przekształcaniu sacharydów do etanolu. Komercyjne drożdże winiarskie charakteryzują się wysoką zdolnością fermentacyjną. Wykazano jednak, że szczepy *M. pulcherrima* mogą być wykorzystane do produkcji win niskoalkoholowych. Odpowiednie

inokulacja moszczy szczepami *M. pulcherrima* oraz fermentacyjnymi *Saccharomyces* sp. umożliwiły wytworzenie produktów o obniżonej zawartości etanolu oraz o bardzo interesującym profilu zapachowym [7, 55, 70]. Otrzymane wina charakteryzowały się podwyższonym stężeniem 2-fenyli i octanu 2-fenyletylu. Obecność tych związków wpływała pozytywnie na cechy sensoryczne produktów fermentacji [70].

Szczepy *M. pulcherrima*, tworząc związki przeciwdrobnoustrojowe: kwas pulcherriminowy oraz 2-fenyletanol, mogą być stosowane jako biofungicydy w środowiskach fermentacyjnych o kwaśnym odczynie środowiska, wynoszącym nawet pH = 3–4 [56]. Oceniono, że obecność drożdży *M. pulcherrima* może wpływać hamująco na wzrost drożdży zanieczyszczających środowiska fermentacyjne: *Pichia*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Saccharomycodes*, *Torulaspora* i *Brettanomyces*. Interesującym jest fakt, że aktywność *M. pulcherrima* nie ma negatywnego wpływu na wzrost drożdży konwencjonalnych *S. cerevisiae* [5, 25, 50].

Mimo, że dokładne mechanizmy tej „naturalnej biokontroli” są wciąż słabo poznane, to oferują one potencjał zastosowania wybranych szczepów *M. pulcherrima* jako składnika tzw. „multistarterów” razem z konwencjonalnymi drożdżami przemysłowymi [50].

Produkcja lipidów

Drożdże *M. pulcherrima* wykazują potencjał do produkcji tłuszczu. Lipidy mogą nawet stanowić do 40% s.m., co jest porównywalne z innymi drobnoustrojami oleogennymi. Ponadto tłuszcze wytwarzane przez *Metschnikowia* sp. wykazują duże podobieństwo do tych obecnych w oleju palmowym [56].

U prawie wszystkich organizmów zdolność do biosyntezy lipidów prowadzi do utworzenia nasyconych kwasów tłuszczowych. Utworzone kwasy C16-C18 mogą być następnie modyfikowane przez aktywność odpowiednich desaturaz i elongaz. Głównym produktem biosyntezy jest kwas oleinowy ($\Delta^{9,12}$ C18:2), który stanowi nawet 70% ogólnej puli kwasów tłuszczowych. Gromadzenie lipidów zachodzi w środowisku, gdy limitacja źródeł węgla praktycznie nie istnieje, natomiast występuje niedobór źródeł azotu. Oprócz deficytu azotu, również niedobór fosforanów i siarczanów stanowi kluczowy element środowiskowy dla syntezy kwasów tłuszczowych u mikroorganizmów oleogennych. Na pewnym etapie hodowli, po wyczerpaniu źródeł węgla, namnażanie komórek zostaje zatrzymane, a metabolizm jest wówczas ukierunkowany na syntezę lipidów [56].

Tworzenie kwasów tłuszczowych inicjuje konwersja acetylo-CoA do malonylo-CoA i malonylo-ACP. Acetylo-CoA powstaje z kwasu cytrynowego, zgromadzonego wewnątrz mitochondriów lub powstałego w cyklu Krebsa, przy udziale liazy cytrynianowej. Innym waż-

nym enzymem związanym z procesem akumulacji lipidów jest dehydrogenaza izocytrynianowa zależna od obecności adenosynomonofosforanu (AMP). W przypadku deficytu azotu, dochodzi do gwałtownego obniżenia poziomu AMP. Wówczas aktywność tego enzymu zwiększa się, by wykorzystać do syntezy materiału komórkowego wszystkie dostępne jony amonowe. Powoduje to zmiany w cyklu Krebsa, polegające na hamowaniu aktywności dehydrogenazy izocytrynianowej, a więc dochodzi do akumulacji cytrynianu. Cytrynian w cytoplazmie ulega przemianom i w konsekwencji powstaje acetylo-CoA, niezbędny do biosyntezy kwasów tłuszczowych. Biosynteza ta zachodzi w procesie odwróconego procesu β -oksydacji [40].

W produkcji przemysłowej, zwłaszcza przy zastosowaniu odpadowych surowców, środowisko często nie jest sterylne, co może istotnie wpływać na wydajność procesu biosyntezy [40]. Wykorzystując unikalne zdolności *Metschnikowia* sp. do wzrostu w dość szerokim zakresie temperatur, a także ich aktywności enzymatyczne i przeciwdrobnoustrojowe, wyselekcjonowane szczepy drożdży można wykorzystać do produkcji olejów z różnorodnej biomasy roślinnej, bez konieczności zastosowania szczególnych warunków aseptycznych [56].

7. Podsumowanie

Wyjątkowe zdolności adaptacyjne szczepów z rodzaju *Metschnikowia* oraz dominacja nad innymi grupami drobnoustrojów w różnych niszach ekologicznych sprawiają, że cechy tych drożdży wydają się być nie tylko interesujące z naukowego punktu widzenia, ale wnoszą one także duży potencjał aplikacyjny. Zważywszy, że aktualny wykaz mikroorganizmów o potencjalnych możliwościach aplikacyjnych jest raczej stabilny, a nawet konserwatywny, zastosowanie technologiczne mogą znaleźć tylko gatunki bardzo dobrze zbadane i opisane [4]. Rozwój wiedzy biotechnologicznej i metod molekularnych z pewnością pozwolą nie tylko na skuteczną identyfikację wyselekcjonowanych drożdży, ale także umożliwią wyjaśnienie mechanizmów ich działania, monitorowania wzrostu oraz efektywności poszczególnych szlaków metabolicznych. Pozwoli to na powszechne wykorzystanie unikalnych zdolności drożdży z rodzaju *Metschnikowia* w różnych procesach biotechnologicznych.

Piśmiennictwo

- Alessandria V., Giacosa S., Campolongo S., Rolle L., Rantsiou K., Coccolin L.: Yeast population diversity on grapes during on-vine withering and their dynamics in natural and inoculated fermentations in the production of icewines. *Food Res. Int.* **54**, 139–147 (2013)
- Barata A., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V.: The microbial ecology of wine grape berries. *Int. J. Food Microbiol.* **153**, 243–259 (2012)
- Bonnefond L., Arai T., Sakaguchi Y., Suzuki T., Ishitani R., Nureki O.: Structural basis for nonribosomal peptide synthesis by an aminoacyl-tRNA synthetase paralog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 3912–3917 (2011)
- Bourdichon F., Hansen E.B. i wsp.: Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *Int. J. Food Microbiol.* **154**, 87–97 (2012)
- Comitini F., Gobbi M., Domizio P., Romani C., Lencioni L., Mannazzu I., Ciani M.: Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* **28**, 873–882 (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. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 4951–4959 (2005)
- Contreras A., Curtin C., Varela C.: Yeast population dynamics reveal a potential “collaboration” between *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum* for the production of reduced alcohol wines during Shiraz fermentation. *Appl. Microbiol. Biot.* **99**, 1885–1895 (2015)
- Cook A.H., Slater C.A.: Metabolism of „wild” yeasts I. The chemical Nature of pulcherrimin. *J.I. Brewing.* **60**, 213–217 (1954)
- Csutak O., Vassu T., Grebenişan I., Cornea P.: *Metschnikowia pulcherrima*, antifungal biocontrol agent taxonomic classification, morpho-physiological and genetic aspects, antifungal action. *Bacteriol. Virusol. Parazit. Epidemiol.* **52**, 129–138 (2007)
- Csutak O., Sarbu I., Vassu T.: Influence of sodium bicarbonate, calcium chloride and growth media on antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima*. *J. Food Sci. Eng.* **3**, 79–86 (2013)
- Demain A.L., Phaff H.J., Kurtzman C.P.: The instruction and agricultural significance of yeasts (w) The Yeasts. A taxonomic study, red. C.P. Kurtzman, J.W. Fell, Elsevier, London, 1998, s. 13–19
- Duffy M.A.: Selective predation, parasitism, and trophic cascades in a bluegill-*Daphnia*-parasite system. *Oecologia*, **153**, 453–460 (2007)
- Ebert D., Zschokke-Rohringer C.D., Carius H.J.: Dose effects and density-dependent regulation of two microparasites of *Daphnia magna*. *Oecologia*, **122**, 200–209 (2000)
- European Food Safety Authority: Public consultations planner, <http://www.efsa.europa.eu/en/consultations/consultationsplanner> (28.01.2017)
- Fernández-Espinar M.T., Martorell P., de Llanos R., Querol A.: Molecular methods to identify and characterize yeasts in foods and beverages (w) Yeast in food and beverages, red. A. Querol, G.H. Fleet, Springer, Berlin Heidelberg, 2016, s. 55–82
- Fischer M.J., Pensec F., Demangeat G., Farine S., Chong J., Ramírez-Suero M., Mazet F., Bertsch C.: Impact of *Quillaja saponaria* saponins on grapevine ecosystem organisms. *Anton. Leeuw. Int. J.G.* **100**, 197–206 (2011)
- Fleet G.H.: Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res.* **8**, 979–995 (2008)
- Giménez-Jurado G., Valderrama M.J., Sá-Nogueira I., Spencer-Martins I.: Assessment of phenotypic and genetic diversity in the yeast genus *Metschnikowia*. *Anton. Leeuw. Int. J.G.* **68**, 101–110 (1995)
- González-Pombo P., Pérez G., Carrau F., Guisán J.M., Batista-Viera F., Brena B.M.: One-step purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Metschnikowia pulcherrima*. *Biotechnol. Lett.* **30**, 1469–1475 (2008)
- Grzegorzczak M., Szalewicz A., Żarowska B., Połomska X., Wątopek W., Wojtatowicz M.: Drobnoustroje w biologicznej

- ochronie roślin przed chorobami grzybowymi. *Acta Sci. Pol. Biotechnologia*, **14**, 19–42 (2015)
21. Guzmán B., Lachance M.A., Herrera C.M.: Phylogenetic analysis of the angiosperm-floricolous insect-yeast association: have yeast and angiosperm lineages co-diversified? *Mol. Phylogenet. Evol.* **68**, 161–175 (2013)
 22. Hui F.L., Chen L., Li Z.H., Niu Q.H., Ke T.: *Metschnikowia henaensis* sp. nov., a new anamorphic yeast species isolated from rotten wood in China. *Anton. Leeuw. Int. J.G.* **103**, 899–904 (2013)
 23. Index Fungorum, <http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp> (25.01.2017)
 24. Janisiewicz W.J., Tworowski T.J., Kurtzman C.P.: Biocontrol potential of *Metschnikowia pulcherrima* strains against blue mold of apple. *Phytopathology*, **91**, 1098–1108 (2001)
 25. Jolly N.P., Augustyn O.P.H., Pretorius I.S.: The use of *Candida pulcherrima* in combination with *Saccharomyces cerevisiae* for the production of Chenin blanc wine. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **24**, 63–69 (2003)
 26. Kluyver A.J., van der Walt J.P., van Triet A.J.: Pulcherrimin, the pigment of *Candida pulcherrima*. *P. Natl. Acad. Sci USA*, **39**, 583–593 (1953)
 27. Kuan C.S., Ng K.P. i wsp.: Isolation and characterization of an atypical *Metschnikowia* sp. strain from the skin scraping of a dermatitis patient. *PLoS ONE*, **11**, e0156119 (2016)
 28. Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout, T.: Gene sequence analyses and other DNA-based method for yeast species recognition (w) The Yeasts. A taxonomic study, red. C.P. Kurtzman, J.W. Fell, T. Boekhout, Elsevier, London, 2011, s. 137–144
 29. Kurtzman C.P., Robnett C.J.: Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Anton. Leeuw. Int. J.G.* **73**, 331–371 (1998)
 30. Lachance M.A.: *Metschnikowia* Kamienski (1899) (w) The Yeasts. A taxonomic study, red. C.P. Kurtzman, J.W. Fell, T. Boekhout, Elsevier, London, 2011, s. 575–620
 31. Lachance M.A.: *Metschnikowia*: half tetrads, a regicide and the fountain of youth. *Yeast*, **33**, 563–574 (2016)
 32. Lachance M.A., Bowles J.M., Starmer W.T.: *Metschnikowia santaciliae*, *Candida hawaiiensis*, and *Candida kipukae*, three new yeast species associated with insects of tropical morning glory. *FEMS Yeast Res.* **3**, 97–103 (2003)
 33. Lachance M.A., Hurtado E., Hsiang T.: A stable phylogeny of the large-spored *Metschnikowia* clade. *Yeast*, **33**, 261–275 (2016)
 34. Lachance M.A., Lawrie D., Dobson J., Piggott J.: Biogeography and population structure of the Neotropical endemic yeast species *Metschnikowia lochheadii*. *Anton. Leeuw. Int. J.G.* **94**, 403–414 (2008)
 35. Lachance M.A., Starmer W.T., Rosa C.A., Bowles J.M., Barker J.S.F., Janzen D.H.: Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects. *FEMS Yeast Res.* **1**, 1–8 (2001)
 36. Liu P.T., Lu L., Duan C.Q., Yan G.L.: The contribution of indigenous non-*Saccharomyces* wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet Sauvignon wines by spontaneous fermentation. *LWT – Food Sci. Technol.* **71**, 356–363 (2016)
 37. Macarisin D., Droby S., Bauman G., Wisniewski M.: Superoxide anion and hydrogen peroxide in the yeast antagonist-fruit interaction: a new role for reactive oxygen species in postharvest biocontrol? *Postharvest Biol. Tec.* **58**, 194–202 (2010)
 38. MacWilliam I.C.: A survey of the antibiotic powers of yeasts. *J. Gen. Microbiol.* **21**, 410–414 (1959)
 39. Manso T., Nunes C., Lima-Costa M.: Growth kinetics of the biocontrol agent *Metschnikowia andauensis* PBC-2 in submerged batch cultures. *Int. J. Res. Agric. Food Sci.* **2**, 1–14 (2014)
 40. Martínez E.J., Raghavan V., Ganzález-Andrés F., Gómez X.: New biofuel alternatives: integrating waste management and single cell oil production. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 9385–9405 (2015)
 41. Melvydas V., Staneviciene R., Balynaite A., Vaiciuniene J., Garjonyte R.: Formation of self-organized periodic patterns around yeasts secreting a precursor of a red pigment. *Microbiol. Res.* **193**, 87–93 (2016)
 42. Mendonça-Hagler L.C., Hagler A.N., Kurtzman C.P.: Phylogeny of *Metschnikowia* species estimated from partial rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 368–373 (1993)
 43. Metschnikoff V.E.: Über eine Sprosspilzkrankheit der Daphnien Beitrag zur Lehre über den Kampf der Phagocyten gegen Krankheitserreger. *Arch. Pathol. Anat. Ph.* **96**, 177–195 (1884)
 44. Miller, M.W., Phaff H.J.: *Metschnikowia* Kamienski (w) The Yeasts. A taxonomic study, red. C.P. Kurtzman, J.W. Fell, Elsevier, London, 1998, s. 256–267
 45. Molnár O., Prillinger H.: Analysis of yeast isolates related to *Metschnikowia pulcherrima* using the partial sequences of the large subunit rDNA and the actin gene; description of *Metschnikowia andauensis* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **28**, 717–726 (2005)
 46. Moore M.M., Strom M.S.: Infection and mortality by the yeast *Metschnikowia bicuspidata* var. *bicuspidata* in chinook salmon fed live adult brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Aquaculture*, **220**, 43–57 (2003)
 47. Muccilli S., Restuccia C.: Bioprotective role of yeasts. *Microorganisms*, **3**, 588–611 (2015)
 48. Naumov G.I., 2011. Molecular and genetic differentiation of small-spored species of the yeast genus *Metschnikowia* Kamienski. *Microbiology*, **80**, 135–142 (2011)
 49. de Oliveira-Santos A.R., Perri A.M., da Graça Stuppiello Andrietta M., Rosa C.A., Lachance M.A.: 2015. The expanding large-spored *Metschnikowia* clade: *Metschnikowia matae* sp. nov., a yeast species with two varieties from the Brazilian Atlantic Forest. *Anton. Leeuw. Int. J.G.* **108**, 753–763 (2015)
 50. Oro L., Ciani M., Comitini F.: Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* **116**, 1209–1217 (2014)
 51. Padilla B., Gil J.V., Manzanares P.: Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: from spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Front. Microbiol.* **7**, 411 (2016)
 52. Péter G., Tornai-Lehoczi J., Suzuki M., Dlačny D.: *Metschnikowia viticola* sp. nov., a new yeast species from grape. *Anton. Leeuw. Int. J.G.* **87**, 155–160 (2005)
 53. Pitt J.I., Miller M.W.: Speciation in the yeast genus *Metschnikowia*. *Anton. Leeuw. Int. J.G.* **36**, 357–381 (1970)
 54. Reid V.J., Theron L.W., du Toit M., Divol B.: Identification and partial characterization of extracellular aspartic protease genes from *Metschnikowia pulcherrima* IWB T Y1123 and *Candida apicola* IWB T Y1384. *Appl. Environ. Microb.* **78**, 6838–6849 (2012)
 55. Sadineni V., Kondapalli N., Obulam V.S.R.: Effect of co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima* on the aroma and sensory properties of mango wine. *Ann. Microbiol.* **62**, 1353–1360 (2012)
 55. Santamauro F., Whiffin F.M., Scott R.J., Chuck C.J.: Low-cost lipid production by an oleaginous yeast cultured in non-sterile conditions using model waste resources. *Biotechnol. Biofuels*, **7**, 34 (2014)
 57. Saravanakumar D., Ciavarella A., Spadaro D., Garibaldi A., Gullino M.L.: *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 outcompetes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. *Postharvest Biol. Tec.* **49**, 121–128 (2008)

58. Seino M.M., de Vega C., Bazaga P., Pozo M.I., Herrera C.M.: Development and characterization of microsatellite loci for the nectar-living yeast *Metschnikowia reukaufii*. *Mol. Ecol. Resour.* **13**, 760–762 (2013)
59. Sharma R.R., Singh D., Singh R.: Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biol. Control*, **50**, 205–221 (2009)
60. Sipiczki M.: *Metschnikowia* strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion. *Appl. Environ. Microb.* **72**, 6716–6724 (2006)
61. Sipiczki M., Pfliegler W.P., Holb I.J.: *Metschnikowia* species share a pool of diverse rRNA genes differing in regions that determine hairpin-loop structures and evolve by reticulation. *PLoS ONE*, **8**, e67384 (2013)
62. Spadaro D., Lorè A., Garibaldi A., Gullino M.L.: A new strain of *Metschnikowia fructicola* for postharvest control of *Penicillium expansum* and patulin accumulation on four cultivars of apple. *Postharvest Biol. Tec.* **75**, 1–8 (2013)
63. Spadaro D., Vola R., Piano S., Gullino M.L.: Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biol. Tec.* **24**, 123–134 (2002)
64. Starmer W.T., Fogleman J.C., Lachance M.A.: The yeast community of cacti (w) Microbial ecology of leaves. red. J.H. Andrews, S.S. Hirano, Springer, New York, 1991, s. 158–178
65. Strauss M.L., Jolly N.P., Lambrechts M.G., van Rensburg P.: Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* **91**, 182–190 (2001)
66. Türkel S., Korukluoğlu M., Yavuz M.: Biocontrol Activity of the local strain of *Metschnikowia pulcherrima* on different postharvest pathogens. *Biotechnol. Res. Int.* **2014**, 397167 (2014)
67. van Uden N., Castelo-Branco R.: *Metschnikowiella zobellii* sp. nov. and *M. krissii* sp. nov., two yeasts from the Pacific Ocean pathogenic for *Daphnia magna*. *J. Gen. Microbiol.* **26**, 141–148 (1961)
68. Uffen R.L., Canale-Parola E.: Synthesis of pulcherriminic acid by *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **111**, 86–93 (1972)
69. Valles B.S., Bedriñana R.P., Tascón N.F., Simón A.Q., Madrera R.R.: Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiol.* **24**, 25–31 (2007)
70. Varela C., Sengler F., Solomon M., Curtin C.: Volatile flavour profile of reduced alcohol wines fermented with the non-conventional yeast species *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. *Food Chem.* **209**, 57–64 (2016)
71. Wisniewski M., Wilson C., Droby S., Chalutz E., El-Ghauth A., Stevens C.: Postharvest biocontrol: new concepts and applications (w) Biological control: a global perspective, red. C. Vincent, M.S. Goettel, G. Lazarovitz, CABI, Wallingford, 2007, s. 262–273
72. Yamada Y., Nagahama T., Banno I.: The phylogenetic relationships among species of the genus *Metschnikowia kamienski* and its related genera based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs (*Metschnikowiaceae*). *Bulletin of the Faculty of Agriculture – Shizuoka University*, **44**, 9–20 (1995)
73. Yaman M., Radek R.: Identification, distribution and occurrence of the ascomycete *Metschnikowia typographi* in the great spruce bark beetle, *Dendroctonus micans*. *Folia Microbiol.* **53**, 427–432 (2008)

Katarzyna Ratajczak*, Agnieszka Piotrowska-Cyplik

Zakład Fermentacji i Biosyntezy, Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego,
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Wpłynęło w kwietniu, zaakceptowano we wrześniu 2017 r.

1. Wstęp. 2. Bakterie kwasu mlekowego. 2.1. Homofermentacja. 2.2. Heterofermentacja. 3. Metabolity bakterii kwasu mlekowego. 3.1. Kwasy organiczne. 3.2. Diacetyl. 3.3. Nadtlenek wodoru. 3.4. Dwutlenek węgla. 3.5. Bakteriocyliny. 3.5.1. Charakterystyka bakteriocylin. 3.5.2. Klasyfikacja bakteriocylin. 3.5.3. Problemy w zastosowaniu bakteriocylin w przemyśle spożywczym. 4. Podsumowanie

Metabolites of lactic acid bacteria – overview and industrial applications

Abstract: Lactic acid bacteria are one of the most commonly found microorganisms in food. One of the reasons behind their popularity are their probiotic properties. Lactic acid bacteria produce a wide range of metabolites which often find use as antimicrobial agents or preservatives. The efficacy and efficiency of these compounds are vastly different. The most promising group of lactic acid bacteria metabolites are bacteriocins. However, there are crucial issues with the application of bacteriocins in the food industry. The goal of this study was to provide an overview of the lactic acid bacteria metabolites most commonly used in industry.

1. Introduction. 2. Lactic acid bacteria. 2.1. Homofermentation. 2.2. Heterofermentation. 3. Metabolites of lactic acid bacteria. 3.1. Organic acids. 3.2. Diacetyl. 3.3. Hydrogen peroxide. 3.4. Carbon dioxide. 3.5. Bacteriocins. 3.5.1. Characteristics of bacteriocins. 3.5.2. Classification of bacteriocins. 3.5.3. Issues with the application of bacteriocins in the food industry. 4. Conclusion

Słowa kluczowe: bakterie kwasu mlekowego, fermentacja mlekowa, probiotyki

Key words: lactic acid bacteria, lactic fermentation, probiotics

1. Wstęp

Jednymi z najczęściej stosowanych w przemyśle spożywczym mikroorganizmów są bakterie kwasu mlekowego (tzw. LAB, od Lactic Acid Bacteria), głównie z rodzaju *Lactobacillus*, oraz bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*. Wśród nich wyróżnia się szczepy określane mianem probiotyków, czyli żywych drobnoustrojów, które podane w odpowiedniej dawce pozytywnie wpływają na zdrowie człowieka lub zwierząt [10]. Właściwości probiotyczne są cechą szczepową. Tylko nieliczne szczepy mają potwierdzone właściwości probiotyczne, niektóre można określić jako potencjalnie probiotyczne, ale też duża część stosowanych w przemyśle szczepów posiada cechy istotne technologicznie i nie wykazano dla nich korzystnego wpływu na zdrowie. Bakterie LAB znajdują zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu spożywczego, a także innych obszarach dziedziny biotechnologii, dzięki bardzo szerokiej gamie metabolitów przez nie produkowanych, pozwalających również na wytwarzanie tzw. żywności funkcjonalnej m.in. o cechach probiotycznych. Jednakże zastosowanie bakterii probiotycznych wymaga wcześniejszej identyfikacji i charakterystyki szczepu wykazującego pożądane właściwości, potwierdzenia korzystnego wpływu na zdrowie oraz zapewnienia bezpieczeństwa produktu końcowego.

Działanie probiotyków jest zróżnicowane i wielokierunkowe. Mogą one wpływać zarówno na wzmocnienie naturalnej odpowiedzi immunologicznej organizmu (immunomodulacji), jak i na obniżenie poziomu cholesterolu oraz poprawę perystaltyki jelit. Niektóre z probiotycznych szczepów produkują enzymy pozwalające na zwiększenie biodostępności i strawności żywności. Za jeden z najważniejszych efektów działań mikroorganizmów probiotycznych można jednak uznać inhibicję rozwoju patogenów [19, 31, 33].

W rzeczywistości właściwości probiotyczne poszczególnych drobnoustrojów są jednak trudne do jednoznacznej oceny. Różne szczepy tego samego gatunku bakterii nie wykazują identycznych właściwości probiotycznych. Ponadto właściwości probiotyczne obserwuje się tylko u wybranych szczepów. Nierzadko zmieniają się one w zależności od obecności innych drobnoustrojów w środowisku. Duży wpływ na właściwości probiotyczne ma też dawka oraz użyty nośnik [19]. Badania wykazały, że *Lactobacillus johnsonii* La1 pozytywnie wpływa na regenerację funkcji obronnych skóry wystawionej na działanie promieni UV, natomiast *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 przyczynia się do obniżenia poziomu cholesterolu we krwi dzięki produkcji enzymów hydrolizujących sole żółciowe [16, 26]. Z kolei inny szczep *L. reuteri*, DSM17938, regu-

* Autor korespondencyjny: Katarzyna Ratajczak, Zakład Fermentacji i Biosyntezy, Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań; tel. 61 848 72 81; e-mail: katarzyna.ratajczak@up.poznan.pl

luje perystaltykę jelit i zapobiega występowaniu kolki u małych dzieci [27].

Ze stosowaniem probiotyków wiąże się też pewne niebezpieczeństwa. Niektóre gatunki bakterii *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* wchodzi w skład naturalnej mikroflory jelitowej i na tej podstawie zostały sklasyfikowane jako bezpieczne do spożycia. Trudno jednak przewidzieć skutki, jakie może pociągać za sobą interakcja między probiotykami a mikroorganizmami obecnymi już w organizmie człowieka. Stąd też konieczne są zaawansowane badania dotyczące identyfikacji i analizy profilu genetycznego probiotyków, a także ich dawkowania [21].

Głównym naturalnym źródłem bakterii potencjalnie probiotycznych jest żywność fermentowana, w tym fermentowane produkty mleczne takie jak sery, jogurt czy kefir, dojrzewające wędliny i kielbasy oraz kiszone warzywa, np. ogórki, kapusta i oliwki. Coraz bardziej powszechna staje się również wspomnianą żywność funkcjonalna, tj. charakteryzująca się właściwościami prozdrowotnymi dzięki dodatkowi probiotyków, prebiotyków lub innych substancji wpływających na organizm człowieka. Żywność fermentowana, naturalnie bogata w mikroflorę potencjalnie probiotyczną, jest naturalnym i łatwym nośnikiem probiotyków [13]. Mimo że największą popularnością cieszą się fermentowane produkty mleczne, w ostatnich latach wzrosło zainteresowanie także fermentowaną żywnością pochodzenia roślinnego, szczególnie w obliczu coraz częściej występujących w społeczeństwie alergii i nietolerancji laktozy [11].

W niniejszej pracy zebrano oraz scharakteryzowano wybrane metabolity bakterii kwasu mlekowego wykorzystywanych w przemyśle spożywczym w procesach fermentacji mlekowej.

2. Bakterie kwasu mlekowego

Bakterie kwasu mlekowego (LAB) to najczęściej Gram-dodatnie, nieprzetrwalnikujące pałeczki lub ziarniaki, wytwarzające kwas mlekowy jako główny produkt fermentacji glukozy i innych cukrów prostych. Do mikroorganizmów typu LAB zaliczane są bakterie z rzędu *Lactobacillales*, z rodzajów *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* i *Streptococcus*, a także bakterie z rodzajów *Carnobacterium*, *Vagococcus*, *Enterococcus* i *Weisella* [22]. Obecnie większość komercyjnie używanych bakterii probiotycznych należy do rodzaju *Lactobacillus*. Do najpopularniejszych gatunków należą *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. plantarum* oraz *L. rhamnosus* [20, 30]. Bakteriami dominującymi podczas fermentacji żywności pochodzenia roślinnego (wśród wyżej wymienionych) są *L. plantarum*, *L. brevis* oraz *Leuconostoc mesenteroides* [3].

Cechą wspólną wszystkich bakterii mlekowych jest konwersja cukrów prostych do kwasu mlekowego oraz innych produktów ubocznych, takich jak dwutlenek węgla, etanol i kwas octowy. Fermentacja mlekowa jest jednym z najważniejszych procesów wykorzystywanych w technologii żywności. Służy zarówno utrwaleniu i zakonserwowaniu artykułów spożywczych, jak i zapewnieniu odpowiednich walorów smakowych [1, 3]. Ze względu na obecność lub brak produktów ubocznych fermentacji, bakterie mlekowe dzieli się na dwie grupy: przeprowadzające homofermentację bądź heterofermentację mlekową.

2.1. Homofermentacja

W warunkach beztlenowych homofermentatywnie bakterie LAB przetwarzają heksozy (głównie glukozę) do kwasu mlekowego według szlaku Embdena-Meyerhofa-Parnasa (EMP). W reakcji tej 1 mol glukozy rozkładany jest do 2 moli pirogronianu. Następnie dochodzi do jednoczesnej redukcji pirogronianu i utlenienia NADH, w wyniku czego otrzymuje się 2 mole kwasu mlekowego i 2 mole ATP. Podczas dekarboksylacji pirogronianu wytwarzane są także niewielkie ilości produktów ubocznych, głównie dwutlenku węgla. Do bakterii homofermentatywnych zalicza się większość rodzajów *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* i *Streptococcus*, a także znaczną część *Lactobacillus* [17, 29].

2.2. Heterofermentacja

Heterofermentatywny rozkład cukrów prostych przebiega według szlaku pentozofosforanowego. W wyniku tego procesu z 1 mola glukozy powstaje 1 mol kwasu mlekowego oraz 1 mol etanolu, a także produkty uboczne, takie jak dwutlenek węgla, etanol i kwas octowy. Do heterofermentatywnych bakterii zalicza się bakterie z rodzajów *Leuconostoc* oraz *Lactobacillus*. Heterofermentacja jest efektem braku niektórych enzymów kluczowych dla procesu homofermentacji, w tym między innymi aldolazy i izomerazy trifosforanowej [17, 29].

3. Metabolity bakterii kwasu mlekowego

Bakterie mlekowe produkują bardzo zróżnicowaną gamę związków chemicznych, które mogą wpływać na organizm człowieka w różnoraki sposób [29].

Z punktu widzenia biotechnologii, za jedną z najciekawszych właściwości bakterii probiotycznych uznawana jest produkcja metabolitów, które w sposób pośredni lub bezpośredni wpływają na inne mikroorganizmy (w tym patogenne) oraz na organizm gospodarza. Ponadto mikroorganizmy probiotyczne współzawodniczą o substancje odżywcze i miejsca receptorowe

z drobnoustrojami patogennymi oraz stymulują odpowiedź obronną organizmu, m.in. poprzez syntezę niektórych witamin (głównie z grupy B) oraz stymulację produkcji śluzu [9].

Metabolity produkowane przez bakterie mlekowe stanowią zróżnicowaną grupę substancji zarówno organicznych, jak i nieorganicznych. Najważniejsze z nich omówiono poniżej.

3. Kwasy organiczne

Kwas mlekowy, octowy i propionowy są produktami homo- i heterofermentacji mlekowej prowadzonej przez bakterie LAB. Najsilniejszymi właściwościami hamującymi rozwój drobnoustrojów charakteryzuje się kwas octowy. Skutecznie hamuje on wzrost bakterii, pleśni i drożdży. Działanie kwasów organicznych w znacznym stopniu polega na obniżaniu pH środowiska do poziomu niekorzystnego dla patogenów, a także na zaburzaniu procesów metabolicznych zachodzących w komórkach drobnoustrojów oraz transportu aktywnego przez błony komórkowe [20]. Za spadek pH środowiska w obecności bakterii mlekowych odpowiedzialny jest głównie kwas mlekowy, natomiast kwas octowy i propionowy są związkami wykazującymi dodatkowo aktywność antymikrobiologiczną [9].

3.2. Diacetyl

Diacetyl jest lotnym, niepolarnym diketonem powstającym z rozkładu pirogronianu, odpowiedzialnym za charakterystyczny aromat masła. Wytwarzany jest przez niektóre szczepy *Lactobacillus*, *Leuconostoc* oraz *Streptococcus*. Wykazuje właściwości bakteriobójcze względem niektórych Gram-ujemnych bakterii poprzez inaktywację szlaku metabolicznego argininy. Dowiedziono, że podczas równoczesnego działania z niziną diacetyl skutecznie hamuje wzrost *Listeria monocytogenes*. Jednak w naturalnych warunkach wzrostu bakterii mlekowych diacetyl produkowany jest w bardzo niewielkich ilościach [15, 22].

3.3. Nadtlenek wodoru

W warunkach tlenowych bakterie mlekowe produkują nadtlenek wodoru (H_2O_2) w wyniku działania oksydazy flawoproteinowej oraz peroksydazy NADH. Związek ten posiada silne właściwości antymikrobiologiczne, polegające na denaturacji enzymów komórkowych i peroksydacji lipidów błonowych, tym samym prowadząc do zaburzenia czynności błon komórkowych oraz zatrzymania wielu szlaków metabolicznych. Nadtlenek wodoru jest toksyczny także dla samych bakterii mlekowych i najczęściej ulega szybkiemu wydzielaniu do środowiska. Wykazano, że H_2O_2 wytwarzany

przez bakterie LAB posiada właściwości bakteriobójcze przeciwko niektórym mikroorganizmom patogennym, w tym *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* i *Salmonella typhimurium* [22]. Dowiedziono, że *L. delbrueckii* subsp. *lactis* produkuje nadtlenek wodoru na poziomie pozwalającym na inaktywację *Escherichia coli* O157:H7 w warunkach chłodniczych [4].

3.4. Dwutlenek węgla

Dwutlenek węgla (CO_2) jest jednym z produktów ubocznych heterofermentacji mlekowej. Powstaje również w trakcie innych przemian metabolicznych bakterii. Dwutlenek węgla wykazuje działanie bakteriobójcze, szczególnie przeciwko bakteriom Gram-ujemnym, za pomocą dwóch mechanizmów. Pierwszym jest wytwarzanie środowiska beztlenowego, w którym wiele mikroorganizmów nie posiada zdolności wzrostu. Drugi mechanizm nie jest jeszcze całkowicie poznany, natomiast wiadomo, że związany jest z zaburzaniem przepuszczalności błon komórkowych oraz zatrzymaniem procesów dekarboksylacji w komórkach [25].

Dzięki swojej nietoksyczności względem organizmu człowieka, CO_2 jest coraz częściej stosowany w zabezpieczaniu żywności przed psuciem, poprzez pakowanie jej w atmosferze modyfikowanej (tj. o znacznym udziale CO_2) [8].

3.4. Bakteriocyny

Bakteriocyny są substancjami o charakterze białkowym lub peptydowym, syntetyzowanymi przez większość szczepów bakterii, zarówno Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych. Stanowią one grupę związków silnie zróżnicowaną pod względem właściwości fizycznych i biochemicznych, masy cząsteczkowej, a nawet lokalizacji i sekwencji genów kodujących. Synteza bakteriocyn ma miejsce w rybosomach, a bakteriocynogenne mikroorganizmy są odporne na wytwarzane przez siebie substancje. Są to cechy, które między innymi odróżniają bakteriocyny od antybiotyków [12, 25].

3.5.1. Charakterystyka bakteriocyn

Bakteriocyny posiadają najczęściej stosunkowo wąskie spektrum aktywności antymikrobiologicznej. Najskuteczniej działają względem mikroorganizmów blisko spokrewnionych z wytwarzającymi je producentami. Bakteriocyny mogą działać bakteriostatycznie bądź bakteriobójczo, najczęściej atakując błonę komórkową mikroorganizmów i zakłócając wewnętrzny metabolizm ich komórek [12].

Dopuszczenie do użycia w przemyśle spożywczym zawdzięcza szeregowi cech, które zapewniają bezpieczeństwo ich stosowania [14]. Bakteriocyny, jako sub-

stancje peptydowe, ulegają rozkładowi przez enzymy proteolityczne w układzie trawiennym człowieka do nieszkodliwych i łatwo wchłanianych aminokwasów. Związki te, podawane z żywnością, stanowią dla organizmu człowieka część odżywczą, nie wykazują natomiast wobec niego żadnego wpływu farmakologicznego. Ponadto bakteriocyny są substancjami pozbawionymi smaku oraz zapachu, przez co w żaden sposób nie ingerują we właściwości organoleptyczne produktu. Wykazują natomiast wysoką stabilność w trakcie przechowywania oraz w szerokim zakresie pH, a także są odporne na działanie wysokich temperatur. Jednak wciąż trwają poszukiwania nad bakteriocyną, która w małym stężeniu wykazywałaby aktywność biobójczą względem najczęstszych drobnoustrojów powodujących psucie żywności oraz patogenów [2, 23].

Aktualnie do użytku komercyjnego dopuszczone są dwie bakteriocyny: nizyna produkowana przez *Lactococcus lactis* oraz karnocyklina A produkowana przez *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307. Bakteriocyny nie muszą jednak być dodawane do żywności jako czyste preparaty, które wymagają akceptacji Światowej Organizacji Zdrowia (WHO). Zamiast nich można stosować bakteriocynogenne mikroorganizmy – przede wszystkim bakterie LAB. Jest to metoda szczególnie łatwa do zastosowania w przypadku żywności fermentowanej, do wyrobu której można wykorzystać wyselekcjonowane kultury starterowe zawierające bakteriocynogenne drobnoustroje. W przypadku żywności niefermentowanej (w tym surowych produktów żywnościowych) stosować można tzw. kultury ochronne [7, 24, 28].

3.5.2. Klasyfikacja bakteriocyn

Bakteriocyny bakterii Gram-dodatnich, w tym bakterii kwasu mlekowego, zostały podzielone przez Klaenhammera w 1993 roku na cztery główne klasy. Klasyfikacja ta opiera się na zróżnicowaniu budowy chemicznej, masy cząsteczkowej oraz mechanizmu działania bakteriocyn. W obrębie głównych klas wyróżnia się także podklasy [18].

Klasę I stanowią bakteriocyny lantybiotykowe, zawierające w swojej cząsteczce rzadki aminokwas lantioninę lub jej pochodne. Są to niewielkie (masa cząsteczkowa nie przekracza 5 kDa), termostabilne peptydy. Bakteriocyny te dzieli się na dwie podgrupy: lantybiotyki typu A i lantybiotyki typu B. Lantybiotyki typu A to cząsteczki liniowe, wpływające na przepuszczalność błony komórkowej atakowanych komórek, natomiast lantybiotyki typu B to cząsteczki globularne o różnych mechanizmach działania, np. inhibicja enzymów komórkowych bądź destabilizacja błony komórkowej. Najlepiej poznanym lantybiotykiem jest nizyna, wykazująca aktywność bakteriobójczą względem m.in. *S. aureus* i *L. monocytogenes*, oraz aktywność bakterio-

statyczną względem bakterii z rodzajów *Clostridium* oraz *Bacillus* [12, 22].

Bakteriocyny należące do klasy II to małe (masa cząsteczkowa poniżej 10 kDa), termostabilne peptydy charakteryzujące się wysokim punktem izoelektrycznym, często określane mianem bakteriocyn nielantybiotykowych. Ich działanie jest skuteczne głównie względem bakterii Gram-dodatnich o niskiej zawartości par G+C, m.in. względem rodzajów *Listeria* oraz *Clostridium*, ale także większości bakterii LAB. Klasę II dzieli się na cztery podgrupy. Klasa IIa to tzw. bakteriocyny pediocynopodobne, o bardzo silnym działaniu antibakteryjnym względem *L. monocytogenes*. Bakteriocyny te działają poprzez permeabilizację błony komórkowej wrażliwych komórek. Ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne oraz silne działanie antymikrobiologiczne jest to najchętniej badana ze wszystkich klas. Klasa IIb to bakteriocyny dipeptydowe, wymagające komplementarnego działania obu peptydów. Substancje te działają bakteriostatycznie względem niektórych bakterii Gram-dodatnich, szczególnie z rodzaju *Enterococcus*. Ich mechanizm działania polega na tworzeniu kanałów w błonie komórkowej oraz destabilizacji równowagi jonowej komórek atakowanych bakterii. Klasa IIc zawiera w sobie bakteriocyny o budowie globularnej, dzięki której zyskują odporność na działanie niektórych proteaz i peptydaz. Bakteriocyny te różnią się od pozostałych również mechanizmem sekrecji z komórki producenta. Związki te wydzielane są za pomocą białkowego systemu sekrecyjnego, bez użycia transporterów ABC i peptydu sygnałnego. W ostatnich latach stworzona została dodatkowa podgrupa, klasa IId, obejmująca bakteriocyny znacznie odbiegające budową cząsteczkową, a także mechanizmem sekrecji i działania od pozostałych bakteriocyn nielantybiotykowych [5, 12, 22].

Klasę III stanowią termolabilne bakteriocyny o dużej masie cząsteczkowej (powyżej 30 kDa). Ich mechanizm działania nie został jeszcze dokładnie poznany, jednak istotną jego cechą jest fakt, iż nie uszkadzają one błony komórkowej wrażliwych komórek. Substancje te są syntetyzowane przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus* oraz *Enterococcus* [12, 22].

Słabo poznane są również bakteriocyny należące do klasy IV, nazywane często bakteriocynami kompleksowymi. Białka te do uzyskania pełnej aktywności antibakteryjnej wymagają obecności grupy lipidowej lub węglowodanowej w cząsteczce [12, 22].

3.5.3. Problemy w zastosowaniu bakteriocyn w przemyśle spożywczym

W przemyśle spożywczym bakteriocyny znajdują zastosowanie jako naturalne konserwanty, zapewniające bioprezerwację żywności. Podstawowym problemem

związany z ich użyciem w przetwórstwie jest ich niestabilność. Bakteriocyny łatwo dyfundują do wnętrza produktów żywnościowych, gdzie ulegają rozkładowi bądź inaktywacji. Mogą też wywoływać rozdział frakcji tłuszczowej w samym produkcie spożywczym. Ponadto rzeczywista aktywność antymikrobiologiczna bakteriocyn jest niższa niż uzyskiwana w warunkach laboratoryjnych, co skutkuje koniecznością zastosowania wyższych stężeń konserwantu. Również w przypadku użycia kultur bakteriocynogennych mikroorganizmów pojawia się problem utraty zdolności do syntezy bakteriocyn, lub też jej silnego ograniczenia w wyniku wystąpienia niekorzystnych warunków środowiskowych. Odpowiedzią na wszystkie te problemy jest opracowywanie innowacyjnych technologii aplikacji bakteriocyn. W ostatnich latach badania pozwoliły na uzyskanie biofilmów powlekanych bakteriocynami, których można użyć do pakowania żywności, a także mikrokapsulek żelowych zapewniających wyższą stabilność i aktywność tych substancji [6, 7].

4. Podsumowanie

Bakterie kwasu mlekowego produkują szeroką gamę metabolitów bezpiecznych dla zdrowia konsumenta, a także efektywnie wpływających na przedłużenie trwałości artykułów spożywczych. Zastosowanie ich w miejsce syntetycznych konserwantów pozwala na uzyskanie produktów „naturalnych”, które zaspokajają coraz większe zapotrzebowanie konsumentów na żywność pozbawioną konserwantów chemicznych. Stąd też metabolity bakteryjne i ich właściwości są obiektami licznych badań. Związkami o największej aktywności antymikrobiologicznej są bakteriocyny. Możliwości stosowania tych substancji, zarówno jako biokonserwantów, jak i prozdrowotnych dodatków do żywności, są ogromne. Jednak nadal wymagają one prac optymalizacyjnych pozwalających na zapewnienie wysokiej efektywności działania.

Piśmiennictwo

- Adams M., Mitchell R.: Fermentation and pathogen control: a risk assessment approach. *Int. J. Food Microbiol.* **79**, 75–83 (2002)
- Barnby-Smith F.: Bacteriocins: applications in food preservation. *Trends Food Sci. Tech.* **3**, 133–137 (1992)
- Bednarski W., Reps A.: *Biotechnologia żywności*. Wyd. Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2003
- Brashears M.M., Reilly S.S., Gilliland S.E.: Antagonistic actions of cells of *Lactobacillus lactis* toward *Escherichia coli* O157:H7 on refrigerated raw chicken meat. *J. Food Protect.* **61**, 166–170 (1998)
- Cintas L.M., Casaus P., Fernandez M.F., Hernandez P.E.: Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiol.* **15**, 289–298 (1998)
- Daeschel M.A.: Applications and interactions of bacteriocins from lactic acid bacteria in foods and beverages (w) *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*, red. D.G. Hoover, L.R. Steenson, Elsevier, 1993, s. 61–93
- Deegan L.H., Cotter P.D., Hill C., Ross P.: Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* **16**, 1058–1071 (2006)
- Devlieghere F., Debevere J.: Influence of dissolved carbon dioxide on the growth of spoilage bacteria. *Lebensm. Wiss. Technol.* **33**, 531–537 (2000)
- Florou-Paneri P., Christaki E., Bonos E.: Lactic acid bacteria as source of functional ingredients (w) *Lactic Acid Bacteria – R & D for Food, Health and Livestock Purposes*, red. M. Kongo, InTech, Rijeka, 2013, s. 589–614
- Food and Agriculture Organization of the United States, World Health Organization: Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation, <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf> (2006)
- Granato D., Branco G.F., Cruz G., Faria J.F., Shah N.P.: Probiotic dairy products as functional foods. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **9**, 455–470 (2010)
- Gwiazdowska D., Trojanowska K.: Bakteriocyny – właściwości i aktywność przeciwdrobnoustrojowa. *Biotechnologia*, **68**, 114–130 (2005)
- Hurst R.D., Hurst S.M.: Fruits and vegetables as functional foods for exercise and inflammation (w) *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases*, red. R.R. Watson, V.R. Preedy, Academic Press, San Diego, 2012, s. 319–337
- Jack R.W., Tagg J.R., Ray B.: Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**, 171–200 (1995)
- Jay J.M.: Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microb.* **44**, 525–532 (1982)
- Jones M.L., Martoni C.J., Parent M., Prakash S.: Cholesterol-lowering efficacy of a microencapsulated bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 yoghurt formulation in hypercholesterolaemic adults. *Br. J. Nutr.* **107**, 1505–1513 (2012)
- Kandler O.: Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *A Van Leeuw. J. Microb.* **49**, 209–224 (1983)
- Klaenhammer T.R.: Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**, s. 39–86 (1993)
- Makinen K., Berger B., Bel-Rhlim R., Ananta E.: Science and technology for the mastership of probiotic applications in food products. *J. Biotechnol.* **162**, 356–365 (2012)
- Nowak A., Śliżewska K., Libudzisz Z.: Probiotyki – historia i mechanizmy działania. *Żywn. Nauka Technol. Jakość*, **71**, 5–19 (2010)
- Nowak A., Śliżewska K., Libudzisz Z., Socha J.: Probiotyki – efekty zdrowotne. *Żywn. Nauka Technol. Jakość*. **71**, 20–36 (2010)
- O'Bryan C.A., Crandall P.G., Ricke S.C., Ndahetuye J.B.: Lactic acid bacteria (LAB) as antimicrobials in food products: Analytical methods and applications (w) *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*, red. M. Taylor, Woodhead Publishing, Cambridge, 2014, s. 117–151
- O'Connor P.M., Ross R.P., Hill C., Cotter P.D.: Antimicrobial antagonists against food pathogens: a bacteriocin perspective. *Cur. Opin. Food Sci.* **2**, 51–57 (2015)
- O'Shea E.F., Cotter P.D., Ross R.P., Hill C.: Strategies to improve the bacteriocin protection provided by lactic acid bacteria. *Curr. Opin. Biotech.* **24**, 130–134 (2013)

25. Ouwehand A.C., Vesterlund S.: Antimicrobial components from lactic acid bacteria (w) *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, Third Edition, red. S. Salminen, A. von Wright, CRC Press, New York, 2004, s. 375–397
26. Peguet-Navarro J., Dezutter-Dambuyant C., Buetler T., Leclaire J., Smola H., Blum S., Bastien P., Breton L., Gueniche A.: Supplementation with oral probiotic bacteria protects human cutaneous immune homeostasis after UV exposure – double blind, randomized, placebo controlled clinical trial. *Eur. J. Dermatol.* **18**, 504–511 (2000)
27. Savino F., Cordisco L., Tarasco V., Palumeri E., Calabrese R., Oggero R., Roos S., Matteuzzi D.: *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in infantile colic: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pediatrics*, **126**, 526–533 (2010)
28. Schillinger U., Geisen R., Holzapfel W.H.: Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci. Tech.* **7**, 58–64 (1996)
29. Schlegel H.G.: *Mikrobiologia ogólna*. Wydawnictwo PWN, Warszawa, 2005
30. Shah N.P.: Functional cultures and health benefits. *Int. Dairy J.* **17**, 1262–1277 (2007)
31. Shenderov B.A.: Probiotic (symbiotic) bacterial languages. *Anaerobe*, **17**, 490–495 (2011)
32. Van Belkum M.J., Martin-Visscher L.A., Vederas J.C.: Structure and genetics of circular bacteriocins. *Trends Microbiol.* **19**, 411–418 (2011)
33. Ziemer C.J., Gibson G.R.: An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *Int. Dairy J.* **8**, 473–479 (1998)

ANTIBIOTIC BIOSYNTHESIS AND SECONDARY METABOLISM IN HIGH-YIELDING STRAINS OF *STREPTOMYCES*, *PENICILLIUM CHRYSOGENUM* AND *ACREMONIUM CHRYSOGENUM*

Wiesław Kurzątkowski^{1*}, Joanna Kuczerowska²

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

² Medical University of Warsaw, Żwirki i Wigury 61, 00-001 Warsaw, Poland

Submitted in April, accepted in May 2017

1. Introduction. 2. Industrial strain improvements. 3. The pathways of antibiotic biosynthesis by *Streptomyces* spp. 4. Compartmentalization in antibiotic biosynthesis by *Streptomyces* spp. 5. The pathway of penicillin G biosynthesis by *Penicillium chrysogenum*. 6. Compartmentalization in penicillin G biosynthesis by *Penicillium chrysogenum*. 7. The pathway of cephalosporin C biosynthesis by *Acremonium chrysogenum*. 8. Compartmentalization in cephalosporin biosynthesis by *Acremonium chrysogenum*. 9. The future of antibiotic therapy. 10. Conclusions

Antibiotic biosynthesis and secondary metabolism in high-yielding strains of *Streptomyces*, *Penicillium chrysogenum* and *Acremonium chrysogenum*

Abstract: In this article, the secondary metabolism as a basis for antibiotics production by industrial strains of *Streptomyces*, *Penicillium chrysogenum* and *Acremonium chrysogenum* is discussed. Images from transmission electron microscopy reveal some important features of the mycelial cells which are related to antibiotics biosynthesis. This discovery is important for further industrial strain improvement and has economic significance. Possibilities of new strategies for antimicrobial treatment are discussed.

1. Wprowadzenie. 2. Ulepszanie szczepów przemysłowych. 3. Szlaki biosyntezy antybiotyków wytwarzanych przez *Streptomyces* spp. 4. Organizacja komórek grzybni *Streptomyces* spp. podczas biosyntezy antybiotyków. 5. Szlak biosyntezy penicyliny G w komórkach grzybni *Penicillium chrysogenum*. 6. Organizacja komórek grzybni *Penicillium chrysogenum* podczas biosyntezy penicyliny G. 7. Szlak biosyntezy cefalosporyny C w komórkach grzybni *Acremonium chrysogenum*. 8. Organizacja komórek grzybni *Acremonium chrysogenum* podczas biosyntezy cefalosporyny C. 9. Przyszłość antybiotykoterapii. 10. Wnioski

Biosynteza antybiotyków i metabolitów wtórnych przez wydajne szczepy *Streptomyces*, *Penicillium chrysogenum* i *Acremonium chrysogenum*

Streszczenie: Rola wtórnego metabolizmu w biosyntezie antybiotyków wytwarzanych przez szczepy przemysłowe z rodzaju *Streptomyces* oraz *Penicillium chrysogenum* i *Acremonium chrysogenum* jest dyskutowana. Obrazy z transmisyjnej mikroskopii elektronowej wykazują ważne cechy komórek grzybni związane z wysokowydajną biosyntezą antybiotyków. Odkrycie to pozwala na dalsze zwiększanie antybiotycznej wydajności szczepów przemysłowych i ma znaczenie ekonomiczne. Przedmiotem niniejszej publikacji jest omówienie możliwości opracowania nowych strategii zwalczania chorób zakaźnych.

Key words: antibiotics, biosynthesis, cellular features, fungi imperfecti, *Streptomyces*

Słowa kluczowe: antybiotyki, biosynteza, cechy komórkowe, fungi imperfecti, *Streptomyces*

1. Introduction

Antibiotics are secondary metabolites produced by different microorganisms, including *Streptomyces* spp. and *Penicillium chrysogenum* as well as *Acremonium chrysogenum* (*Cephalosporium chrysogenum*). High yielding strains of these microorganisms are widely used for antibiotic production on an industrial scale [1, 2, 4, 13]. Large scale of antibiotics production is a result of industrial strain improvement. Antibiotics have saved millions of human beings from the annihilation. Below we discuss different pathways and aspects of antibiotics biosynthesis.

This article is designed to overview details concerned with the basic pathways of antibiotic biosynthe-

sis by *Streptomyces* spp. and fungi imperfect, including industrial strain improvement. Further purpose is to discuss the structural organization of industrial mycelia related to antibiotic biosynthesis. Other goals are to overview efforts to obtain modified antibiotics and to develop new strategies for antimicrobial treatments.

2. Industrial strain improvement

The prokaryotic microorganisms *Streptomyces* and the eukaryotic *P. chrysogenum* as well as *A. chrysogenum* are used for antibiotic biosynthesis on a large scale. These improved and selected high-yielding strains have been used for more than 75 years for antibiotic

* Autor korespondencyjny: Wiesław Kurzątkowski, Independent Laboratory of *Streptomyces* and Fungi Imperfecti, National Institute of Public Health – National Institute of Hygiene, Chocimska 24, 00-791 Warsaw Poland; tel. 22 542 12 28; e-mail: wkurzatkowski@pzh.gov.pl

production. Classical strain improvement has yield industrial strains that produce high amounts of antibiotics. Large scale of antibiotics production is a result of industrial strain improvement, including numerous mutations and selections. Metabolic engineering has also proven to be a rational alternative to classical strain improvement [20]. Some *P. chrysogenum* strains contain up to eight copies of the penicillin G biosynthetic gene clusters, i.e.: *pcbAB* gene encoding δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase (ACVS), *pcbC* gene encoding Isopenicillin N synthase (IPNS) and *penDE* gene encoding acyl-Co A:isopenicillin N acyltransferase (IAT). The phenylacetyl-CoA ligase (PCL) encoded by *phl* gene is not a part of the penicillin G biosynthetic gene cluster. A large number of genomic and transcriptional analysis of strain lineages have lead to the identification of numerous alterations in industrial strains, such as the amplification of penicillin G biosynthetic gene cluster, elevated transcription of genes involved in biosynthesis of this antibiotic and its amino acid precursors as well as genes encoding peroxisome proliferation [24, 25]. Biosynthesis and secretion of penicillin G, cephalosporin C are compartmentalized processes located in sub-apical, productive, non-growing cells of the hyphae [3, 6–12, 18, 21]. Cellular organization of industrial *Streptomyces* strain is currently not fully known.

3. Pathways of antibiotic biosynthesis by *Streptomyces* spp.

Antibiotics are secondary metabolites [26] produced by numerous bacteria and fungi. The secondary metabolism is characterized by unusual short (one-way) biosynthetic pathways leading to uncontrolled large scale production of end-products which are stored in cells of the producer or excreted to the cellular environment. Accumulation of secondary metabolites suggests that the productive cells are inefficient in regulation of the biosynthesis of these substances. In view of what has been known about the genetic control of the primary metabolism regulation it would be of interest to find out why the regulation of secondary metabolites biosynthesis is not controlled more strictly. Pathways of secondary metabolism branch out from the main roads of the primary metabolism, such as: fatty acid metabolism, amino acid metabolism, carbohydrate metabolism, purine and pyrimidine metabolism, aromatic biosynthesis (shikimic acid), methyl groups arising from the C1 pool. The branching point of both metabolisms is the uptake of one or few intermediates from one or more pathways of the primary metabolism. Next these intermediates are combined to secondary metabolites. Each of these primary metabolic categories

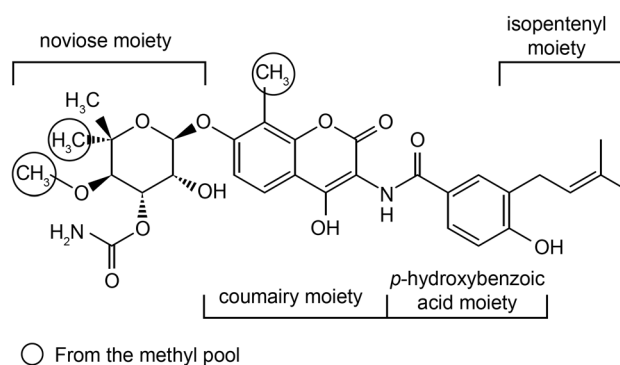


Fig. 1. Primary metabolic sources of novobiocin are pictured

as a source of antibiotic will be discussed in this paper. But first, it should be clear that some antibiotics originate from more than one of these metabolic sources. A good example is novobiocin [26] composed of moieties derived from the following metabolic sources (Fig. 1). The noviose moiety of novobiocin is derived without cleavage from the carbon chain of glucose (carbohydrate metabolism). The methyl groups are mainly derived from the methyl pool, which in turn originates from the methyl group of methionine (C1 pool). The nitrogen of the carbamyl group combined with the noviose ring of novobiocin arises from metabolic nitrogen, probably from glutamine (nitrogen metabolism). The isopentenyl moiety attached to p-hydroxybenzoate is derived from mevalonic acid, which in turn is supplied from either acetate or leucine (isopentyl metabolism). The 3-amino, 4-hydroxycoumarin moiety is derived from tyrosine, which in turn arises from the common aromatic pathway via shikimic acid (aromatic amino acid metabolism). The p-hydroxybenzoate moiety of the antibiotic is derived from the common aromatic pathway via shikimic acid (shikimic acid metabolism).

Short fatty acids biosynthesis in the primary metabolism delivers precursors for antibiotic biosynthesis in the secondary metabolism. Repeated condensation of active acetate and malonate units leads to formation of β -polyketomethylene chains (Fig. 2). In primary metabolism these compounds are reduced to form fatty acids. It was demonstrated that by “head-tail” condensation of acetyl-CoA and malonyl-CoA units numerous secondary metabolites, e.g. mycotoxins, alkaloids, terpenes, steroids, glycosides, including antibiotics can be produced [26]. This last group is represented among others by the following antibiotics (Fig. 3): griseofulvin, erythromycin, tetracyclines, anthracyclines, nystatin and curvularin. The starter molecule of β -polyketomethylene synthesis is not always acetyl-CoA. For example, in tetracycline biosynthesis (Fig. 4) the starter molecules are acetyl-CoA, malonyl-CoA and malonamyl-CoA. The β -polyketomethylenes occur in the cells of the producers always bound to the enzymes. In the secondary metabolism the β -polyketomethylene

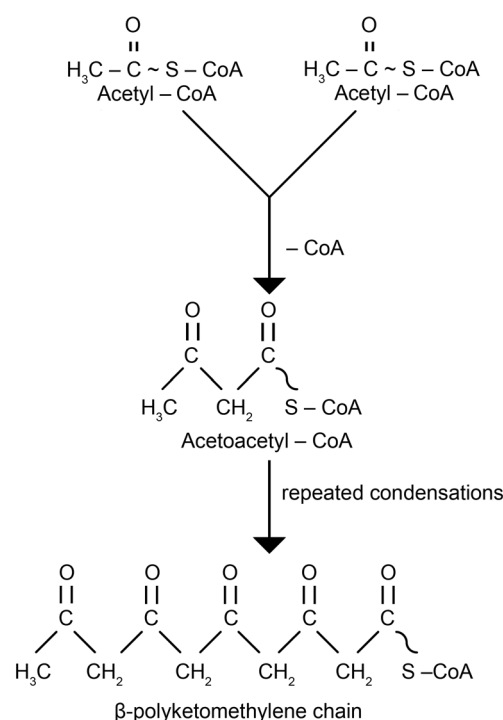
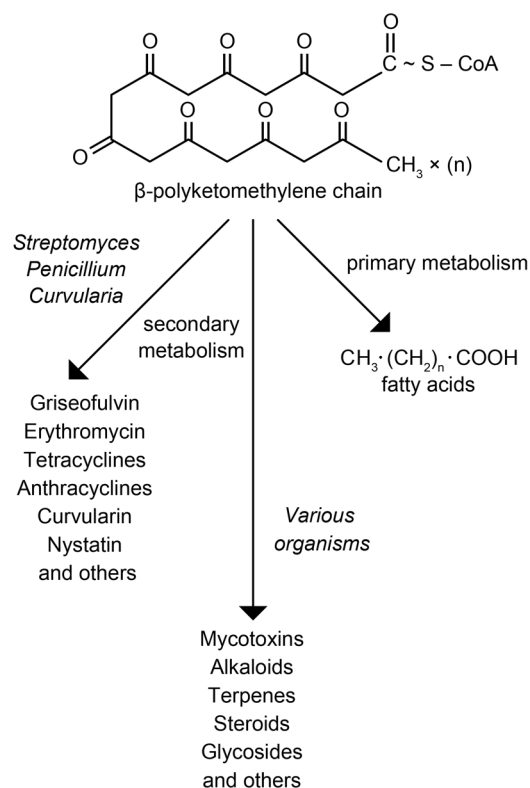
Fig. 2. Biosynthetic pathway of the β -polyketomethylene chain

Fig. 3. Metabolic origin of antibiotics and other secondary metabolites

chain undergo in the productive cells of *Streptomyces* spp. numerous further modifications, such as methylation, ring closure, oxidation, chlorination, amination, and others, leading to the biosynthesis of numerous secondary metabolites, such as tetracyclines.

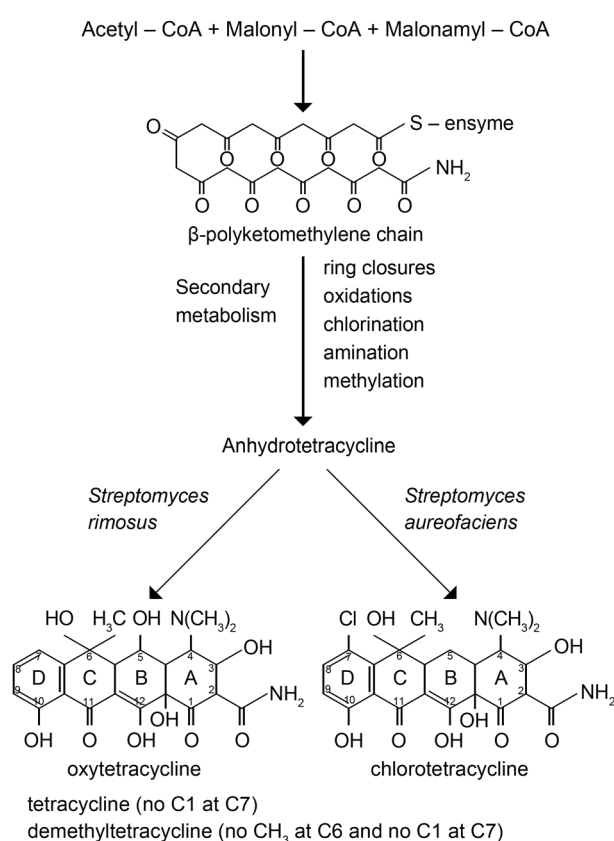


Fig. 4. Scheme of tetracyclines biosynthesis

Some of secondary metabolites possess very strong antibacterial activities. For example, introduction of double and triple bonds results in building of polyene antibiotics (nystatin, amphotericin), which are widely distributed among streptomycetes. Finally, cyclization of the intermediates leads to formation of large lactones (macrolide antibiotics). Through repeated cyclization polyaromatic antibiotics can be produced, e.g. tetracyclines (Fig. 4) and anthracyclines.

Peptide antibiotics are produced by bacteria including *Streptomyces* spp. and fungi. The presence of unusual amino acids of D-configuration and unusual chemical bounds, e.g. δ - α peptide bound in the molecule of peptide antibiotics are characterizing these compounds as secondary metabolites. Other feature of secondary metabolites with strong antimicrobial activity is the nonribosomal biosynthesis and cyclization of the peptide chain. For example, the cyclic peptide of gramicidin S is composed of ten amino acids, including two L-valines, two L-leucines, two L-prolines, two L-ornithines and two D-phenylalanines (the last two amino acid are unusual in the primary metabolism). Bacitracin is a mixture of related cyclic peptides. This antibiotic is composed of twenty aminoacids, including four unusual amino acids: D-glutaminic acid, D-asparagine, D-ornithine, D-phenylalanine and the thiazoline moiety from L-cysteine and L-isoleucine. Polymyxin B₁ contains unusual D-phenylalanine and L-diaminobu-

tyric acid. *Streptomyces* are privileged in the biosynthesis of peptide antibiotics. *Streptomyces antibioticus* is a producer of actinomycin D containing six unusual amino acids, i.e.: two D-valines, two sarcosines and two N-methyl-valines. *S. lavendulae* is a producer of etamycin, a cyclic peptide antibiotic containing D-leucine, D-allo-hydroxyproline, sarcosine, α -phenylsarcosine and N, β -dimethyl-L-leucine. *S. clavuligerus* is a producer of clavulanic acid which is a cyclic peptide. Other cases are the cyclic β -lactam antibiotics structurally composed of L-cysteine and D-valine.

Sugars as constituents of antibiotics are represented by numerous sugar containing compounds, such as aminoglycoside antibiotics: streptomycin, kanamycin A, neomycin, and others; anthracyclines; purine-antibiotics for example puromycin; polyene antibiotics: nystatin, amphotericin B and others. Antibiotics containing purines or pyrimidines are represented by toyocamycin (from *S. rimosus*), tubercidin (from *S. tubercidicus*), nebularin, cordycepin, psicofuranine and angustmycin A.

4. Compartmentalization in antibiotic biosynthesis by *Streptomyces* spp.

The cellular features of the industrial strains of *Streptomyces* are not yet fully understood. The cellular co-location of enzymes of the pathway of antibiotics biosynthesis should be in the future the subject of

intensive investigations. Our studies showed in the cells of *S. vinaceus* L-6 producing viomycin on an industrial scale a large number of organelles filled with electron-dense dark contents (Fig. 5). In the productive mycelial cells of the low-yielding strain *S. vinaceus* 2560 these membranous structures could be observed very rarely. Viomycin is a strongly basic nonribosomal peptide antibiotic with high affinity to heavy metals, visible in electron microscopic images as electron opaque dark material. Therefore, it may be suggested, that in the high-yielding strain the electron-dense content of these organelles is related to the places of viomycin accumulation. It is also supposed that these structures play a role in the processes of viomycin biosynthesis. We have also observed similar organelles in the cells of other high-yielding *Streptomyces* strains, e.g.: *S. melanochromogenes*, *S. erythreus*, *S. aureofaciens*. Better understanding of the cellular features associated with antibiotic biosynthesis on an industrial scale will deliver further opportunities to increase the production efficiency of these compounds, as was the case with penicillin G biosynthesis by *P. chrysogenum*.

5. The pathway of penicillin G biosynthesis by *P. chrysogenum*

The biosynthesis of penicillin G consists of at least three enzymatic steps. The enzyme ACVS is involved in condensation of activated amino acids L- α -amino adipic acid, L-cysteine and L-valine to form the δ -(L- α -amino adipyl)-L-cysteinyl-D-valine (ACV) [24]. IPNS converts the ACV to isopenicillin N (IPN). The enzymes PCL and IAT are involved in the last step of penicillin G biosynthesis, in which the α -amino adipyl group of IPN is substituted by a phenylacetyl side chain [24].

6. Compartmentalization in penicillin G biosynthesis by *P. chrysogenum*

Nowadays the compartmentalization in penicillin G biosynthesis by *P. chrysogenum* is better understood [3, 12, 16, 17]. It was suggested that the sub-apical productive non-growing vacuolated hyphal cells are privileged in antibiotic biosynthesis [18]. Based on biochemical features and immune-gold electron microscopy it was shown that ACVS is a cytosolic enzyme [21, 23]. The IPNS was previously found to be associated with membranous organelles [5, 11]. Based on sub-cellular fragmentation, immune-gold electron microscopy and biochemical features of the enzyme van der Lende *et al.* [23] suggested that IPNS is a soluble cytosolic enzyme, although its activity in cell free extracts seems to be stimulated by sonification [21]. It suggests a partial

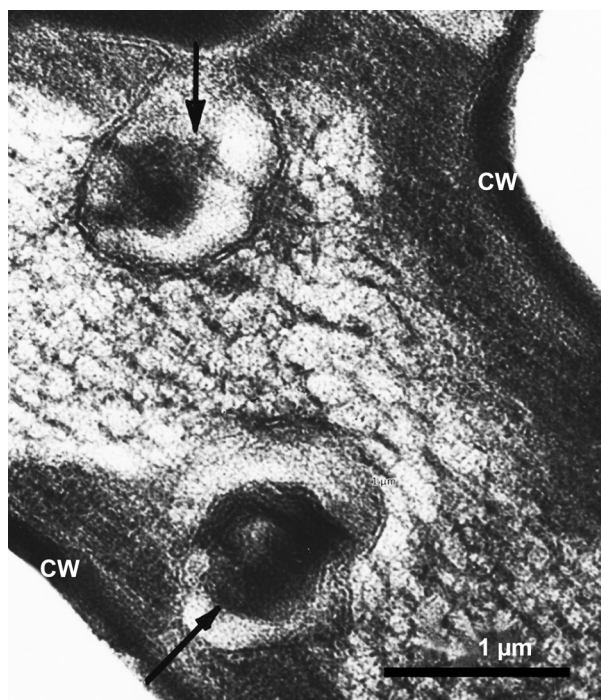


Fig. 5. *Streptomyces vinaceus* L-6

Ultrastructural features of a high-viomycin-yielding cell of the mycelium. Abbreviations: cw – cell wall; Arrows showing organelles filled with electron-dense dark contents.

cellular compartmentalization and concentration of IPNS, e.g. as cytosolic enzymes around the peroxisomes. Our findings show that at the industrial activity of penicillin G production the enzyme IPNS is frequently concentrated in the cytoplasm between the membranes of polyribosomes surrounding the peroxisomes [6, 7]. The enzymes PCL and IAT are located in peroxisomes [15, 23]. Such a collocation of the cytosolic ACVS and IPNS with the peroxisomal PCL and IAT may increase the IAT supplying efficacy. Moreover such a collocation may also facilitate the continuous and efficient biosynthetic flow of molecules and the immediate conversion in penicillin G biosynthesis. Formation of the IPN (the β -lactam nucleus) takes place in the cytosol. IPN is next transported into the peroxisomes where the L- α -aminoadipyl side chain of IPN is exchanged for a phenylacetyl group by IAT. In this reaction the side chain precursor has to be activated by PCL before the translocation occurs [14]. These results indicate that the last two steps in penicillin G biosynthesis are located in peroxisomes, where this antibiotic is synthesized, accumulated and entrapped. Functional peroxisomes play a crucial role for the efficiency of penicillins production by industrial strains [14, 15, 22]. High penicillin G producing strains show increasing numbers of peroxisomes [14, 22, 24]. Overexpression of the peroxisome proliferation gene *pex11* in *P. chrysogenum* results in an increase of both peroxisome numbers and in the activity of penicillin biosynthesis. The productive mycelia cells of high penicillin G producing strains show increasing numbers of large peroxisomes mainly at the period of the intensive antibiotic biosynthesis [1, 6, 7, 22, 24, 25]. *De novo* synthesis of peroxisomes and collo-

cation of large peroxisomes with vacuole as well as peroxisomes multiplication by fission are significant features of the high productive non-growing mycelial cells. The productive hyphal cells of the high-yielding strain of *Penicillium chrysogenum* PQ-96 exhibited numerous peroxisomes (Fig. 6) frequently arranged at the periphery of the cytoplasm and around the large vacuoles. The peroxisomes are abundantly accompanied by ACVS and IPNS which are entrapped in the cytoplasmic areas located between the surface of peroxisomes and polyribosomes surrounding the peroxisomes. Such a collocation of the cytosolic ACVS and IPNS with the peroxisomal PCL and IAT may increase the intermediate supplying efficacy in penicillin G biosynthesis from the fermentation medium and from the cytosol as well as from the vacuolar pool. Our findings show that in the process of penicillin G production on a large scale the structurally grouped organelles build a well organized "assembly line" consisting of cytosolic and membrane encompassed enzymes, substrates, intermediates, precursors, side- and end-products [6, 7].

Secretion of penicillin G from the interior of peroxisomes first across the plasma membrane and then through the cellular membrane of the industrial mycelia of *P. chrysogenum* is at present poorly understood [24]. It is unknown whether IPN and penicillin G transport over the membrane of peroxisomes requires active transport or utilizes peroxisomal pore proteins. It was suggested that the abundant pexophagy and exocytosis should be currently considered as putative alternative for active secretion by the ABC transporters. The results of our previous experiments show that the abundant vacuolar pexophagy, i.e. the autophagy-related degrada-

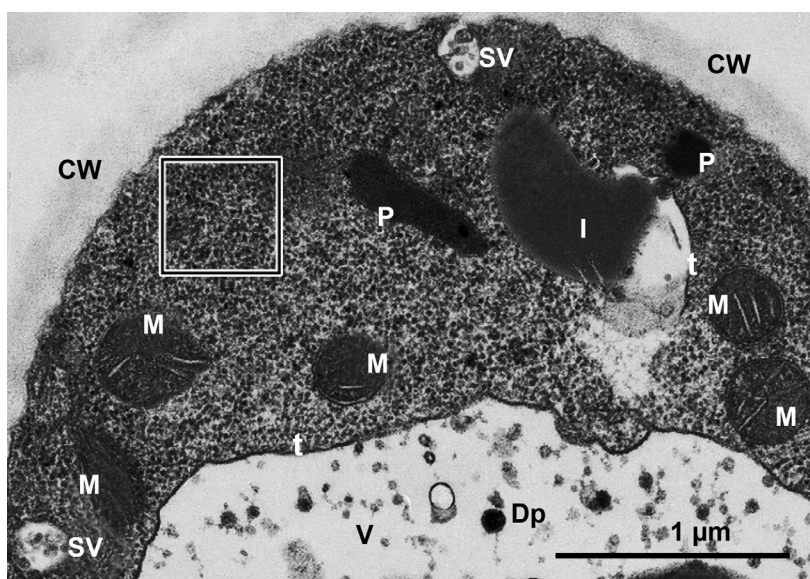


Fig. 6. *Penicillium chrysogenum* PQ-96, high-penicillin-yielding strain
Ultrastructural features of a productive cell of the mycelium. Abbreviations: cw – cell wall, sv – secretion vesicles, M – mitochondria, P – peroxisomes, l – lipid body, t – tonoplast, V – vacuole, Dp – degradation products of peroxisomal matrix, square – ribosomes and a polyribosome is visible.

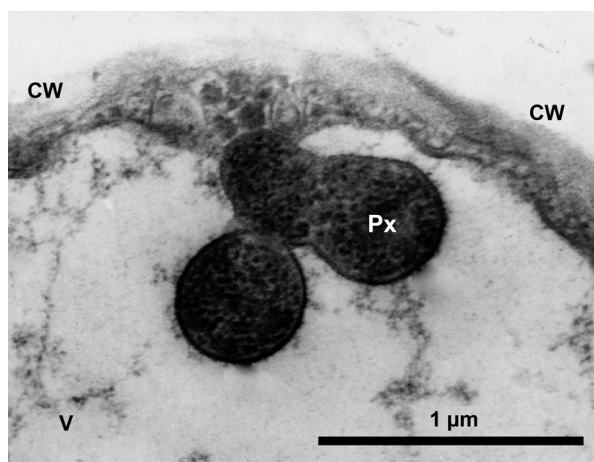


Fig. 7. *Penicillium chrysogenum* PQ-96, high-penicillin-yielding strain

Abbreviations: cw – cell wall, V – vacuole, Px – vacuolar pexophagy.

tion of peroxisomes takes place mainly in mature and late sub-apical cells of *P. chrysogenum* during the intensive increase of antibiotic performance in the supernatant of the fermentation broth. Secretion of penicillin G from the peroxisomes across the plasma membrane of the mycelia cells of *P. chrysogenum* is poorly understood [24]. The results of our previous experiments show that the abundant vacuolar pexophagy of large peroxisomes (Fig. 7) combined with vacuolar budding and the presence of a large number of vacuolar vesicles which fuse with the plasma membrane are the most important structural features characterizing the productive cells of the industrial strains of *P. chrysogenum* [9, 10]. Therefore, we suggest that in industrial-scale secretion of penicillin G the pexophagy and exocytosis should be currently considered as a putative alternative for active secretion by the ABC transporters. Despite of numerous efforts, at present, the lack of clear involvement of any of these ABC transporters (van den Berg 2001, Patent description WO 2001/32904) in secretion of penicillin G is intriguing and may suggest that the secretion of penicillin G by industrial mycelia does not proceed through the classical ABC pumps. In the industrial cultures the overproducing strains secrete 40–55 g of penicillin G per liter of the fermentation medium and in this case the ABC transporters seem to be inefficient. The extracellular level of penicillin G is tenfold higher than the intracellular concentration of this antibiotic [22]. It suggests an active secretion mechanism [24].

7. The pathway of cephalosporin C biosynthesis by *A. chrysogenum*

The pathways of penicillin and cephalosporin biosynthesis are related. In *Penicillium* IPN is converted to penicillin G [24]. The formation of IPN is a branch

point of the pathways of penicillin and cephalosporin biosynthesis. In *Acremonium* and other cephalosporin producers IPN is converted to penicillin N (PEN) by an epimerization CefD1-CefD2 system [19]. The next step in cephalosporin biosynthesis is the enzymatic expansion of the five-membered thiazolidine ring of penicillin N to a six-membered dihydrothiazine ring. This conversion is catalyzed by the PEN expandase (deacetoxycephalosporin C synthase – DAOCS) – encoded by the *cefEF* gene. The following step is conversion of deacetoxycephalosporin C (DAOC) to deacetylcephalosporin C (DAC) by DAC synthase. The last step of cephalosporin C biosynthesis is the transfer of an acetyl-moiety from the acyl-CoA to hydroxyl group on the sulfur containing ring of DAC, this reaction is catalyzed by the acyl-CoA:DAC acyltransferase – encoded by *cefG*. Cephalosporin C is a peptide secondary metabolite with high antibacterial activity.

8. Compartmentalization in cephalosporin biosynthesis by *A. chrysogenum*

In *Acremonium* the CefD1-CefD2 epimerization system converting isopenicillin N to penicillin N (D-isomer of IPN) is located (entrapped) in peroxisomes [12, 13]. All other enzymes of the pathway of cephalosporin C biosynthesis, i.e. DCVS, IPNS, DAOCS, DACS, DAC-acetyltransferase are suggested to be cytosolic enzymes [21]. The results of our previous experiments exhibit in the productive non-growing cells of the industrial mycelium of *A. chrysogenum* a large number of peroxisomes which are accompanied by mitochondria and polyribosomes. Small peroxisomes were also rarely visible in the cells of the low cephalosporin producing strain of *A. chrysogenum*. This results support strongly the participation of peroxisomes in cephalosporin biosynthesis [8].

9. The future of antibiotic therapy

Over many decades, the always increasing resistance of different pathogens to antibiotics was forcing as to modify their chemical structure to obtain new compounds with improved antimicrobial activity. So far, we always modify the antibiotics to get more efficient antimicrobial compounds but as response to our modifications the pathogens are doing exactly the same modifying their mechanism of resistance to not accept our cure. Nevertheless, the search for new antibiotics that could be medically used is at present the order of the day. The future of antibiotics must be protected by the correct and rational medical application. Moreover, new strategies of medical treatment should

be developed, e.g. the antibiotics used on a large scale for a long time with decreased antimicrobial activity should be withdrawn from treatment for few years and then tested for repeated use. Scientific reports and discussions between experts point to the suitability of such procedures [24, 25]. New strategies of medical treatment mentioned above should be developed.

10. Conclusions

Further experimental programs should be conducted to deliver more details related to biosynthesis and secretion of antibiotic from the industrial mycelia of *Streptomyces* spp., *P. chrysogenum* and *A. chrysogenum*. Better understanding of the cellular compartmentalization leads to modern technologies of biosynthesis with increased antibiotic efficiency which has economical importance. Further efforts should be taken to obtain modified natural, semisynthetic and synthetic antibiotics. Cell-free technologies using immobilized enzymes of the pathways of antibiotics biosynthesis and the molecular docking seems to be the future in this field. Classical strain improvement and genetic engineering provides further possibilities to elaborate new strategies of antimicrobial treatments.

Acknowledgements

This work was supported by PTP No 90/96 grant from Polfa-Tarchomin Pharmaceutical Works in Warsaw, Poland and by the statutory activity No. 22/EM.1 – 2014 of the National Institute of Public Health – National Institute of Hygiene Warsaw as well as by Grant from the Commission of the European Communities, Copernicus Program, Contract No ERBCIPACT 930093.

References

1. Bartoszewski M., Opaliński L., Veenhuis M., van der Klei.: The significance of peroxisomes in secondary metabolite biosynthesis in filamentous fungi. *Biotechnol. Lett.* **33**, 1921–1931 (2011)
2. Brakhage A.A., Spröte P., Al-Abdallah Q., Gehrke A., Plaftner K., Tüncher: Regulation of penicillin biosynthesis in filamentous fungi. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **88**, 45–90 (2004)
3. Evers M.E., Trip H., van den Berg M.A., Bouvenberg R.A., Driessen A.L.: Compartmentalization and transport in β -lactam antibiotics biosynthesis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **88**, 111–135 (2004)
4. Keller N.P., Turner G., Bennett J.W.: Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 937–947 (2005)
5. Kurzatkowski 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. Biot.* **35**, 517–520 (1991)
6. Kurzatkowski W., Staniszevska M., Bondaryk M., Gębska-Kuczerowska A.: Penicillin G production by industrial strains of *Penicillium chrysogenum*. *Post. Mikrobiol.* **53**, 366–370 (2014)
7. Kurzatkowski 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)
8. Kurzatkowski W., Gębska-Kuczerowska A.: Compartmentalization in cephalosporin biosynthesis by industrial strains of *Acremonium chrysogenum*. *Post. Mikrobiol.* **54**, 374–379 (2015)
9. Kurzatkowski W., Gębska-Kuczerowska A., Oliwa-Dobieszewska K., Gaber A., Kuczerowski M.: Penicillin G secretion by industrial Mycelia of *Penicillium chrysogenum*. *Post. Mikrobiol.* **55**, 433–437 (2016)
10. Kurzatkowski W., Gębska-Kuczerowska A.: Pexophagy in penicillin G secretion by *Penicillium chrysogenum* PQ-96. *Pol. J. Microbiol.* **65**, 365–368 (2016)
11. Lendenfeld T., Ghali D., Wolschek M., Kubicek-Pranz E.M., Kubicek C.P.: Subcellular compartmentation of penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* – aminoacids are precursors derived from the vacuole. *J. Biol. Chem.* **268**, 665–671 (1993)
12. Martin J-F., Ullán R.V., Gracia-Estrada C.: Regulation and compartmentalization of β -lactam biosynthesis. *Medical Biotechnol.* **3**, 285–299 (2010)
13. Martin J-F., Ullán R.V., Gracia-Estrada C.: Role of peroxisomes in biosynthesis and secretion of β -lactams and other secondary metabolites. *J. Ind. Microbiol.* **39**, 367–382 (2012)
14. Meijer W.H., Gidijala I., Fekken S., Kiel J.A., van den Berg M.A., Lascaris L., Bovenberg E.A.L., van der Klei I.J.: Peroxisomes are required for efficient penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 5702–5709 (2010)
15. Müller W.H., Essers J., Humbel B.M., Verkleij A.J.: Enrichment of *Penicillium chrysogenum* microbodies by isopycnic centrifugation in nycodenz as visualized with immune-electron microscopy. *Biochem. Biophys. Acta*, **1248**, 215–220 (1995)
16. Nagotu S., Veenhuis M., van der Klei I.J.: Divide et impera: The dictum of peroxisomes. *Trafic*, **11**, 175–184 (2010)
17. Nuttall J.M., Motley A., Hettema E.H.: Peroxisome biosynthesis recent advances. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **23**, 421–426 (2011)
18. Paul G.C., Thomas C.R.: A structured model for hyphal differentiation and penicillin production using *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.* **51**, 558–572 (1996)
19. Schmitt E.K., Hoff B., Kück U.: Regulation of cephalosporin biosynthesis. *Adv. Biochem. Biotechnol.* **88**, 1–43 (2004)
20. Thykaer J., Nielsen J.: Metabolic engineering of β -lactam production. *Metab. Eng.* **5**, 56–69 (2003)
21. Van de Kamp M., Driessen A.J., Konings W.N.: Compartmentalization and transport in β -lactam antibiotic biosynthesis by filamentous fungi. *Anton. Leeuw.* **75**, 41–78 (1999)
22. Van den Berg M.A., Bovenberg R.A.L. et al.: Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1161–1169 (2008)
23. Van der Lende T.R., van de Kamp M., van den Berg M., Sjollem K., Bouvenberg R.A., Veenhuis M., Konings W.N., Driessen A.J.: δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase that mediates the first committed step in penicillin biosynthesis, is a cytosolic enzyme. *Fungal. Genet. Biol.* **37**, 49–55 (2002)
24. Weber S.S., Bovenberg R.A., Driessen A.J.: Biosynthetic concepts for the production of β -lactam antibiotics in *Penicillium chrysogenum*. *J. Biotechnol.* **7**, 225–236 (2012)
25. Weber S.S., Poli F., Boer R., Bouvenberg R.A., Driessen A.J.: Increased penicillin production in *Penicillium chrysogenum* strains via balanced overexpression of isopenicillin N acyltransferase. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 7107–7113 (2012)
26. Zähner H., Maas W.K.: Biology of Antibiotics, Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, 1972

PEŁZAKI Z RODZAJU *ACANTHAMOEBA* – CZYNNIKI ETIOLOGICZNE STANÓW PATOLOGICZNYCH LUDZKIEGO ORGANIZMU

Marcin Padzik^{1*}, Edyta B. Hendiger¹, Jacek P. Szaflik², Lidia Chomicz¹

¹ Zakład Biologii Medycznej Wydział Nauki o Zdrowiu, Warszawski Uniwersytet Medyczny

² Katedra i Klinika Okulistyki, II Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny,
Samodzielny Publiczny Kliniczny Szpital Okulistyczny

Wpłynęło w czerwcu, zaakceptowano we wrześniu 2017 r.

1. Wprowadzenie. 2. Rodzaj *Acanthamoeba*. 2.1. Występowanie. 2.2. Chorobotwórczość. 3. Pełzakowe zapalenie rogówki – AK. 3.1. Czynniki ryzyka. 3.2. Przebieg zarażenia. 3.3. Diagnostyka. 3.4. Leczenie i profilaktyka. 4. Ziarniniakowe pełzakowe zapalenie mózgu – GAE. 4.1. Przebieg zarażenia. 4.2. Diagnostyka i leczenie. 5. Akantameboza skórna. 5.1. Przebieg zarażenia. 5.2. Diagnostyka i leczenie. 6. Podsumowanie

Amoebae of the genus *Acanthamoeba* – pathological agents in humans

Abstract: Free living, cosmopolitan amoebae of the genus *Acanthamoeba* present a serious risk to human health. As facultative human parasites, these amoebae may cause health and life-threatening diseases, such as *Acanthamoeba* keratitis (AK), granulomatous amoebic encephalitis (GAE) and cutaneous acanthamebiasis. AK is a severe, vision-threatening cornea infection with non-specific symptoms and course. GAE is a unique central nervous system disease, almost always leading to death. Cutaneous acanthamebiasis is most common in patients with AIDS. The pathogenesis and pathophysiology of the diseases is still incompletely understood, therefore no definitive effective therapy is currently available. Prevention is very difficult due to *Acanthamoeba* ubiquity and resistance. Further studies on effective solutions for the prevention and treatment of *Acanthamoeba* infections are needed.

1. Introduction. 2. Genus *Acanthamoeba*. 2.1. Occurrence. 2.2. Pathogenicity. 3. *Acanthamoeba* keratitis – AK. 3.1. Risk factors. 3.2. Course of the disease. 3.3. Diagnostics. 3.4. Treatment and prevention. 4. Granulomatous amoebic encephalitis – GAE. 4.1. Course of disease. 4.2. Diagnostics and treatment. 5. Cutaneous acanthamebiasis. 5.1. Course of disease. 5.2. Diagnostics and treatment. 6. Summary

Słowa kluczowe: *Acanthamoeba* spp., akantameboza skórna, pełzakowe zapalenie rogówki, ziarniniakowe pełzakowe zapalenie mózgu
Key words: *Acanthamoeba* keratitis, *Acanthamoeba* spp., cutaneous acanthamebiasis, granulomatous amoebic encephalitis

1. Wprowadzenie

Ameby należące między innymi do rodzajów *Acanthamoeba*, *Naegleria* i *Balamuthia* to pierwotnie wolno żyjące pierwotniaki, powszechnie występujące w środowisku wodnym i lądowym na całym świecie. Ze względu na możliwość występowania zarówno w formie fakultatywnych pełzaków wolno żyjących (egzozoitów) jak i fakultatywnych patogenów (endozoidów) nazywane są organizmami amfizoicznymi. Jako fakultatywne pasożyty stanowią istotne zagrożenie dla życia i zdrowia ludzkiego [33, 37]. W ciągu ostatnich 10 lat zaobserwowano znaczny wzrost liczby infekcji centralnego układu nerwowego, skóry, płuc oraz oczu wywoływanych przez ameby z tej grupy [34, 71]. Dodatkowo dowiedziono, że ameby wolno żyjące mogą pełnić rolę wektorów drobnoustrojów chorobotwórczych [28]. Patogeneza infekcji wywoływanych przez ameby wolno żyjące nadal nie jest dokładnie poznana, co skutkuje trudnościami w postawieniu prawidłowej diagnozy oraz zastosowaniu skutecznego leczenia tych infekcji [37, 66, 71].

2. Rodzaj *Acanthamoeba*

Ameby z rodzaju *Acanthamoeba* zaliczane są do tzw. grupy „limax” (amfizoicznych ameb wolno żyjących), systematycznie sklasyfikowane do gromady *Sarcomastigophora*, rzędu *Amoebida* [25, 34, 37]. Podział taksonomiczny ameb ulega ciągłym zmianom i modernizacjom ze względu na badania prowadzone nad sekwencją ich genomu [60, 66]. Najnowsza klasyfikacja, zaproponowana przez Międzynarodowe Stowarzyszenie Protozoologów (ISOP), opiera się na kryteriach morfologicznych, biochemicznych oraz molekularnych. Zakłada podział patogenicznych ameb wolno żyjących na dwie Super Grupy: *Amoebozoa* (rodzaj *Acanthamoeba* i *Balamuthia*) oraz *Excavata* (rodzaj *Naegleria*) [1, 66]. Identyfikacja gatunków ameb opiera się na molekularnej analizie sekwencji 18s rRNA. Zidentyfikowano 17 różnych genotypów (T1-T17) w obrębie rodzaju *Acanthamoeba*. Za główny genotyp chorobotwórczy dla człowieka uznaje się genotyp T4, przeważnie identyfikowany u *Acanthamoeba castellanii*, ameby

* Autor korespondencyjny: Marcin Padzik, Zakład Biologii Medycznej Wydział Nauki o Zdrowiu, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Nowogrodzka 79, 02-018 Warszawa; tel. 22 625 32 23; e-mail: marcin.padzik@wum.edu.pl

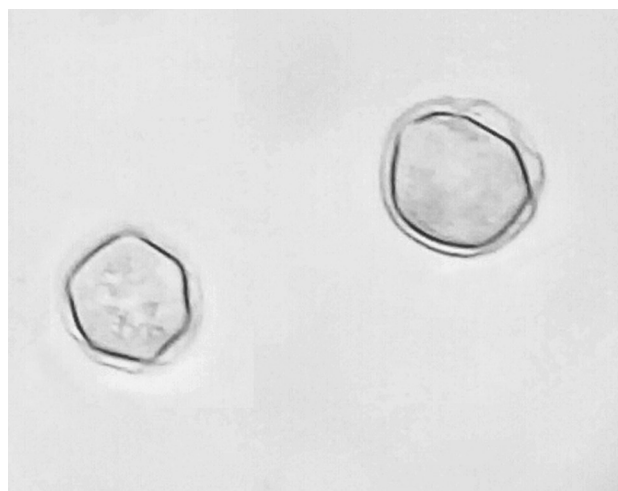
zazwyczaj wywołującej pełzakowe zapalenie rogówki (AK) [6, 25, 60, 66]. Ameby z rodzaju *Acanthamoeba* to najczęściej spotykany rodzaj ameb, szeroko rozpowszechniony w środowisku zarówno naturalnym jak i sztucznym [25, 37, 66]. Na podstawie licznych badań oraz obserwacji wyodrębniono kilkadziesiąt gatunków ameb z rodzaju *Acanthamoeba*, o różnym stopniu patogenności [25, 37]. Gatunki te mogą wykazywać różnice morfologiczne nawet w obrębie klonalnych szczepów, prawdopodobnie wynikające z warunków życia populacji [6, 66]. U cyst zaobserwowano zjawisko wewnątrzgatunkowego polimorfizmu, pełniącego istotną rolę w rozprzestrzenianiu się szczepów w środowisku [11].

2.1. Występowanie

Ameby z rodzaju *Acanthamoeba* to kosmopolityczna grupa organizmów o szerokim spektrum występowania. W cyklu życiowym ameb obecne są dwa stadia rozwoju: trofozoit (Rys. 1) i cysta (Rys. 2). Oba stadia mogą być formą inwazyjną dla człowieka [33, 34, 37]. Swoją powszechność w środowisku zarówno naturalnym jak i sztucznym ameby z rodzaju *Acanthamoeba* zawdzięczają wysokiej tolerancji trofozoitów na niekorzystne warunki środowiska [55, 66]. Cysta to stadium odporne na działanie różnego rodzaju czynników fizycznych, takich jak: zmiany temperatury, ciśnienia osmotycznego, wilgotności, pH oraz odporne na zmiany stężenia związków organicznych i nieorganicznych [6, 10, 34]. Zazwyczaj nie wykazuje wrażliwości na działanie większości środków dezynfekujących, środków antybakteryjnych czy środków antyseptycznych, np: zawartych w płynach do płukania soczewek [10, 33, 72]. Udowodniono, że cysty z rodzaju *Acanthamoeba* mogą przetrwać w wodzie destylowanej, w temperaturze 4°C, przez 25 lat, utrzymując wysoki stopień wirulencji [10, 34, 40].



Rys. 1. Trofozoit *Acanthamoeba castellanii*
Zdjęcie wykonane spod mikroskopu świetlnego, niebarwione, powiększenie x400, fotografia: Edyta Hendiger.



Rys. 2. Cysty *Acanthamoeba castellanii*
Zdjęcie wykonane spod mikroskopu świetlnego, niebarwione, powiększenie x400, fotografia: Edyta Hendiger.

Szczepy ameb o różnym stopniu patogenności zostały wyizolowane z wody, gleby oraz powietrza. Występują w naturalnych oraz sztucznych słodkich zbiornikach wodnych takich jak: rzeki, jeziora, stawy, gorące źródła, rolnicze zbiorniki irygacyjne czy baseny publiczne [12, 30, 33, 66]. Obecność ameb zaobserwowano w wodzie półsłodkiej oraz w słonej wodzie morskiej, w wodzie opadowej, a nawet w wodzie butelkowej [7, 33]. Są powszechne w glebie, piaskach plażowych oraz osadach morskich. W środowisku domowym szczepy izolowane są z systemów grzewczych, wentylacyjnych, kurzu, akwariów, gleby doniczkowej, nawilzaczy powietrza czy pryszniców. Ich obecność stwierdza się również w placówkach służby zdrowia, na sprzęcie w stacjach dializ, narzędziach stomatologicznych czy w płynach do soczewek [27, 33, 66]. Na podstawie badań przeprowadzonych w aglomeracjach miejskich stwierdzono obecność ameb w fontannach oraz piaskownicach, co może stanowić potencjalne zagrożenie dla życia i zdrowia ludzkiego, w szczególności dzieci [7, 15]. Obecność ameb stwierdza się również w ściekach komunalnych, pyłach oraz wodzie wodociągowej. Podstawowe rutynowe testy wód wodociągowych nie zawierają badań na obecność ameb. Tymczasem z badań przeprowadzonych w USA, w stanie Ohio, wynika, że w 79% badanych ujęć wody wykryto obecność tych ameb [15, 59]. Ameby zostały również wyizolowane z owoców, warzyw, grzybów, roślin oraz zwierząt (płazów, gadów, ryb, ptaków, psów czy małp) [33, 66]. U ludzi, zarówno u osób chorych jak i zdrowych, izoluje się szczepy ameb z wymazów z gardła, nosa, ucha, płwociny czy próbek kału, co może sugerować, że ameby są częścią naturalnej flory człowieka [33, 55, 72]. Podczas badań w Nigerii udowodniono kolonizację przez ameby śluzówki nosa u 24% badanej populacji [12]. Ze względu na powszechność ameb

w środowisku, u 80% badanej populacji wykryto naturalne przeciwciała IgG przeciwko amebom z rodzaju *Acanthamoeba* [33, 72].

2.2. Chorobotwórczość

Patogenność ameb z rodzaju *Acanthamoeba* wykazuje różnice międzygatunkowe oraz różnice między szczepami tego samego gatunku, a jej przyczyny wciąż nie są do końca poznane [29]. Określenie głównych czynników wirulencji jest kluczowym etapem w opracowaniu skutecznej i efektywnej terapii [33, 62]. Czynniki warunkujące chorobotwórczość ameb zostały podzielone na 2 grupy: czynniki bezpośrednio związane z patogennością oraz czynniki pośrednio związane z patogennością. Do czynników bezpośrednich zaliczana jest zdolność do adhezji, fagocytozy, sekrecji specyficznych enzymów oraz acanthaporyny (toksycznego białka formującego pory). Czynniki pośrednimi jest zdolność transformacji formy troficzej w silnie oporną cystę, różnice morfologiczne, tolerancja zmiennych warunków środowiska, powszechność występowania, tworzenie biofilmu, chemotaksja, stan zdrowia zainfekowanego organizmu oraz oporność na leki [32]. Od momentu opisanego pierwszych przypadków zarażeń amebami z rodzaju *Acanthamoeba* prowadzone są liczne badania mające na celu określenie kryteriów identyfikacji szczepów patogennych i niepatogennych. Na podstawie tych badań określono kilka metod wykorzystywanych do określenia stopnia zjadliwości ameb [29].

Początkowo patogenność ameb określana była na bazie morfologii cysty, przy pomocy obserwacji mikroskopowej. Zauważono jednak, że budowa morfologiczna formy przetrwanej może być zmienna nawet w obrębie jednego szczepu (np. pod wpływem warunków hodowli) [29, 55, 72]. Aktualnie obserwacja mikroskopowa cyst nie jest stosowana jako metoda określania stopnia chorobotwórczości szczepu. Jednakże dzięki tej metodzie można zaobserwować istotny czynnik wirulencji u form troficzych – liczbę acanthopodiów umożliwiających adhezję do powierzchni komórek gospodarza. Szczepy patogene posiadają na powierzchni swoich trofozoitów około 100 acanthopodiów, a niepatogene zaledwie około 20 [32, 33, 44].

Dalsze badania wykazały podwyższoną tolerancję termiczną szczepów patogennych w stosunku do niepatogennych [29, 72]. Zaobserwowano zdolność szczepów patogenicznych do wzrostu i rozwoju w temperaturze 42°C oraz wyższej. Prawdopodobnie spowodowane jest to występowaniem w komórkach ameb wysokiego poziomu białek szoku cieplnego HSP60 oraz HSP70 [29, 32, 72]. Termofilność oraz zdolność przetrwania ameby w warunkach wysokiego ciśnienia osmotycznego oraz zmiennego pH uznaje się za istotne

czynniki wirulencji. Jednak nie są one wystarczające do wywołania zarażenia. Opisano sporadycznie występujące szczepy niechorobotwórcze o wysokiej tolerancji termicznej oraz szczepy chorobotwórcze nietermofilne [29, 32, 44, 62].

Wiele badań nad inwazyjnością ameb opiera się na ich właściwościach biochemicznych [29]. Markerami wirulencji jest zarówno aktywność specyficznych enzymów proteolitycznych jak i zwiększona obecność na powierzchni błony komórkowej białek wiążących mannozę (MBP), umożliwiających adhezję [33, 44, 72]. Badania wykazały wysoką aktywność enzymów proteolitycznych, głównie proteinaz serynowych i cysteinowych u szczepów o wysokim stopniu inwazyjności i chorobotwórczości. Odnotowano również wysoką aktywność elastazy i kolagenazy, peroksydazy i niską aktywnością dysmutazy ponadtlenkowej. Nie zauważono powiązania między aktywnością katalazy, a stopniem chorobotwórczości [19, 29, 33, 44]. Możliwość rozróżnienia szczepów patogennych i niepatogennych daje również sekrecja ekto-ATP-azy o różnych masach molekularnych oraz porównywanie aktywności syntazy prostaglandynowej [25, 29, 33].

Chorobotwórczość pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* określana jest również w trakcie prób biologicznych, poprzez inokulację zwierząt laboratoryjnych. Sposób ten ma jednak liczne ograniczenia. Powtarzalność metody zależy od czynników takich jak dawka patogenu czy wiek zwierząt laboratoryjnych. Pełzaki wywołujące AK są inwazyjne tylko wobec niektórych ssaków (oprócz człowieka): świń domowych czy chomików. Dodatkowo próby biologiczne budzą wiele wątpliwości na tle etycznym [19, 29].

Markery morfologiczne, określanie termofilności, reakcja na zmienne pH czy inokulacja zwierząt laboratoryjnych nie spełniają wszystkich wymagań dotyczących czułości, swoistości i niezawodności metody oceny patogenności ameb [62]. Metody biologii molekularnej są doskonałym uzupełnieniem przytoczonych wcześniej technik. W badaniach nad inwazyjnością pełzaków porównano wiele metod analizy DNA takich jak PCR-RAPD, PCR-RFLP czy real-time PCR. Stosowanie powyższych metod obarczone może być jednak dużym błędem ze względu na niską powtarzalność czy utrudnioną standaryzację metody. Często też generują one wysokie koszty, są długotrwałe i skupiają się na najczęściej występujących genotypach. Za najbardziej wiarygodną metodę identyfikacji szczepów ameb z rodzaju *Acanthamoeba* uznaje się sekwencjonowanie fragmentów genomowego DNA, które zostały uznane za użyteczne markery polimorfizmu genetycznego. Najczęściej sekwencjonowany jest gen 18s rRNA. Za pomocą tej metody szczepy przydzielane są do grup genotypowych, co ułatwia określenie stopnia ich patogenności, inwazyjności lub oporności na leki [29].

Szczególną składową patogenności ameb jest zjawisko endosymbiozy. Ameby mogą być rezerwuarem dla wielu patogennych bakterii takich jak *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes* czy *Escherichia coli*. Aktualne dane donoszą, że 25% pełzaków izolowanych ze środowiska jest wektorami dla drobnoustrojów. Ameby zapewniają bakteriom ochronę przed niekorzystnymi warunkami środowiska, ułatwiają im wzrost, rozwój oraz potencjalne wywoływanie infekcji. Zauważono również dodatni wpływ bakterii Gram- na inwazyjność ameb wywołujących AK. Oprócz bakterii ameby mogą przenosić inne mikroorganizmy takie jak grzyby, pierwotniaki czy wirusy. Istotnym czynnikiem patogenyzy zarażeń jest również zdolność do tworzenia biofilmu będącego rezerwuarem dla wielu drobnoustrojów [28, 62, 66].

3. Pełzakowe zapalenie rogówki – AK

AK jest to silne zapalenie rogówki oka wywołane przez pełzaki z rodzaju *Acanthamoeba*, którego efektem może być całkowita utrata wzroku. Choroba ma charakter nawracający ze względu na obecność silnie opornych cyst. Dotyka osób immunokompetentnych. Główną grupą podwyższonego ryzyka są użytkownicy soczewek kontaktowych [33]. Pierwszy przypadek AK został odnotowany w 1974 roku, w Wielkiej Brytanii. Czynnikiem poprzedzającym infekcję był mechaniczny uraz rogówki [42]. AK uwarunkowane noszeniem soczewek kontaktowych opisano w 1984 roku [52]. Liczba zdiagnozowanych przypadków AK wciąż rośnie ze względu na rozwijającą się diagnostykę oraz wzrastającą liczbę użytkowników soczewek kontaktowych. Aktualnie nie istnieje w pełni skuteczna metoda leczenia, a patogenyza zarażenia wciąż jest obiektem badań [33, 46].

3.1 Czynniki ryzyka

Głównym czynnikiem ryzyka AK jest noszenie i przechowywanie soczewek kontaktowych niezgodnie z zaleceniami lekarzy oraz producentów. Aktualnie 90% pacjentów ze zdiagnozowanym AK to osoby noszące soczewki kontaktowe [25, 55, 72]. W USA wśród miliona użytkowników soczewek odnotowuje się 1–2 przypadki AK, w Wielkiej Brytanii 20 przypadków. W Polsce także odnotowano pewną liczbę zachorowań na AK. W skali kraju jest to około kilkadziesiąt przypadków. W samej Warszawie opisano kilkanaście przypadków z potwierdzoną diagnozą AK, której przyczyną mogło być długotrwałe używanie soczewek kontaktowych, lub pływanie w otwartym akwenu wodnym [8, 34, 46, 61]. Szacuje się, że u jednej osoby na 300–1500 użytkowników soczewek kontaktowych rozwinie się AK w ciągu 30 lat od rozpoczęcia korzystania z tej

metody korekcji wad wzroku [44]. Nieprawidłowości w użytkowaniu soczewek kontaktowych mogą być spowodowane zbyt małym dostępem do informacji na temat poprawnego z nich korzystania [33, 44]. Główne błędy użytkowników soczewek to [25, 33]:

- noszenie soczewek kontaktowych przez okres dłuższy niż przewidziano w ulotce,
- nie zdejmowanie soczewek podczas kąpieli (w zanieczyszczonych zbiornikach wodnych, basenach publicznych, jacuzzi, gorących źródłach, wannach z hydromasażem), korzystania z prysznica czy sauny,
- brak odpowiedniej higieny (mycia dłoni) podczas zakładania i zdejmowania soczewek,
- nieprawidłowe przechowywanie soczewek kontaktowych (nieodpowiedni pojemnik, używanie zanieczyszczonych lub przeterminowanych płynów do płukania soczewek, przemywanie soczewek wodą, nieregularna higiena soczewek).

Szczególnie narażeni są użytkownicy tzw. miękkich soczewek kontaktowych, używanych często okazjonalnie, np: podczas uprawiania sportu. Soczewki tego typu są wykonane z hydrofilowego plastiku ułatwiającego tworzenie biofilmu na ich powierzchni. Utrudniona jest również ich prawidłowa higiena [32].

Około 15–20% przypadków AK nie jest związana z noszeniem soczewek kontaktowych. Głównym powodem tych infekcji jest wcześniejszy, mechaniczny uraz rogówki (np: po zabiegu LASIK czy keratotomii promienistej), połączony z ekspozycją oka na zanieczyszczoną wodę, glebę, w następstwie uprawiania sportów wodnych lub zimowych [3, 25, 33, 34]. Odnotowano również przypadek AK u 5-letniego chłopca, niezwiązany z wcześniejszym noszeniem soczewek czy urazem mechanicznym rogówki [14, 44].

Uznaje się, że nie ma korelacji między płcią pacjenta, a częstością występowania AK. Badania z 1985 roku wykazują, że główną przyczyną AK u kobiet jest noszenie soczewek kontaktowych, zaś u mężczyzn AK wiąże się z wcześniejszym urazem rogówki [33, 58].

Wiek pacjenta nie odgrywa istotnej roli, jako czynnik ryzyka AK. Jednakże, podczas badań przeprowadzonych w Iranie, zauważono zwiększoną częstość występowania AK u kobiet z grupy wiekowej 15–25 lat. Tendencja ta może być spowodowana popularnością używania soczewek kontaktowych w tej grupie społecznej [25, 43, 56].

3.2. Przebieg zarażenia

AK dotyczy zwykle jednego oka, ale opisano również przypadki infekcji obustronnej [13, 25, 72]. Tempo nasilania się infekcji jest zwykle powolne. Ameby penetrują kolejne warstwy rogówki, od nabłonka, aż do podścieliska, wywołując efekty cytotoksyczne. Na

podstawie obserwacji pod mikroskopem rogówkowym wyróżniono 3 etapy AK [12, 44]:

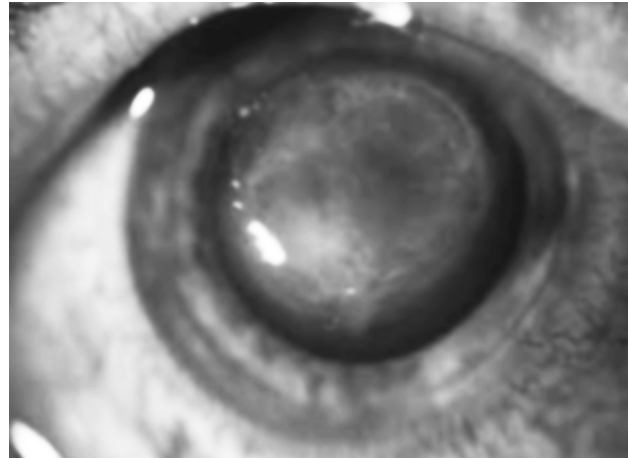
1. adhezja do nabłonka rogówki oraz wywołanie złuszczenia,
2. inwazja podścieliska rogówki,
3. zapalenie nerwu.

Warunkiem rozpoczęcia infekcji jest adhezja ameby do nabłonka rogówki gospodarza. Pełzaki najlepiej przylegają do uszkodzonego nabłonka, jednak zaobserwowano również zdolność ameb do łączenia się również ze zdrowym, nieuszkodzonym nabłonkiem rogówki [12, 33]. Głównymi elementami uczestniczącymi w adhezji są acanthopodia oraz MBP na powierzchni błony ameby [33, 44]. W momencie kontaktu ameby z gałką oczną zachodzi interakcja między MBP, a bogatymi w mannozę glikoproteinami i glikolipidami nabłonka rogówki [12, 33, 56]. Ameby penetrują nabłonek rogówki wywołując proces złuszczenia poprzez 3 mechanizmy: bezpośrednią cytolizę komórek, fagocytozę oraz indukcję apoptozy [12]. W następstwie adhezji u ameby uruchamiają się szlaki sygnałów wewnątrzkomórkowych prowadzących do rozpoczęcia sekrecji enzymów oraz substancji cytotoksycznych [33, 44, 56].

Kombinacja enzymów litycznych pozwala trofozoitom penetrować matrix zewnątrzkomórkowy tkanek zrębu nabłonka rogówki. Na tym etapie infekcji pojawia się charakterystyczny objaw nacieku promieniowego [12]. Ameby wydzielają 3 rodzaje proteaz: serynowe, cysteinowe oraz metaloproteazy. W procesie degradacji szczególną rolę odgrywają proteazy serynowe. Wysoka aktywność tego enzymu jest ściśle skorelowana z indukcją cytotoksyczności w komórkach gospodarza [1, 33, 44, 56]. Istotność proteazy serynowej zauważono podczas inkubacji ameb z inhibitorem proteazy serynowej (PMSF), podczas której zaobserwowano zmniejszenie efektu cytotoksycznego na zainfekowane komórki. Wyniki tych testów zostały potwierdzone metodą wyciszania genów [25, 33, 56]. W miarę rozwoju zarażenia destrukcji ulega kolagen typu I, odpowiedzialny za utrzymanie integralności zrębu rogówki, oraz immunoglobulina zawarta w łzach (slgA), pierwsza bariera immunologiczna dla drobnoustrojów [25, 33].

Kolejnym etapem w procesie niszczenia zainfekowanych komórek jest fagocytoza. Powierzchnie ameby pokrywają specyficzne struktury, tzw. food cups, umożliwiające fagocytowanie niewielkich części komórek gospodarza [25, 33, 56]. Podczas obserwacji mikroskopowych w komórkach zainfekowanego nabłonka rogówki zauważono specyficzne zmiany wskazujące na apoptozę komórki takie jak: ciała apoptotyczne, zmiany w błonie komórkowej, kondensacja chromatyny i fragmentacja DNA [25, 33].

Finalnym efektem infekcji jest zapalenie nerwów rogówki. Nie zaobserwowano trofozoitów w śródbłonku rogówki oraz w komorze przedniej gałki ocznej [12].



Rys. 3. Naciek promieniowy rogówki w zarażeniu AK
Zdjęcie wykonane za pomocą lampy szczelinowej [61].

Objawy AK są niespecyficzne, trudne do jednoznacznego rozpoznania. Ze względu na podobieństwo obrazów klinicznych AK i innych schorzeń oka często początkowo stawiana jest błędna diagnoza. Symptomy mogą utrzymywać się miesiącami [10, 16, 33]. Jednymi z pierwszych objawów AK są światłowstręt, łzawienie oraz obniżona ostrość widzenia. W miarę rozwoju zapalenia mogą wystąpić takie dolegliwości jak: silny ból oka, zaczerwienienie oka, owrzodzenie rogówki, naciek promieniowy rogówki, obrzęk powieki, opadająca powieka, zapalenie spojówek oraz uczucie obecności ciała obcego. W konsekwencji AK może prowadzić do trwałej utraty wzroku [32, 66].

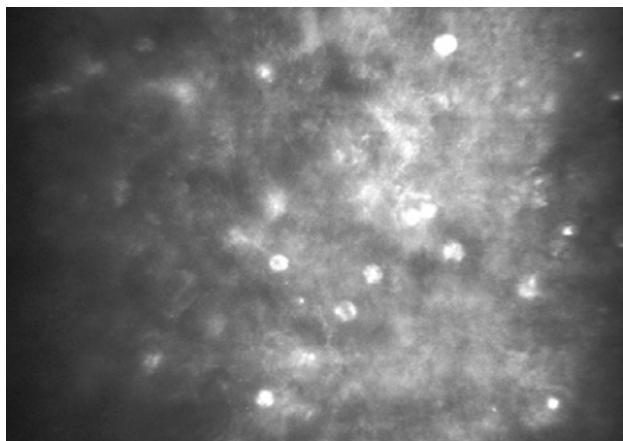
Naciek promieniowy rogówki (Rys. 3) jest charakterystycznym, wczesnym objawem AK, lecz występuje tylko w 50% przypadków [32, 66]. Jest również objawem wrzodziejącego zapalenia spojówek. Dodatkowo może być łatwo pominięty podczas rutynowego badania oka lampą szczelinową [2].

3.3. Diagnostyka

Rozpoznanie AK oparte jest na metodach takich jak mikroskopia świetlna, mikroskopia konfokalna czy hodowla *in vitro*. Coraz częściej diagnostyka poszerzana jest o techniki molekularne oraz immunologiczne [25, 55, 72]. W procesie diagnostycznym AK istotnym etapem jest prawidłowe pobranie próbki do badań. Rekomendowanym materiałem są zeszkrobiny rogówkowe lub tkanka pobrana podczas biopsji. Ameba przez bardzo krótki czas utrzymuje się na powierzchni nabłonka rogówki. Następnie, w miarę rozwoju zarażenia, penetruje kolejne jej warstwy. Dlatego nie zaleca się wykonywania testów z próbek powierzchniowych takich jak wymaz z gałki ocznej czy łzy, zwłaszcza w zaawansowanym stadium choroby lub po uprzedniej antybiotykoterapii. Optymalny materiał do procesu diagnostycznego AK to zeszkrobiny rogówki lub

materiał pobrany podczas biopsji rogówki, zanurzony w podłożu transportowym: PBS lub 0,9% NaCl, aby zapobiec wysychaniu. Po uzyskaniu i zabezpieczeniu próbki materiał jest bezpośrednio przeznaczany do izolacji DNA, zaś podłoże transportowe do hodowli na podłożu stałym (NN agar, opłaszczony bakteriami Gram-) lub płynnym (PBS z dodatkiem bakterii) [32].

Diagnostyka ciężkich przypadków może opierać się na preparatach bezpośrednich ze względu na dużą gęstość ameb [32]. Za użyteczną metodę diagnostyczną uznaje się też badanie lampą szczelinową zapewniającą powiększenie około 10–25 razy [29, 61]. Występujące na wczesnym etapie AK zmiany możliwe do zaobserwowania podczas badania lampą szczelinową to powierzchowne zmiany zapalne nabłonka rogówki, zmiany pseudodendrytyczne nabłonka rogówki, punktowe uszkodzenia nabłonka, nacieki promieniowy w centralnej części rogówki, zapalne ciała satelitarne oraz rozproszone ciała zapalne. Po około 3–8 tygodniach od zarażenia zauważyć można zmniejszenie się centralnej części rogówki, ropę w przedniej komorze oka, stany zapalne twardówki oraz neowaskularyzację [10]. Zwykle jednak za wstępny etap rozpoznania uznaje się metodę mikroskopii konfokalnej *in vivo*. Jest to szybka, nieinwazyjna metoda o wysokiej czułości diagnostycznej [10, 23, 44, 47]. Mikroskopia konfokalna daje również możliwość wykrycia w preparacie cyst oraz trofozoitów. Istnieje jednak możliwość błędnej interpretacji, ze względu na podobieństwo form morfologicznych ameb do innych komórek gałki ocznej. W preparacie obserwowanym pod mikroskopem konfokalnym, cysty to sferyczne, hiperrefleksyjne struktury o podwójnej ścianie, przypominające leukocyty lub jądra komórek nabłonka rogówki (Rys. 4). Trofozoity zaś morfologicznie podobne są do keratocytów oraz jąder leukocytów [10, 44, 69]. Ze względu na możliwość pomyłki, osoba oceniająca preparat powinna dokładnie znać morfologię rozróżnianych komórek [10]. Metoda



Rys. 4. Hiperrefleksyjne cysty *Acanthamoeba* spp. w miejscu owrzodzenia rogówki w przebiegu AK
Zdjęcie wykonane *in vivo* za pomocą mikroskopu konfokalnego [61].

mikroskopii konfokalnej jest użyteczna w przypadku szczepów o wysokiej żywotności, intensywnym tempie podziałów, mogących przetrwać na podłożu hodowlanym przez około 42 miesiące. W przypadku szczepów o niskiej żywotności i krótkim, około 10-dniowym czasie przeżycia w hodowli, mikroskopia konfokalna nie jest w pełni wiarygodna. Dodatkowym ograniczeniem jest mała gęstość ameb w preparacie (np: we wczesnym stadium AK), występowanie infekcji mieszanych oraz wdrożenie antybiotykoaterapii [9, 10, 32].

Ze względu na niespecyficzność objawów oraz podobieństwo obserwowanych zmian w gałce ocznej AK często w swojej początkowej fazie mylone jest z wirusowym zapaleniem rogówki wywoływanym przez wirusa HSV. W późniejszych stadiach zarażenia, błędy w diagnozie mogą wynikać z podobieństwa obrazu klinicznego AK do bakteryjnego (np.: wywoływanego przez *Pseudomonas aeruginosa*) lub grzybiczego (np: wywoływanego przez grzyby z rodzaju *Candida* lub *Fusarium*) zapalenia rogówki. Udowodniono również, że około 50% zakażeń to infekcje mieszane [8–10, 73].

Za „złoty standard” w diagnostyce AK uznaje się hodowle na podłożach wzbogaconych [10, 32, 54]. Próbkę kliniczną posiewa się na podłoże NN agar, opłaszczony wcześniej bakteriami Gram- z 24 h hodowli, np: *Escherichia coli* lub *Enterobacter aerogenes*. Hodowle inkubuje się w 30°C przez 7 dni. Wzrost ameb na szalce ocenia się przy użyciu mikroskopu odwróconego z kontrastem fazowym. W przypadkach ciężkich zarażeń wzrost ameb zauważalny jest już po 24–48 h. Alternatywnie hodowlę można założyć w butelce hodowlanej. Próbkę zawiesza się w PBS z dodatkiem bakterii [32]. Hodowla na podłożu wzbogaconym o antybiotyki (penicylinę, streptomycynę) pozwala na możliwość klasyfikacji cyst do określonych grup morfologicznych [10].

Aktualnie coraz większe znaczenie w procesie diagnostycznym mają metody molekularne oparte na technice PCR i jej odmianach. Dzięki nim można przypisać dany szczep ameb do odpowiedniej grupy morfologicznej. W przypadku odmiennej morfologii metody molekularne są niezbędnym etapem rozpoznania. Amplifikacja DNA wizualizowana jest podczas elektroforezy na żelu agarozowym. Genotypowanie potwierdza wiarygodność identyfikacji [10, 32, 49, 53].

Metody immunologiczne nie mają dużej wartości diagnostycznej ze względu na powszechność ameb w środowisku. Specyficzne przeciwciała, wykorzystywane podczas testów tego typu, są również obecne u osób zdrowych [32].

3.4. Leczenie i profilaktyka

Aktualnie nie istnieje jednoznacznie skuteczna terapia przeciwko AK. Znane metody leczenia są często nieefektywne, toksyczne i długotrwałe. Znaczny wpływ

na powodzenie terapii ma wczesne, prawidłowe rozpoznanie [33, 72, 73]. Trudności w leczeniu AK spowodowane są takimi czynnikami jak: zaawansowane stadium choroby wynikające z błędnej diagnozy, szerokie spektrum wirulencji szczepów, infekcje mieszane, wysoka oporność ameb na leki, transformacja trofozoitów w silnie oporną formę przetrwaną czy brak korelacji między wynikami testów laboratoryjnych *in vitro* i *in vivo* [8, 40, 55, 72].

Obecnie leczeniem pierwszego rzutu podczas AK są diamidy takie jak: propamidyna, heksamidyna oraz biguanidy takie jak: chlorowoderek poliheksametylenubiguanidyny (PHMB) czy chlorheksydyna. Monoterapia jest zalecana tylko w przypadku wcześniej zdiagnozowanych pacjentów. Związki te zwiększają przepuszczalność błony komórkowej ameb poprzez łączenie się wysoko dodatnio naładowanych cząstek z mukopolisacharydowymi częściami ostioli. W efekcie penetrują amebę doprowadzając do jej lizy i śmierci [30, 31]. PHMB i chlorheksydyna są efektywne w niskich stężeniach, PHMB ma toksyczny wpływ na nabłonek rogówki [27, 32, 33].

W przypadku zaawansowanego stadium choroby stosowane jest leczenie mieszane. Chlorheksydyna (0,02–0,2%) używana jest głównie w połączeniu z PHMB (0,02–0,06%) i izetionianempropamidyny (0,1%). Prawidłowe dawkowanie to: 1–2 krople, raz na 1 h, od 3 do 9 dni. Po upływie tego czasu należy zmniejszyć częstotliwość podawania leku do 1–2 kropli, raz na 3 h. Pierwsze efekty powinny być zauważalne 2 tygodnie od rozpoczęcia leczenia. Maksymalny czas terapii to 3–4 tygodnie. Ze względu na możliwość nawrotu choroby, pacjenci powinni pozostawać pod ścisłą kontrolą lekarską. W trakcie ustępowania objawów choroby badania kontrolne należy przeprowadzać 1–2 razy w tygodniu. Po zakończeniu terapii, przez 6 miesięcy, wskazane jest kontrolowanie stanu rogówki raz w miesiącu [10, 22, 32]. Przeprowadzono również testy terapii mieszanych: chlorheksydyny z dibromopropamidyną i neomycyną. Leczenie to przynosi skutki tylko na wczesnym etapie zarażenia [4, 25, 33]. U niektórych pacjentów zastopowanie rozwoju choroby następowało po podaniu 1% mikonazolu z 1% propamidyną oraz itraconazolu z 0,1% mikonazolem i ketokonazolem. Podobne efekty wywoływał również worykonazol [33, 72]. Stosowano również chlorheksydynę w połączeniu z jodkiem powidonu oraz PHMB razem z flukonazolem [18, 27, 64].

W przypadku późno zdiagnozowanych infekcji, połączonych z ostrym stanem zapalnym, pomocniczo w terapii stosowane są kortykosteroidy. Jednak ze względu na skutki uboczne takie jak: osłabienie układu immunologicznego pacjenta zahamowanie procesu transformacji ameb, zwiększenie tempa podziałów czy wzrost patogenności, wykorzystywanie kortykosteroidów jest uznane za metodę kontrowersyjną [32, 33, 67].

Gdy leczenie farmakologiczne nie przynosi oczekiwanych rezultatów, przeprowadzany jest przeszczep rogówki. Wskazaniami do transplantacji są: znaczne pogorszenie wzroku, ciężkie uszkodzenia nabłonka oraz wyraźne zmniejszenie grubości rogówki. Istnieje jednak ryzyko zakażenia rogówki dawcy podczas operacji [22, 26, 32, 33]. Obiecującą metodą leczenia jest modyfikacja klasycznej transplantacji rogówki – DALK. Charakteryzuje się ona niższym współczynnikiem odrzutów przeszczepu oraz zmniejszeniem liczby nawrotów spowodowanych zakażeniami śródoperacyjnymi [45].

W miarę rozwoju badań nad AK opracowywane są nowe metody leczenia, głównie wykorzystujące techniki biologii molekularnej. Głównym celem tych badań jest opracowanie maksymalnie skutecznej terapii przy minimalnej toksyczności dla pacjenta. W terapii AK zastosowano leczenie przeciwnowotworowe oraz zsyntetyzowano siRNA, który w przypadku AK wykorzystano do identyfikacji nowych celów terapeutycznych w komórce ameby [33, 39].

W ostatnich latach nastąpił silny rozwój nanotechnologii. Syntetyzowane nanocząstki, głównie srebra i złota, znalazły zastosowanie, jako środki przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe oraz przeciwgrzybiczne nowej generacji [51]. Przeprowadzone badania własne potwierdzają działanie przeciwamebowe różnych rodzajów nanocząstek srebra w stężeniach bliskich granicy cytotoksyczności dla komórek ludzkich [20].

Niezwykle istotnym aspektem w procesie terapeutycznym AK jest obecność silnie opornych cyst mogących wywołać nawrót choroby nawet po wielu miesiącach od zakończenia leczenia [33]. Dlatego tak ważnym jest opracowanie metody leczenia zapobiegającej przekształcaniu się formy troficznej w formę przetrwaną. Niektóre testy wykazały inaktywujący wpływ promieniowania mikrofalowego [21], pulsacyjnego pola elektrycznego [68] oraz promieniowania ultrafioletowego [48] na cysty, jednakże metody te wymagają dalszej, wnikliwej analizy.

Ze względu na brak skutecznego leczenia AK istotne jest udostępnianie i rozpowszechnianie wiedzy na temat działań profilaktycznych. Zalecenia te powinny zawierać w szczególności informacje na temat [10, 33]:

- prawidłowej higieny soczewek kontaktowych,
- odpowiedzialnego użytkowania soczewek kontaktowych,
- zachowania szczególnej ostrożności podczas podróży do krajów o klimacie tropikalnym,
- niepokojących objawów i odpowiedniej na nie reakcji.

Użytkownicy soczewek kontaktowych często zbyt późno zgłaszają się do lekarza. Jest to spowodowane zmniejszeniem wrażliwości na dyskomfort, np: ból oka ze względu na ciągłe podrażnianie gałki ocznej przez

soczewkę. Należy pamiętać, aby w przypadku jakichkolwiek niepokojących dolegliwości niezwłocznie zgłosić się do lekarza okulisty [32].

4. Ziarniniakowe pełzakowe zapalenie mózgu – GAE

GAE jest to rzadkie schorzenie centralnego układu nerwowego wywoływane przez ameby z rodzaju *Acanthamoeba*. W sumie na świecie odnotowano około 200 przypadków zachorowań na tę jednostkę chorobową. Choroba ma charakter jednostkowy, dlatego część przypadków najprawdopodobniej mogła zostać nieopisana z powodu błędnej diagnozy. Dotychczas w Polsce nie potwierdzono zachorowań na GAE [30, 66].

4.1. Przebieg zarażenia

Infekcja centralnego układu nerwowego ma charakter oportunistyczny. Dotyka osób o obniżonej odporności, np: chorych na AIDS, cierpiących na choroby przewlekłe takie jak cukrzyca, przyjmujących leki immunosupresyjne po przeszczepach narządów oraz osób upośledzonych umysłowo. Czynniki ryzyka infekcji są również alkoholizm, anoreksja, ciąża oraz leczenie przeciwnowotworowe (chemioterapia, radioterapia). Notowano również pojedyncze przypadki zachorowań niezwiązane z zaburzeniami mechanizmów immunologicznych [5, 66, 72]. Wrotami zarażenia są płuca, zmiany skórne lub nabłonek węchowy, skąd ameby przedostają się do układu krwionośnego. Zajęcie centralnego układu nerwowego następuje po przekroczeniu bariery krew-mózg. Oprócz centralnego układu nerwowego, zainfekowany może być również szpik kostny oraz inne narządy, takie jak: wątroba, nerki czy trzustka [25, 66]. Patogeneza zarażenia nie jest dokładnie poznana. Okres inkubacji choroby jest zmienny, trwa od 10 dni do kilku miesięcy. Sama infekcja zaczyna się nagle i objawia się silnymi bólami głowy, wysoką temperaturą, wymiotami, sztywnością karku, napadami padaczkowymi, zaburzeniami wzroku, węchu i smaku oraz zaburzeniami psychicznymi takimi jak halucynacje, zaburzenia świadomości czy dezorientacja. W 90% przypadków GAE prowadzi do śmierci [55, 66, 72].

4.2. Diagnostyka i leczenie

Diagnostyka GAE opiera się na preparatach bezpośrednich obserwowanych pod mikroskopem kontrastowo-fazowym, preparatach trwałych, barwionych metodą Wrighta lub Giemsy oraz badaniu płynu mózgowo-rdzeniowego. Analiza bioptatów stwierdza pleocytozę z przewagą limfocytów, podwyższone stężenie białka oraz obniżone stężenie glukozy [36, 37,

72]. Obiecującą metodą diagnostyczną jest PCR na podstawie DNA uzyskanego z materiału biopsyjnego. Technika ta daje nadzieję na szybszą diagnozę i wcześniejsze rozpoczęcie leczenia [35, 66].

Aktualnie nie istnieje żadna w pełni skuteczna terapia przeciwko GAE. Obecne metody leczenia obejmują podanie dożylnie kombinacji pochodnych azolowych, takich jak: ketokonazol, itrakonazol, flukonazol oraz rifampicyny, sulfodiazyny, erytromycyny i flucytozyny. Postępowanie to jest nieefektywne i nadzwyczaj rzadko prowadzi do sukcesu terapeutycznego. Odnotowane przypadki wyzdrowień mają charakter incydentalny [24, 37, 66].

5. Akantameboza skórna

Akantameboza skórna to rzadko spotykane, schorzenie powłok skórnych, wywoływane przez pełzaki z rodzaju *Acanthamoeba*. Patogeneza zarażenia nie została do tej pory w pełni wyjaśniona. Nie jest również jasne, czy zmiany skórne są głównym elementem infekcji, czy też wynikiem rozprzestrzeniania się patogenów na powłokach skórnych z innych narządów, np: układu oddechowego, zatok czy centralnego układu nerwowego [17, 36].

5.1. Przebieg zarażenia

Infekcja dotyczy głównie osób z zaburzeniami układu odpornościowego. Główną grupą podwyższonego ryzyka są osoby chorujące na AIDS, osoby zażywające leki obniżające odporność, np: w wyniku przeszczepu narządów oraz osoby cierpiące na choroby na tle immunologicznym [36, 41, 70]. Wrotami zarażenia są skóra, zatoki węchowe oraz górne drogi oddechowe. Okres inkubacji choroby jest różny i może wynosić od kilku tygodni do kilku miesięcy. Wczesne objawy infekcji to obecność trudno gojących się ran ropnych oraz owrzodzeń, z tendencją do rozprzestrzeniania się. Z czasem pojawiają się twarde skórne guzki rumieniowate, ziarniniakowe zmiany skórne oraz ostre stany zapalne ran. Dodatkowym objawem może być zapalenie zatok nosowych [36, 50]. Śmiertelność w wyniku akantamebozy skórnej wynosi ok 70%. W przypadku pacjentów z zainfekowanym centralnym układem nerwowym wynosi 100% [36, 65].

5.2. Diagnostyka i leczenie

Diagnostyka akantamebozy skórnej bazuje na badaniach histologicznych oraz hodowli *in vitro*. W wyniku barwienia preparatu biopsyjnego barwnikami hematoxylina-eozyna, kalkofluorem czy metodą Shiffa, zaobserwować można ogniska martwicy komórek otoczone

przez wrzodzące pola, oznaki zapalenia naczyń oraz obecność cyst i trofozoitów ameb [36, 38].

W przypadku hodowli materiał pobrany bezpośrednio z rany posiewa się na agar nieodżywczy, opłaszczony *E. coli* lub *P. aeruginosa*. Wzrost oceniany jest po tygodniu od rozpoczęcia hodowli, jednakże jego prawidłowa ocena jest utrudniona ze względu na zjawisko encystacji. Badanie zakończone wynikiem negatywnym należy powtórzyć. Do diagnostyki akantamebozy skórnej wprowadza się również metody z zakresu biologii molekularnej, takie jak RFLP-PCR czy RAPD-PCR oraz metody immunocytochemiczne [36, 38].

Ze względu na zbliżony obraz kliniczny, akantameboza skórna bywa mylona z innymi chorobami skóry. Rany wyglądem przypominają zakażenia bakteryjne (mykobakteriozy), grzybicze (blastomykoza), wirusowe (cytomegalia) oraz zmiany zapalne pourazowe. Z tego względu często stawiana jest błędna diagnoza. Objawy infekcji przypominają również symptomy choroby kociego pazura, mięsaka Kapossiego, angiomatozy pachwinowej czy penniciliozy [36].

Do tej pory nie opracowano standardów leczenia akantamebozy skórnej. Obecnie stosowane preparaty to: itrakonazol, pentamidyna, 5-fluocytozyna, diglukonianchlorheksydyny czy ketokonazol. Zwykle jednak metody te nie przynoszą pozytywnych efektów [36, 57]. Opisano również pojedyncze przypadki zastosowania leczenia chirurgicznego połączonego z leczeniem farmakologicznym [63].

6. Podsumowanie

Pełzaki wolno żyjące z rodzaju *Acanthamoeba* to kosmopolityczne ameby, charakteryzujące się dużą rezerwą adaptacyjną. Jako fakultatywne pasożyty stanowią istotne zagrożenie dla zdrowia i życia ludzkiego. Wywoływane przez nie jednostki chorobowe takie jak: AK czy GAE, to silne infekcje o niespecyficznym objawach i przebiegu. Pomimo wieloletnich badań podejmowanych w różnych ośrodkach naukowych i klinicznych na całym świecie, brakuje opracowanych algorytmów postępowania, przez co przeprowadzenie prawidłowego procesu diagnostycznego oraz wdrożenie skutecznego leczenia jest w dalszym ciągu problematyczne. Obecnie prowadzone badania ukierunkowane są głównie na sformułowanie skutecznej terapii. Nowo opracowywane metody eradykacji ameb wykorzystują między innymi techniki z dziedziny biologii molekularnej czy nanotechnologii. Ze względu na szerokie spektrum występowania ameb, popularność używania soczewek kontaktowych oraz brak świadomości społecznej istniejącego zagrożenia, infekcje oka wywołane przez ameby z rodzaju *Acanthamoeba* są problemem, którego ranga będzie wzrastać. Propagowanie

i poszerzanie wiedzy na temat możliwych działań profilaktycznych oraz prowadzenie dalszych badań mających na celu doskonalenie obecnych metod diagnostyki i leczenia to istotne i pożądane działania mające na celu redukcję ryzyka zarażenia oraz poprawienie skuteczności leczenia akantamebozy.

Piśmiennictwo

1. Adl S.M., Taylor M.F.J.R i wsp.: The new higher-level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* **52**, 399–451 (2005)
2. Alfawaz A.: Radial keratoneuritis as a presenting sign in *Acanthamoeba* keratitis. *Mid. East. Afr. J. Ophthalmol.* **18**, 252 (2011)
3. Arnalich-Montiel F., Almendral A., Arnalich F., Valladares B., Lorenzo-Morales J.: Mixed *Acanthamoeba* and multidrug-resistant *Achromobacter xyloxydans* in late-onset keratitis after laser in situ keratomileusis. *J. Cataract. Refr. Sur.* **38**, 1853–1856 (2012)
4. Astorga B., Lorenzo-Morales J., Martín-Navarro C.M., Alarcón V., Moreno J., González A.C., Navarette E., Piñero J.E., Valladares B.: *Acanthamoeba* Belonging to T3, T4, and T11: Genotypes Isolated from Air-Conditioning Units in Santiago, Chile. *J. Eukaryot. Microbiol.* **58**, 542–544 (2011)
5. Barete S., Combes A., de Jonckheere J.F., Datry A., Varnous S., Martinez V.: Fatal disseminated *Acanthamoeba lenticulata* infection in a heart transplant patient. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 736–738 (2007)
6. Chalmers R.M.: *Acanthamoeba* (w) Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks (second edition), red. S.L. Percival, M.V. Yates, D.W. Williams, R.M. Chalmers, N.F. Grey, Academic Press, UK, 2014, 263–276
7. Cholewiński M., Hadaś E., Derda M., Wojt J.W., Skrzypczak Ł.: Występowanie patogenicznych pełzaków wolno żyjących z rodzaju *Acanthamoeba* w piaskownikach miejskich. *Nowiny Lekarskie*, **82**, 138–141 (2013)
8. Chomicz L., Conn D.B., Padzik M., Szaflik J.P., Walochnik J., Zawadzki P.J., Pawłowski W., Dybicz M.: Emerging threats for human health in Poland: pathogenic isolates from drug resistant *Acanthamoeba* keratitis monitored in terms of their in vitro dynamics and temperature adaptability. *Bio. Med. Res. Int.* DOI:10.1155/2015/231285 (2015)
9. Chomicz L., Padzik M., Szaflik J.P., Nahorski W.L., Kryczka T., Szaflik J.: Monitoring of in vitro dynamics of *Acanthamoeba* strains isolated from infected eyes as a useful tool in keratitis management. *Exp. Parasitol.* **145**, 73–77 (2014)
10. Chomicz L., Szaflik J.P., Padzik M., Izdebska J.: *Acanthamoeba* keratitis: The Emerging Vision-2 Threatening Corneal Disease. *Advances in Common Eye Infections, Intech.* **2016**, 99–120 (2016)
11. Chomicz L., Żebrowska J., Starościak B., Piekarczyk J., Fiedor P., Zawadzki P., Mazurkiewicz M., Konopka M.: Badania nad amfibiozycznymi amebami pierwotnie wolnożyjącymi – biotyczne i abiotyczne uwarunkowania zagrożeń dla ludzkiego zdrowia. *Med. Dydak. Wychow.* **9**, 34–39 (2003)
12. Clarke B., Sinha A., Parmar D.N., Sykakis E.: Advances in the diagnosis and treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *J. Ophthalmol.* **2012**, 484–492 (2012)
13. Dart J.K., Saw V.P., Kilvington S.: *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis and treatment update 2009. *American. J. Ophthalmol.* **148**, 487–499 (2009)

14. Demirci G., Ay G.M., Karabas L.V., Altintas Ö., Tamer G.S., Çağlar, Y.: *Acanthamoeba* keratitis in a 5-year-old boy without a history of contact lens usage. *Cornea*, **25**, 356–358 (2006)
15. Derda M., Hadaś E., Wojtkowiak-Giera A., Wojt, J.W., Cholewiński M., Skrzypczak Ł.: Występowanie pełzaków pierwotnie wolno żyjących w fontannach. *Probl. Hig. Epidemiol.* **94**, 147–150 (2013)
16. Edagawa A., Kimura A., Kawabuchi-Kurata T., Kusuhara Y., Karanis P.: Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* species from tap-water sources in Osaka, Japan. *Parasitol. Res.* **105**, 1109–1117 (2009)
17. Friedland L.R., Raphael S.A., Deutsch E.S., Johal J., Martyn L.J., Visvesvara G.S., Lischner H.W.: Disseminated *Acanthamoeba* infection in a child with symptomatic human immunodeficiency virus infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **11**, 404–407 (1992)
18. Gatti S., Cevini C., Bruno A., Penso G., Rama P., Scaglia M.: *In vitro* effectiveness of povidone-iodine on *Acanthamoeba* isolates from human cornea. *J. Antimicrob. Agents. Chemother.* **42**, 2232–2234 (1998)
19. Hadaś E., Mazur T.: Proteolytic enzymes of pathogenic and non-pathogenic strains of *Acanthamoeba* spp. *Trop. Med. Parasitol.* **44**, 197–200 (1993)
20. Hendiger E.B.: Wpływ nanocząstek srebra i złota oraz jodopowidonu na przeżywalność ameb z rodzaju *Acanthamoeba*. Praca magisterska, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej (2017)
21. Hiti K., Walochnik J., Faschinger C., Haller-Schober E.M., Aspöck H.: Microwave treatment of contact lens cases contaminated with *Acanthamoeba*. *Cornea*, **20**, 467–470 (2001)
22. Izdebska J., Uliasz A., Szaflik J.P., Szaflik J.: *Acanthamoeba* keratitis – Conservative and Surgical Treatment. *Okulistyka*, **1**, 26 (2014)
23. Kanavi M.R., Javadi M., Yazdani S., Mirdehghanm S.: Sensitivity and specificity of confocal scan in the diagnosis of infectious keratitis. *Cornea*, **26**, 782–786 (2007)
24. Khan N.A.: *Acanthamoeba* and the blood-brain barrier: the breakthrough. *J. Med. Microbiol.* **57**, 1051–1057 (2008)
25. Khan N.A.: *Acanthamoeba* biology and increasing importance in human health. *FEMS. Microbiol. Rev.* **30**, 564–595 (2006)
26. Kitzmann A.S., Goins K.M., Sutphin J.E., Wagoner M.D.: Keratoplasty for treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *Ophthalmology*, **116**, 864–869 (2009)
27. Kumar R., Lloyd D.: Recent advances in the treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *Clin. Infect. Dis.* **35**, 434–441 (2002)
28. Leońska-Duniec A.: Pełzaki wolno żyjące jako wektory mikroorganizmów chorobotwórczych. *Probl. Hig. Epidemiol.* **92**, 173–180 (2011)
29. Leońska-Duniec A.: Problemy w określeniu chorobotwórczości pełzaków wolno żyjących z rodzaju *Acanthamoeba*. *Probl. Hig. Epidemiol.* **94**, 24–30 (2013)
30. Leońska-Duniec A.: Występowanie potencjalnie chorobotwórczych pełzaków wolno żyjących w Polsce. *Probl. Hig. Epidemiol.* **96**, 335–339 (2015)
31. Lim N., Goh D., Bunce C., Xing W., Fraenkel G., Poole T.R., Ficker L.: Comparison of polyhexamethylenebiguanide and chlorhexidine as monotherapy agents in the treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *American. J. Ophthalmol.* **145**, 130–135 (2008)
32. Lorenzo-Morales J., Khan N.A., Walochnik J.: An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*, **22**, 10 (2015)
33. Lorenzo-Morales J., Martín-Navarro C.M., López-Arencibia A., Arnalich-Montiel F., Piñero J.E., Valladares B.: *Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? *Trends. Parasitol.* **29**, 181–187 (2013)
34. Łanocha N., Kosik-Bogacka D., Kuźna-Grygiel W.: Rola pełzaków wolno-żyjących w wywoływaniu i transmisji chorób u ludzi i zwierząt. *Probl. Hig. Epidemiol.* **90**, 165–170 (2009)
35. MacLean R.C., Hafez N., Tripathi S., Childress C.G., Ghatk N.R., Marciano-Cabral E.: Identification of *Acanthamoeba* sp. in paraffin-embedded CNS tissue from an HIV+ individual by PCR. *Diag. Microb. Infect. Dis.* **57**, 289–294 (2007)
36. Marciano-Cabral E., Cabral G.: *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 273–307 (2003)
37. Martinez A.J., Visvesvara G.S.: Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain. Pathol.* **7**, 583–598 (1997)
38. Martinez A.J., Visvesvara G.S.: Laboratory diagnosis of pathogenic free-living amoebas: *Naegleria*, *Acanthamoeba*, and *Leptomyxid*. *Clin. Lab. Med.* **11**, 861 (1991)
39. Martín-Navarro C.M., Lorenzo-Morales J., Machin R.P., López-Arencibia A., García-Castellano J.M., de Fuentes I., Loftus B., Sutherland K.M., Valladares B., Piñero J.E.: Inhibition of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme a reductase and application of statins as a novel effective therapeutic approach against *Acanthamoeba* infections. *Antimicrob. Agents. Ch.* **57**, 375–381 (2013)
40. Mazur T., Hadaś E., Iwanicka I.: The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. *Trop. Med. Parasitol.* **46**, 106–108 (1995)
41. Murakawa G.J., McCalmont T., Altman J., Telang G.H., Hoffman M.D., Kantor G.R., Berger, T.G.: Disseminated acanthamebias in patients with AIDS: a report of five cases and a review of the literature. *Arch. Dermatol.* **131**, 1291–1296 (1995)
42. Nagington J., Watson P.G., Playfair T.J., McGill J., Jones B.R., Steele A.D.: Amoebic infections of the eye. *Lancet*, **304**, 1537–1540 (1974)
43. Niyyati M., Lorenzo Morales J., Rezaie S., Rahimi F., Mohebbali M., Maghsood A.M.: Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* strains from dust sources in Iran. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **103**, 425–427 (2009)
44. Panjwani N.: Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. *Ocul. Surf.* **8**, 70–79 (2010)
45. Parthasarathy A., Tan D.T.H.: Deep lamellar keratoplasty for *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea*, **26**, 1021–1023 (2007)
46. Radford C.F., Minassian D.C., Dart J.K.: *Acanthamoeba* keratitis in England and Wales : incidence, outcome, and risk factors. *Br. J. Ophthalmol.* **86**, 536–542 (2002)
47. Rezaei K.M., Naghshgar N., Javadi M. A., Sadat H.M.: Various confocal scan features of cysts and trophozoites in cases with *Acanthamoeba* keratitis. *Eur. J. Ophthalmol.* **22**, 46–50 (2011)
48. Rivera F., Lares F., Ramirez E., Bonilla P., Rodriguez S., Labastida A., Ortiz R., Hernandez D.: Pathogenic *Acanthamoeba* isolated during an atmospheric survey in Mexico City. *Rev. Infect. Dis.* **13**, 388–389 (1991)
49. Rivière D., Szczepara F.M., Berjeaud J.M., Frère J., Héchard Y.: Development of a real-time PCR assay for quantification of *Acanthamoeba* trophozoites and cysts. *J. Microbiol. Meth.* **64**, 78–83 (2006)
50. Rosenthal S., Reed E.J., Weisman R.A.: Effect of lytic enzymes of *Acanthamoeba castellanii* on bacterial cell walls. *J. Bacteriol.* **98**, 182–189 (1969)
51. Rzeszutek J., Matysiak M., Czajka M., Sawicki K., Rachubik P., Kruszewski M., Kapka-Skrzypczak Ł.: Zastosowanie nanocząstek i nanomateriałów w medycynie. *Hygeia Public. Health.* **49**, 449–457 (2014)
52. Samples J.R., Binder P.S., Luibel F.J., Font R.L., Visvesvara G.S., Peter C.R.: *Acanthamoeba* keratitis possibly acquired from a hot tub. *Arch. Ophthalmol.* **102**, 707–710 (1984)
53. Schroeder J.M., Booton G.C., Hay J., Niszl I.A., Seal D.V., Markus M.B., Fuerst P.A., Byers T.J.: Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identi-

- fication of *Acanthamoeba* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 1903–1911 (2001)
54. Schuster F.L.: Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clin. Microbiol. Rev.* **15** (3), 342–354 (2002)
 55. Schuster F.L., Visvesvara G.S.: Free-living amoebae as opportunistic and nonopportunistic pathogens of humans and animals. *Int. J. Parasitol.* **34**, 1–27 (2004)
 56. Siddiqui K., Khan N.: Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasit. Vectors.* **5**, 6 (2012)
 57. Slater C.A., Sickel J.Z., Visvesvara G.S., Pabico R.C., Gaspari A.A.: Successful treatment of disseminated *Acanthamoeba* infection in an immunocompromised patient. *New. Engl. J. Med.* **331**, 85–87 (1994)
 58. Stehr-Green J.K., Baily T.M., Visvesvara G.S.: The epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis in the United States. *Am. J. Ophthalmol.* **107**, 331–336 (1989)
 59. Stockman L.J., Wright C.J., Visvesvara G.S., Fields B.S., Beach M.J.: Prevalence of *Acanthamoeba* spp. and other free-living amoebae in household water, Ohio, USA – 1990–1992. *Parasitol. Res.* **108**, 621–627 (2011)
 60. Stothard D.R., Schroeder-Diedrich J.M., Awwad M.H., Gast R.J., Ledee D.R., Rodriguez-Zaragoza S., Dean C.L., Fuerst P.A., Byers T.J.: The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *J. Eukaryot. Microbiol.* **45**, 45–54 (1998)
 61. Szaflik J.P., Padzik M., Chomicz L., Oledzka G., Izdebska J.: Usefulness of *in vitro* diagnostics in difficult incidences of *Acanthamoeba* keratitis requiring pharmacotherapy and surgical management. *Okulistyka*, **3**, 28–32 (2012)
 62. Szénási Z., Endo T., Yagita K., Nagy E.: Isolation, identification and increasing importance of 'free-living' amoebae causing human disease. *J. Med. Microbiol.* **47**, 5–16 (1998)
 63. Teknos T.N., Poulin M.D., Laruentano A.M., Li K.K.: *Acanthamoeba* rhinosinusitis: characterization, diagnosis, and treatment. *Am. J. Rhinol.* **14**, 387–391 (2000)
 64. Tien S.H., Sheu M.M.: Treatment of *Acanthamoeba* keratitis combined with fungal infection with polyhexamethylenebiguanide. *Kaohsiung. J. Med. Sci.* **15**, 665–673 (1999)
 65. Torno M.S., Babapour R., Gurevitch A., Witt M.D.: Cutaneous acanthamoebiasis in AIDS. *J. Am. Acad. Dermatol.* **42**, 351–354 (2000)
 66. Trabelsi H., Dendana F., Sellami A., Sellami H., Cheikhrouhou F., Neji S., Makni F., Ayadi A.: Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. *Path. Biol.* **60**, 399–405 (2012)
 67. Tu E.Y., Joslin C.E., Nijm L.M., Feder R.S., Jain S., Shoff M.E.: Polymicrobial keratitis: *Acanthamoeba* and infectious crystalline keratopathy. *Am. J. Ophthalmol.* **148**, 13–19 (2009)
 68. Vernhes M.C., Benichou A., Pernin P., Cabanes P.A., Teissié J.: Elimination of free-living amoebae in fresh water with pulsed electric fields. *Water. Res.* **36**, 3429–3438 (2002)
 69. Villani E., Baudouin C., Efron N., Hamrah P., Kojima T., Patel S.V., Pflugfelder S.C., Zhivov A., Dogru M.: *In vivo* confocal microscopy of the ocular surface: from bench to bedside. *Curr. Eye. Res.* **39**, 213–231 (2014)
 70. Van Klink F., Alizadeh H., He Y., Mellon J.A., Silvary R.E., McCulley J.P., Niederkorn J.Y.: The role of contact lenses, trauma, and Langerhans cells in a Chinese hamster model of *Acanthamoeba* keratitis. *Invest. Ophth. Vis. Sci.* **34**, 1937–1944 (1993)
 71. Visvesvara G.S.: Free-living amoebae as opportunistic agents of human disease. *J. Neuroparasitol.* **34**, 1001–1027 (2010)
 72. Visvesvara G.S., Moura H., Schuster F.L.: Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **50**, 1–26 (2007)
 73. Walochnik J., Scheikl U., Haller-Schober E.M.: Twenty years of *Acanthamoeba* diagnostics in Austria. *J. Eukaryot. Microbiol.* **62**, 3–11 (2015)

Marek Bartoszewicz^{1*}, Urszula Czyżewska²

¹ Zakład Mikrobiologii, Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku

² Zakład Cytobiochemii, Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku

Wpłynęło w lipcu, zaakceptowano sierpniu 2017 r.

1. Wstęp. 2. Najważniejsze aspekty biologii *B. cereus* sensu lato. 2.1. Wyzwanie pierwsze – spójna taksonomia. 2.2. Wyzwanie drugie – cykle życiowe i interakcje z otoczeniem. 2.3. Wyzwanie trzecie – adaptacja do niskich temperatur. 2.4. Wyzwanie czwarte – toksyny *B. cereus* sensu lato. 3. Podsumowanie

Taxonomy, virulence and life cycles of *Bacillus cereus* sensu lato

Abstract: *Bacillus cereus* sensu lato is a group of several species of Gram-positive sporeformers ubiquitous in nature and showing huge impact on human activities. They are often found in soil, air, plant material, animal tissues and digestive tracts as well as in food products. Their genetic similarities and frequent horizontal gene transfer causes doubts regarding their taxonomy. In addition, their toxicity and psychrotolerance constitute serious problems in the dairy industry, being responsible for food-poisonings and spoilage of cold-stored products. Finally, recent finding indicate that *B. cereus* sensu lato toxicity plays an important role not only in their virulence, but also in social interactions with other bacteria.

1. Introduction. 2. The most important aspects of *B. cereus* sensu lato biology. 2.1. First challenge – coherent taxonomy. 2.2. Second challenge – life cycles and interactions with the environment. 2.3. Third challenge – adaptation to low temperatures. 2.4. Fourth challenge – toxins of *B. cereus* sensu lato. 3. Summary

Słowa kluczowe: cereulidyna, enterotoksyny, psychrotolerancja, taksonomia

Key words: cereulide, enterotoxins, psychrotolerance, taxonomy

1. Wstęp

Grupa *Bacillus cereus* określana także jako *B. cereus* sensu lato obejmuje co najmniej dziewięć gatunków względnie beztlenowych i przetrwalnikujących, Gram-dodatnich bakterii, szeroko rozprzestrzenionych w przyrodzie i wykazujących szeroki wpływ na różne obszary aktywności człowieka. W jej skład wchodzi: (i) *B. cereus* sensu stricto znany z właściwości chorobotwórczych w stosunku do ludzi [66], (ii) *B. thuringiensis* biosyntetyzujący toksyny owadobójcze [68], (iii) psychrotolerancyjny *B. weihenstephanensis* [40], (iv) *B. mycoides* oraz (v) *B. pseudomycoides* charakteryzujące się ryzoidalnym wzrostem na podłożach stałych [32, 52], (vi) *B. anthracis* będący czynnikiem etiologicznym wąglika [48], a także posiadający właściwości probiotyczne *B. toyonensis* [33], termotolerancyjny i cytotoksyczny *B. cytotoxicus* [25] oraz izolowany przede wszystkim z żywności *B. wiedmannii* [47]. Należy podkreślić, że w ostatnich latach pojawiły się też prace wskazujące na zasadność wyróżniania dalszych gatunków w obrębie grupy *Bacillus cereus*, m.in. *B. manliponensis* [34], *B. bingmayongensis* [41] oraz *B. gaemokensis* [35]. Przegląd najważniejszych cech poszczególnych przedstawicieli grupy *B. cereus* dostępny jest w literaturze [6].

B. cereus sensu lato, choć znane od dawna (np. *B. mycoides* opisany został już w 1886 r.), nadal budzą ogromne zainteresowanie z uwagi na ich powszechność, liczne czynniki wirulencji oraz odmienne interakcje z różnymi organizmami. Zwraca się też uwagę na to, iż *B. cereus* sensu lato poprzez skomplikowaną strukturę genetyczną, stanowią interesujący obiekt badań dostarczający użytecznych danych poszerzających naszą wiedzę w zakresie taksonomii i systematyki bakterii.

Na podstawie analiz podobieństwa sekwencji nukleotydowych rybosomalnego RNA oraz wybranych genów metabolizmu podstawowego, a także bazując na wynikach porównania elektroforetycznych wzorów prążków uzyskanych różnorodnymi metodami genotypowania (ang. DNA fingerprinting), zaproponowano, aby całą grupę *B. cereus* traktować jako jeden polimorficzny gatunek bakterii [27]. Z kolei dane fenotypowe, analizy stopnia hybrydyzacji genomowego DNA (DDH) oraz odmienne właściwości chorobotwórcze, tak ważne również w ujęciu praktycznym, zdają się sugerować, że mamy do czynienia z odrębnymi gatunkami [40, 52]. Fakt, że liczne cechy typowe dla poszczególnych taksonów są kodowane przez geny plazmidowe, dodatkowo komplikuje taksonomię grupy. Szczep *B. thuringiensis*, który w trakcie replikacji utraciłby plazmid z genami warunkującymi syntezę białek parasporalnych, stałby

* Autor korespondencyjny: Marek Bartoszewicz, Zakład Mikrobiologii, Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku, ul. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok; tel. 85 738 83 84; e-mail: mbartosz@uwb.edu.pl

się bowiem nieodróżnialny od szczepów *B. cereus* sensu stricto. Nabycie zaś przez *B. cereus* sensu stricto w drodze koniugacji genów *cry* warunkujących wspomnianą syntezę, mogłoby prowadzić do wykształcenia cech charakterystycznych dla *B. thuringiensis*. Należy zatem zadać sobie pytanie czy współczesna koncepcja gatunku bakteryjnego, zakładająca co najmniej 70% podobieństwo DDH, zgodność sekwencji 16S rRNA na poziomie > 97% oraz odmienność fenotypową w zakresie przynajmniej jednej cechy [14, 46], to dobre wyznaczniki gatunkowe, szczególnie w odniesieniu do tak polimorficznych bakterii, jak *B. cereus* sensu lato.

Innym obszarem intensywnych badań nad *B. cereus* sensu stricto i spokrewnionymi bakteriami jest kwestia ich cykli życiowych oraz interakcji pomiędzy biotycznymi składnikami różnorodnych ekosystemów. Dotychczas potwierdzono obecność wspomnianych bakterii między innymi na roślinach oraz w przewodach pokarmowych kręgowców i bezkręgowców, ale brak jednoznacznych dowodów na to czy fakt ten ma charakter mutualistyczny, pasożytniczy czy stanowi zależną od warunków kombinację różnych interakcji. Pomoc w odpowiedzi na to pytanie może przynieść także lepsze zrozumienie powodów, dla których liczne szczepy *B. cereus* sensu lato obdarzone są zdolnością do biosyntezy różnych toksyn, które mogą nie tylko stanowić czynnik ułatwiający kolonizację organizmów gospodarza, ale także mechanizm oddziaływania z innymi mikroorganizmami [60].

Dalsze badania nad *B. cereus* sensu lato pozwolą na lepsze zrozumienie ewolucji bakterii oraz ich interakcji ze środowiskiemżywionym i nieżywionym. Dlatego celem niniejszej pracy jest przedstawienie i dyskusja wątpliwości dotyczących filogenezy oraz taksonomii, toksyczności a także cykli i środowisk życia *B. cereus* sensu lato w kontekście aktualnych danych literaturowych.

2. Najważniejsze aspekty biologii *B. cereus* sensu lato

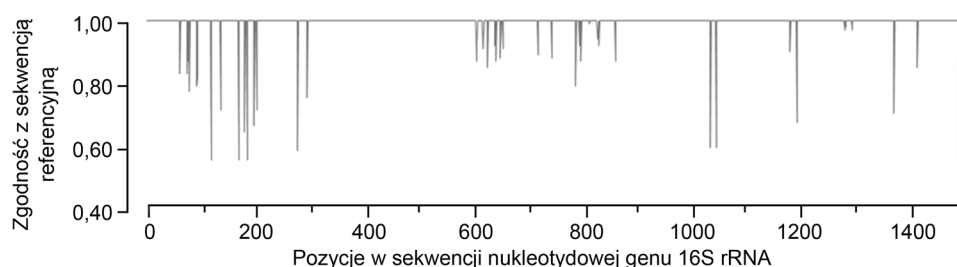
2.1. Wyzwanie pierwsze – spójna taksonomia

Współczesna taksonomia bakterii opiera się na podobieństwie pomiędzy klasyfikowanymi organizmami (taksonomia fenetyczna – bazująca na cechach

fenotypowych) oraz stopniu ich wzajemnego pokrewieństwa (taksonomia filetyczna – odzwierciedlająca stosunki filogenetyczne). Jednak bezpośrednie zastosowanie wyznaczników filo-fenetycznej koncepcji gatunku w odniesieniu do bakterii *B. cereus* sensu lato napotyka na poważne problemy. Już analizy podobieństwa sekwencji nukleotydowej, obecnego zwykle w podobnych 10–15 kopiach genu 16S rRNA wykazały, że *B. cereus* sensu lato różni się tylko nieznacznie wykazując 99,17–100% identyczności ww. sekwencji [1, 3], a sama zmienność ograniczona jest do regionów hiperzmiennych, poroździelanych obszarami o wysokim stopniu konserwatywności (Rys. 1). Ponadto stwierdzono, że gen 16S rRNA charakteryzuje się wyższą zmiennością u szczepów mezofilnych, podczas gdy u psychrotrofów jest silnie konserwatywny [3], co być może powiązane jest z adaptacją do zachowania zdolności do biosyntezy białek w niższej temperaturze. Przyjęto też, że obecność charakterystycznej sekwencji ¹⁰⁰²TCTAGAGATAGA w obrębie 16S rRNA wskazuje jednoznacznie na *B. weihenstephanensis* [40], jednak późniejsze wyniki nie potwierdziły tego przypuszczenia [3]. Bardziej prawdopodobne, że wspomniany fragment sekwencji typowy jest dla różnych przedstawicieli *B. cereus* sensu lato posiadających taki sam mechanizm adaptacji do chłodu.

W sytuacji, gdy porównywane sekwencje nukleotydowe genu 16S rRNA są identyczne w mniej niż 97%, możemy wyodrębnić odmienne gatunki. Jednak w przypadku różnic nieprzekraczających 3% możemy mieć do czynienia zarówno z odrębnymi gatunkami, jak i jednym tylko taksonem.

Podobieństwo profili elektroforetycznych w zakresie izoenzymów (*ang.* multi-locus enzyme electrophoresis, MLEE) oraz późniejsze badania w oparciu o polimorfizm sekwencji nukleotydowych genów metabolizmu podstawowego (*ang.* multi-locus sequence typing, MLST) także wykazują wysokie pokrewieństwo genetyczne przedstawicieli grupy *B. cereus*. Co więcej, wiarygodna z uwagi na bazowanie na sekwencjach nukleotydowych technika MLST pozwala z jednej strony na podział *B. cereus* sensu lato na typy filogenetyczne, z drugiej strony należy zaznaczyć, że poszczególne typy filogenetyczne grupują często przedstawicieli różnych



Rys. 1. Lokalizacja miejsc konserwatywnych i hiperzmiennych w sekwencji nukleotydowej genu 16S rRNA *B. cereus* sensu lato (Bartoszewicz M., dane niepublikowane)

gatunków. Wspomniany podział za to dobrze odzwierciedla właściwości ekologiczne [6, 26]. W oparciu o te dane należy zatem założyć, że pod wpływem doboru naturalnego, w obrębie *B. cereus* sensu lato uformowały się typy filogenetyczne o różnych zakresach temperatur optymalnych oraz, często, o odmiennej wirulencji. I tak typ I stanowią przede wszystkim szczepy *B. pseudomycoides*, w odniesieniu do których brak jest danych wskazujących na ich wirulencję. Typ II oraz VI obejmuje szczepy psychrotolerancyjne, które łatwo odróżnić na podstawie (typowej wyłącznie dla przedstawicieli typu VI: *B. weihenstephanensis* oraz część szczepów *B. thuringiensis*) sekwencji ⁴ACAGTT w obrębie genu *cspA* [3, 40, 58, 61]. Typ III to bakterie mezofilne o wyraźnym potencjale chorobotwórczym. Należą tu m.in. szczepy *B. anthracis* (m.in. *B. anthracis* Ames) oraz tzw. emetyczne szczepy *B. cereus* sensu stricto wraz z referencyjnym szczepem *B. cereus* sensu stricto F4810/72 (zdolne do wywoływania wymiotnej postaci zatruc pokarmowych) [5, 73]. Typ IV grupuje mezofilne, zwykle komensalne bakterie, m.in. typowy szczep referencyjny *B. cereus* sensu stricto ATCC 14579. Typ filogenetyczny V to umiarkowane pod względem wymagań temperaturowych szczepy spokrewnione z *B. toyonensis*, zaś typ VII obejmuje termotolerancyjne i powiązane z przypadkami ciężkich zatruc pokarmowych szczepy *B. cytotoxicus* [25]. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt występowania w różnych typach filogenetycznych przedstawicieli tego samego taksonu. Na przykład *B. cereus* sensu stricto obecny jest m.in. w typach filogenetycznych II, III, IV, natomiast *B. thuringiensis* wśród reprezentantów np. typu III oraz VI [6, 26, 47]. Pozwala to zadać pytanie o sensowność wyróżniania poszczególnych gatunków w sytuacji, gdy taka taksonomia nie odzwierciedla w pełni filogenezy *B. cereus* sensu lato.

Poza MLST, także sekwencjonowanie niektórych pojedynczych genów, m.in. *gyrB* [8] lub pleiotropowego regulatora ekspresji genów toksyn *plcR* oraz analizy AFLP (*ang.* amplified fragment length polymorphism) dostarczyło kolejnych ciekawych danych dotyczących pokrewieństwa genetycznego oraz struktury populacji *B. cereus* sensu lato. Nie pozwoliły one jednak na wypracowanie spójnego systemu taksonomicznego dla całej grupy. Choć w mocy pozostaje, stanowiący złoty standard, warunek by poziom hybrydyzacji DNA-DNA wynosił co najmniej 70%, to także ta metoda zawodzi w różnicowaniu np. *B. cereus* sensu stricto i *B. thuringiensis*. Nowym i wygodniejszym odpowiednikiem tej metody jest tzw. cyfrowa hybrydyzacja DNA-DNA (*ang.* digital DNA-DNA hybridization; dDDH) oparta na metodzie obliczania dystansu genetycznego w oparciu o zestawienia całych genomów (*ang.* genome-blast distance phylogeny; GBDP), której wyniki przeliczane są za pomocą odpowiedniego algorytmu na procent

dDDH [2]. Choć i to ujęcie nie zapewnia skutecznego odróżniania wielu przedstawicieli grupy, to z uwagi na porównanie całego genomu daje lepszy wgląd w powiązania filogenetyczne i pozwala szybko i skutecznie weryfikować słuszność wyróżniania nowych gatunków. To właśnie aplikacja tej metody doprowadziła do zaproponowania w ostatnich latach *B. gaemokensis* czy *B. manliponensis* jako nowych przedstawicieli grupy [34–35]. Liu i wsp. [42] wskazują na obecność co najmniej 19–20 nieopisanych jeszcze gatunków w obrębie *B. cereus* sensu lato. Z drugiej strony autorzy ci postulują także, aby *B. weihenstephanensis* oraz *B. mycoides* połączyć w jeden gatunek z uwagi na wysokie, ponad 78% podobieństwo dDDH pomiędzy nimi.

Kolejnym poważnym zarzutem dotyczącym spójności aktualnej taksonomii *B. cereus* sensu lato są, wykorzystywane w identyfikacji przedstawicieli grupy, cechy kodowane plazmidowo. I tak *B. anthracis*, poza opornością na penicylinę i brakiem ruchliwości, tworzy także nietypową, zbudowaną z kwasu D-glutaminowego, otoczkę chroniącą tą bakterię przed fagocytozą oraz syntetyzuje toksynę bójczą (*ang.* lethal toxin) oraz czynnik obrzękowy (*ang.* edema factor). Zarówno geny toksyn (*pag*, *lef*, *cya*), jak i otoczki (*cap*) są zlokalizowane na dużych plazmidach, odpowiednio pXO1 oraz pXO2 [49]. Z kolei u emetycznego szczepu *B. cereus* sensu stricto F4810/72, operon *ces* odpowiedzialny za produkcję syntetazy cereulidyny (toksyny wymiotnej), także ulokowany jest na dużym plazmidzie (pBc270) o wielkości 270 kbp [19, 29]. Synteza owadobójczych białek parasporalnych (*ang.* parasporal crystal inclusions) jest zależna od genów *cry* znajdujących się na dużych i potencjalnie mobilnych plazmidach [62, 68]. Co ciekawe, okazuje się, że m.in. plazmidy pXO1, pBc270 oraz pBc10987 posiadają bardzo podobne mechanizmy replikacji zależnej od konserwatywnego genu *repX*, co pośrednio wskazuje na to, że wszystkie one wywodzą się od wspólnego przodka [36], jedynie w toku ewolucji niektóre z nich (np. pBc10987 u szczepu *B. cereus* sensu stricto ATCC 10987) utraciły wyspę patogenności o wielkości około 20 kbp [58–59]. Podobna obserwacja dotyczy plazmidu pXO2 i podobnych mu elementów np. pBtoxis (128 kbp) obecnego u *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* [10] traktowanych jako plazmidy typu pXO2 z uwagi na podobieństwo replikacji powiązanej z mało zmiennym genem *repA* [36]. Poważnym wyzwaniem może być także zjawisko horyzontalnego transferu genów (*ang.* horizontal gene transfer, HGT) zachodzące w warunkach naturalnych. Choć potwierdzono je na przykład w żywności i glebie [31, 50], to wydaje się, że nadal nie w pełni doceniamy znaczenie koniugacji w biologii całej grupy. Opisano na przykład szczep *B. cereus* sensu stricto G9241, który posiada zarówno plazmid pXO1 jak i powiązaną z jego obecnością zdolność wywoływania objawów

inhalacyjnej postaci węgla [28]. Kolsto i wsp. [38] donoszą o problemach z jednoznaczną identyfikacją *B. anthracis* oraz *B. thuringiensis*. Natomiast szczep *B. cereus sensu stricto* E33L, wywołujący u przeżuwaczy chorobę o objawach silnie przypominających węgla, posiada plazmid pE33L54 (54 kbp) o wysokim podobieństwie sekwencji nukleotydowej w stosunku do plazmidu pXO2 szczepu *B. anthracis* Ames oraz szeregu mniejszych plazmidów homologicznych do wcześniej poznanych plazmidów *B. thuringiensis* [58]. Co więcej, wydaje się, że nie tylko plazmidy, ale także geny chromosomalne, na przykład operony warunkujące syntezę niektórych toksyn, ulegają HGT kształtując zmienność w obrębie *B. cereus sensu lato* [11]. Dane z analiz względnego współczynnika rekombinacji do mutacji (r/m) sugerują, że proces transferu genów w obrębie wspomnianych bakterii zachodzi nieustannie ze średnią intensywnością (czego dowodzi wartość współczynnika r/m w zakresie 1,5–2,9) i dotyczyć może także plazmidów typu pXO1 oraz typu pXO2 [16,71,73]. Wydaje się zatem, że klasyfikacja wykorzystująca plazmidy, m.in. warunkujące wirulencję nie jest dobrym rozwiązaniem, szczególnie, że plazmidy te mogą być nabywane i traczone w toku ewolucji [42].

Dotychczasowa, wielogatunkowa taksonomia wsparta jest także istotnymi argumentami. Okazuje się, że niektórzy przedstawiciele *B. cereus sensu lato* są stosunkowo monomorficzni. Na przykład *B. anthracis*, poza swoją odmiennością od pozostałych przedstawicieli grupy dotyczącą otoczki, braku ruchliwości i wrażliwości na penicylinę, jest także bardzo jednorodny genetycznie [13, 37, 55]. Podobnie klonalne są też emetyczne szczepy *B. cereus sensu stricto* [20]. Jednak najsilniejsze wsparcie dla koncepcji niezależnych gatunków wiąże się z praktycznym aspektem biologii tych organizmów. Z punktu widzenia medycyny ludzkiej i weterynaryjnej, ważne jest szybkie i precyzyjne wyróżnianie niebezpiecznych szczepów *B. anthracis*. Właściwości owadobójcze *B. thuringiensis* to z kolei podstawa zastosowania tych bakterii w biotechnologii do produkcji transgeniczných roślin (tzw. roślin Bt) oraz preparatów przeciwko owadom szkodnikom upraw (np. Thuricide, Dipel, Foray48D). Wreszcie zdolność do wywoływania zatrucia pokarmowego jest powiązana z przedstawicielami gatunku *B. cereus sensu stricto*.

W chwili obecnej trudno zaproponować jednolitą koncepcję taksonomii *B. cereus sensu lato*. Pogląd o niezależnych gatunkach, choć wygodny w ujęciu praktycznym, nie znajduje pełnego uzasadnienia w danych filogenetycznych. Stąd też ciekawą alternatywą wydaje się pomysł traktowania *B. cereus sensu lato* jako grupy spokrewnionych bakterii, obejmującej odmienne typy ekologiczne (tzw. ekotypy, termotypy) i wirulentne (patotypy) [69]. Takie ujęcie z jednej strony zapewnia zgodność z naturalnym przebiegiem zmian ewolu-

cyjnych, a z drugiej bierze pod uwagę aspekty ważne z punktu widzenia nauk medycznych, biotechnologii i szeroko pojętego przemysłu rolno-spożywczego, gdzie *B. cereus sensu stricto* i spokrewnione z nim bakterie odgrywają także poważną rolę.

2.2. Wyzwanie drugie – cykle życiowe i interakcje z otoczeniem

B. cereus sensu lato odnajdujemy w glebie, wodach, powietrzu, żywności oraz materiale roślinnym i organizmach zwierząt oraz ludzi, co sprawia, że ich interakcje z innymi organizmami muszą być częste i złożone. *B. cereus sensu lato* występują w środowisku w postaci wegetatywnej oraz przetrwalnikowej. Komórka wegetatywna jest aktywna metabolicznie. W sprzyjających warunkach środowiskowych intensywnie namnaża się, dając kolejne generacje bakterii. Podlega także procesom zmienności genetycznej zarówno na drodze mutacji jak i horyzontalnego transferu genów. Przetrwalnik (forma uśpiona), dzięki odwodnieniu cytoplazmy i wysyceniu ściany dipikolinianem, jest niewrażliwy na niesprzyjające czynniki środowiskowe, w tym działanie wysokich temperatur [21, 63]. Do jego kiełkowania niezbędne są odpowiednie induktory, m.in. woda i składniki odżywcze, w tym aminokwasy (m.in. L-alanina), cukry i nukleotydy. Co ciekawe, kiełkujące przetrwalniki *B. cereus sensu stricto*, dzięki aktywności racemazy alaninowej przekształcają dostępną L-alaninę w D-alaninę, która jest inhibitorem kiełkowania dla pozostałych spor sprzyjając ich pozostaniu w środowisku, na wypadek ponownego pogorszenia się warunków [51]. W przypadku niektórych bakterii, kiełkowanie przetrwalników inicjowane jest po ich fagocytozie w makrofagach, jak to ma miejsce w przypadku *B. anthracis* [63].

Zdolność do formowania ciepłoopornych przetrwalników (sporulacja) nabiera szczególnego znaczenia w przemyśle spożywczym, gdzie np. przeżywające proces pasteryzacji spory mogą wpływać na jakość końcowego produktu [4] lub przyczyniać się do wtórnego zanieczyszczenia żywności [5,67].

Sporulacja jest kontrolowana przez sześć białek regulatorowych określanych jako czynniki sigma (σ), które sterują rozpoznawaniem regionów promotorowych przez polimerazę RNA. One z kolei są kontrolowane przez białko Spo0A, czynnik transkrypcyjny sterujący genami odpowiadającymi za sporulację [65]. Ze względu na fakt, że niektóre czynniki regulujące tworzenie przetrwalników są najpierw wydzielane do środowiska, a później z niego pobierane i aktywują proces dopiero po osiągnięciu odpowiedniego stężenia, można przyjąć, iż w regulacji opisywanego procesu bakterie wykorzystują zjawisko *quorum sensing*. Co więcej, w przypadku *B. anthracis* wykazano, że proces formowania przetrwalników oraz wirulencja znajdują się pod

kontrolą białkowych produktów tych samych genów [56]. Należy podkreślić, że spory różnych gatunków nie tylko umożliwiają przetrwanie w niesprzyjających warunkach środowiska, ale ułatwiają rozprzestrzenianie i wnikanie do organizmów żywicieli, gdzie są w stanie kiełkować i namnażać się.

Osobnym zagadnieniem pozostają współzależności z innymi organizmami. Obecnie uważa się, że *B. cereus* sensu stricto, *B. thuringiensis* oraz zapewne *B. toyonensis* są w stanie funkcjonować w środowisku, powiązane obustronnie korzystnymi relacjami z gospodarzem. Namnażanie się w jego jelicie, a następnie formowanie uwalnianych do środowiska w czasie defekacji przetrwalników, prowadzą do rozprzestrzeniania się bakterii w glebie oraz na materiale roślinnym i wodzie. Stąd zaś, najczęściej drogą pokarmową, bakterie mogą ponownie trafić do jelita zamykając swój cykl życiowy [32, 68]. Ta forma wzajemnego oddziaływania przynosi zapewne obustronne korzyści, dowiedziono bowiem, że *B. toyonensis* wykazuje aktywność probiotyczną względem ssaków [33]. Dyskusyjne natomiast jest to, jak długo wspomniane bakterie potrafią utrzymywać się w jelicie. Obecnie przeważa pogląd, że opisana zależność jest długotrwałą formą wzajemnego oddziaływania.

B. cereus sensu lato potrafią także wywoływać choroby ludzi i zwierząt. I tak pałeczka (d. laseczka) wąglika, opisywana historycznie jako jedna z tzw. plag egipskich, w środowisku naturalnym występuje w zasadzie wyłącznie w postaci przetrwalników [18]. Wcześniejsze teorie, dotyczące obszarów (określanych czasami jako inkubatory wąglikowe), na których bakterie te mogłyby replikować się poza organizmem gospodarza, nie znalazły bowiem potwierdzenia w obserwacjach środowiskowych i zdają się nie mieć uzasadnienia, gdyż *B. anthracis* ma stosunkowo wąskie i specyficzne wymagania odżywcze. Natomiast wraz ze spożyciem skażonej sporami paszy, spory dostają się do organizmu przeżuwacza, a następnie kiełkują w obrębie układu limfatycznego, na przykład w makrofagach. Ich namnażaniu się towarzyszy biosynteza toksyn, co prowadzi do rozwoju objawów choroby i ostatecznej śmierci zwierzęcia. W jego ciele, głównie w surowicy, bakterie osiągną znaczną koncentrację i mogą sporulować, a obecność padlinożerców i naturalne procesy rozkładu prowadzą do rozprzestrzeniania przetrwalników na znacznym obszarze.

W odróżnieniu od wąglika, *B. thuringiensis* uważany jest za patogen larw owadów [68]. Wśród mechanizmów jego wirulencji znajdują się zarówno toksyny Cry (kilkaset rodzajów) formowane w czasie sporulacji, jak i białka produkowane w czasie tzw. fazy wegetatywnej (toksyny VIP, ang. vegetative insecticidal proteins). Choć różne doniesienia wskazują na często odmienne mechanizmy rozprzestrzeniania się *B. thuringiensis* wśród owadów, to wydaje się, że bakterie te mogą namnażać się w jeli-

cie larw bezobjawowo lub wywołując objawy, które nie prowadzą do śmierci. Z ewolucyjnego punktu widzenia taka strategia jest opłacalna, bowiem tylko żywy żywiciel zapewnia optymalne warunki do wzrostu i namnażania się bakterii. W sytuacji ograniczenia dostępności składników odżywczych, zachodzi sporulacja, w czasie której formowane są kryształki parasporalne zawierające toksyny. Wraz z uwolnieniem z ciała larw przetrwalników oraz powiązanych z nimi białek Cry, mogą one rozprzestrzenić się w środowisku do czasu ich ponownego spożycia. Toksyny Cry, po ich wstępnej aktywacji enzymatycznej w jelicie larwy, powodują uszkodzenia w ścianach jelit, co z jednej strony zwiększa dostępność składników odżywczych, z drugiej zaś przyspiesza kiełkowanie spor. Zatem bakterie te mogą funkcjonować najprawdopodobniej jako komensale larw bezkręgowców, czego zresztą pośrednio dowodzą sporadyczne tylko przypadki epidemii spowodowanych przez *B. thuringiensis* wśród larw owadów. Nadal natomiast brakuje przekonujących dowodów na możliwość namnażania się *B. thuringiensis* bezpośrednio w środowisku. Przeważa pogląd, że z uwagi na dość duże wymagania odżywcze, bakterie te raczej nie namnażają się, ewentualnie ich namnażanie się jest ograniczone do wyjątkowo zasobnych w składniki odżywcze nisz ekologicznych [68].

Właściwości ekologiczne *B. cereus* sensu stricto nie są w pełni poznane. Pierwsze obserwacje tej bakterii wskazywały na jej powszechność w jelitach bezkręgowców, gdzie opisywano je jako tzw. stadium *Arthromitus* przejawiające się obecnością długich nitkowatych tworów uformowanych z komórek bakteryjnych [32]. Obecność *B. cereus* sensu stricto w jelitach kręgowców, w tym człowieka, nie powinna być zaskoczeniem choćby z uwagi na częstość występowania w żywności, skąd bez problemów przedostaje się do jelita. Dlatego też warta rozważenia wydaje się koncepcja stanowiąca uzupełnienie dwóch pozostałych, sugerująca znaczenie żywności oraz przemysłu rolno-spożywczego w rozprzestrzenianiu *B. cereus* sensu stricto wśród ludzi. Liczne doniesienia wskazują na obecność tej bakterii w przyprawach, produktach mącznych, sałatkach, warzywach i owocach oraz przede wszystkim produktach mleczarskich. Linie przetwarzania mleka były niejednokrotnie wskazywane jako źródło wtórnego zanieczyszczenia żywności pasteryzowanej [4]. Wydaje się także, że *B. cereus* sensu stricto ma potencjał do współtworzenia trudnych do wyeliminowania biofilmów, co komplikuje i tak niełatwe próby eliminacji tej bakterii z surowców wykorzystywanych w przemyśle spożywczym.

Jeszcze mniej wiadomo o psychrotolerancyjnych przedstawicielach grupy, a w szczególności o *B. mycoides*. Bakteria ta obecna jest w glebie, szczególnie w ryzosferze, gdzie wydaje się wykazywać antagonizm

względem m.in. grzybów z rodzaju *Fusarium*. [15]. Izolowano ją także z przewodów pokarmowych bezkręgowców. Pomimo wykrycia genów enterotoksyn, obecność *B. mycoides* w żywności nie jest traktowana w kategoriach zagrożenia, gdyż nie opisano dotąd przypadków zatrucia pokarmowych powodowanych przez te bakterie. Stąd przypuszczać można, że adaptacja do umiarkowanych temperatur oraz powiązany z tym inny skład kwasów tłuszczowych, z większym udziałem form nienasyconych, to przede wszystkim przystosowania do egzystowania w warunkach glebowych, a transmisja do organizmów zwierząt jest tylko dodatkowym elementem ułatwiającym rozprzestrzenianie się tej bakterii. Jednocześnie niższa optymalna temperatura wzrostu sprawia, że namnażają się one wolniej, a zarazem podlegają mniejszej zmienności mutacyjnej, co potwierdzają także analizy względnego współczynnika rekombinacji do mutacji, osiągając najniższe wartości w przypadku tych właśnie bakterii (Bartoszewicz M., dane niepublikowane).

2.3. Wyzwanie trzecie – adaptacja do niskich temperatur

B. cereus sensu lato zajmują różnorodne środowiska, co wymaga od nich szeregu przystosowań pozwalających na efektywne bytowanie w zajmowanych niszach ekologicznych i skuteczną konkurencję z obecną tam mikroflorą. Jedną z ważniejszych adaptacji do środowiska u wybranych przedstawicieli *B. cereus* sensu lato jest psychrotolerancja, czyli zdolność do wzrostu w temperaturze 7°C lub niższej [4]. Zazwyczaj ceche tej towarzyszy brak namnażania się powyżej 42–45°C [40]. Podłożem adaptacji do chłodu jest szereg istotnych właściwości biochemicznych i fizjologicznych, takich jak zapobieganie uszkodzeniu komórek w wyniku krystalizacji wody, zapewnienie ciągłości procesów metabolicznych związanych z syntezą białek oraz pozyskiwaniem energii przy równoczesnym zachowaniu odpowiedniego poziomu aktywności i płynności błon komórkowych [70, 72].

W przypadku *B. cereus* sensu lato warunki te spełnione są przede wszystkim dzięki zdolności do syntezy białek szoku zimna (Csp, ang. cold shock proteins), spośród których główną rolę odgrywa białko CspA [72]. Jest to niewielka proteina (7 kDa) zawierająca pięć antyrównoległych łańcuchów β , które razem formują strukturę β -beczki (ang. β -barrel). Na powierzchni takiej cząsteczki eksponowane są aminokwasy aromatyczne, które odgrywają podstawową rolę w wiązaniu się białka CspA do RNA i DNA, a wewnątrz CspA stanowią liczne aminokwasy hydrofobowe formujące rdzeń białkowy [72]. Poznane dotychczas białka szoku zimna charakteryzuje zdolność do wiązania się do specyficznego fragmentu jednoniciowych cząsteczek DNA, tzw.

fragmentu Y (ATTGG) lub komplementarnej do niego sekwencji [22–23]. Fundamentalnym jednak mechanizmem działania białek CspA jest ochrona mRNA przed formowaniem drugorzędowych struktur w wyniku obniżania się temperatury środowiska.

Adaptacja bakterii do niskich temperatur wymaga dodatkowo innych przystosowań. Uważa się, że za reakcję komórki bakteryjnej na spadek temperatury odpowiedzialne są rybosomy, pełniące poza translacją, dodatkową rolę „czujników” zmiany temperatury. Gdy na skutek obniżania temperatury dochodzi do zatrzymania translacji większości białek, indukowane szokiem zimna proteiny Csp są nadal syntetyzowane dzięki obecności elementów DB (Downstream Box) w sekwencjach nukleotydowych flankujących geny tych białek. Elementy DB zapewniają dodatkowe miejsce wiązania w rybosomie, prawdopodobnie na skutek interakcji z 16S rRNA. To z kolei prowadzi do indukcji syntezy rybosomalnych czynników regulacyjnych, na przykład CsdA bądź RbfA, a w konsekwencji do wydajnego formowania kompleksów translacyjnych zapewniających biosyntezę wszystkich białek, niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania komórki [72].

Efektywne prowadzenie procesów życiowych w chłdzie wymaga dodatkowo zachowania aktywności i płynności błon komórkowych, co zostaje osiągnięte poprzez zwiększenie udziału nienasyconych kwasów tłuszczowych w tych strukturach. Dowiedziono, że spadek temperatury z 28°C do 10°C w ciągu 16 godzin skutkował zmniejszeniem udziału nasyconych kwasów tłuszczowych w błonie komórkowej *B. subtilis* z 23,9% do 13,4% wraz z równoczesnym wzrostem udziału kwasów nienasyconych, przede wszystkim kwasu γ -linoleinowego [70]. W przypadku *B. megaterium* i *B. subtilis* wykazano, że biosynteza nienasyconych kwasów tłuszczowych w 35°C jest wysoce ograniczona. Obniżenie temperatury do 20°C uaktywnia desaturazy kwasów tłuszczowych, uruchamiając tym samym szlak syntezy kwasów z wiązaniami wielokrotnymi.

Psychrotolerancja *B. cereus* sensu lato nie została nadal poznana w sposób wyczerpujący. Brak jest na przykład szczegółowych danych dotyczących adaptacji do chłodu innych przedstawicieli grupy, na przykład *B. wiedmannii*. Wiadomo jednak, że gatunek ten nie posiada typowej dla *B. weihenstephanensis* i *B. mycoides* sekwencji w genie *cspA*. Nie można zatem wykluczyć, że na skutek podobnej presji selekcyjnej i zjawiska konwergencji, adaptacja do wzrostu w niskich temperaturach wyewoluowała w obrębie *B. cereus* sensu lato niezależnie w dwóch lub więcej układach. Tym ważniejsze jest więc ustalenie zakresu rozprzestrzeniania psychrotolerancyjnych szczepów *B. cereus* sensu lato w kontekście znaczenia tej cechy w mikrobiologii żywności, kosmetyków i produktów farmaceutycznych. Należy także zweryfikować słuszność wyróżniania

B. weihenstephanensis jako odrębnego gatunku na podstawie dostępnych przesłanek i odpowiedzieć na pytanie, czy szczepy klasyfikowane do tego taksonu mogą być odpowiedzialne za zatrucia pokarmowe oraz obniżenie jakości artykułów spożywczych, kosmetycznych i wyrobów medycznych.

2.4. Wyzwanie czwarte – toksyny *B. cereus* sensu lato

Bakterie *B. cereus* sensu lato biosyntetyzują szereg toksyn bakteryjnych, z których część jest charakterystyczna dla pojedynczych gatunków, inne są szeroko rozprzestrzenione w obrębie grupy, a nawet rodzaju [57]. Do najważniejszych zaliczamy (i) enterotoksyny biegunkowe, (ii) toksynę wymiotną (cereulidynę), (iii) owadobójcze toksyny *B. thuringiensis* (białka Cry, VIP, Cyt i chitynazy) oraz (iv) toksyny powodujące wąglik [7, 9, 66, 68].

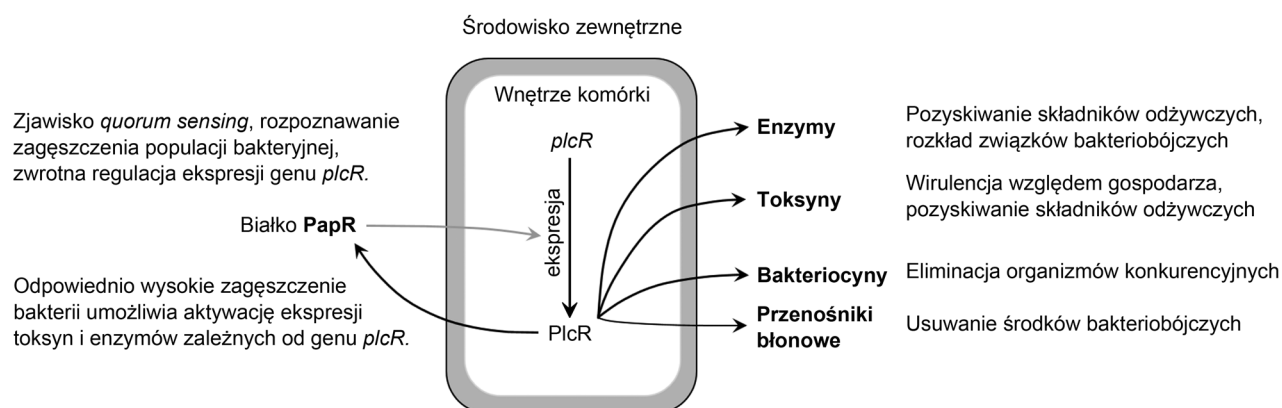
Za podstawowy czynnik etiologiczny zatruc pokarmowych *B. cereus* sensu stricto uważana jest hemolizyna BL (HBL), trójelementowa toksyna białkowa składająca się z dwóch podjednostek litycznych (L1, L2) oraz jednego elementu łączącego B, o masie odpowiednio 38, 46 i 37 kDa [66]. Kodujące ją geny są zebrane w zlokalizowany na chromosomie operon *hbl*. Mechanizm działania toksyny HBL opiera się na formowaniu porów w błonie komórki docelowej, co prowadzi do zaburzenia gospodarki jonowej i w konsekwencji do jej lizy. Wykazano także, że enterotoksyna hemolityczna posiada działanie dermonekrotyczne oraz istotnie zwiększa przepuszczalność naczyń [7]. Co ciekawe, mimo iż operon *hbl* obecny jest u około połowy szczepów *B. cereus* sensu lato (z wyjątkiem szczepów emetycznych), notowany jest m.in. w genomach *B. coagulans*, *B. polymyxa*, *B. amyloliquefaciens*, *B. circulans*, *B. lentimorbis* oraz *B. pasteurii* [57].

Enterotoksyna niehemolityczna (NHE) wykazuje szereg podobieństw w stosunku do HBL. Została ona wyizolowana, oczyszczona i scharakteryzowana w oparciu o materiał pobrany od 152 osób z zatruciem pokarmowym w Norwegii [44]. Ustalono, że toksyna ta także składa się z trzech elementów białkowych: NheA (41 kDa), NheB (40 kDa) oraz NheC (36 kDa), a geny je kodujące zebrane są w jeden operon *nhe*. Element NheB łącząc się z błoną komórki docelowej, przyłącza komponenty NheA oraz NheC, które razem doprowadzają do lizy komórki, wobec czego przyjmuje się, że do pełnej aktywności toksyny niezbędne są wszystkie trzy jej składniki. NHE obecna jest powszechnie, notuje się ją u ponad 90% badanych szczepów. Ponadto nie stwierdzono zależności pomiędzy obecnością operonu *nhe* a zdolnością do formowania innych toksyn. Zaobserwowano natomiast istotnie niższą częstość występowania operonu *nhe* u szczepów reprezentujących *B. weihenstephanensis* i inne bakterie z tego samego

(szóstego w analizach filogenetycznych techniką MLST) kładu filogenetycznego [66]. Należy podkreślić, że podobieństwo strukturalne NHE i HBL oraz zależność ich ekspresji od regulonu *PlcR* wskazują, że obie toksyny mają wspólną genezę.

Spożycie produktów zanieczyszczonych bakteriami *B. cereus* sensu lato zdolnymi do biosyntezy jednoskładnikowej cytotoksyny K (CytK) także może prowadzić do objawów zatrucia pokarmowego, choć sama aktywność toksyny jest ściśle uzależniona od jej budowy chemicznej. Okazuje się, że przypadki śmiertelnych zatruc pokarmowych powiązane z CytK-1, która jest właściwa szczepom *B. cytotoxicus*, natomiast CytK-2 obecna przede wszystkim u *B. cereus* sensu stricto, *B. thuringiensis* oraz *B. mycoides* wywołuje zdecydowanie łagodniejsze i niezagrażające życiu objawy [43]. W obu przypadkach jednak prowadzi do formowania porów anionowych i w konsekwencji do uszkodzenia enterocytów, co skutkuje lokalnymi stanami zapalnymi i krwawą biegunką. Pod względem zaś budowy i mechanizmu działania, cytotoksyna K wykazuje wyraźne podobieństwa do γ -hemolizyn *Staphylococcus aureus* oraz β -toksyny *Clostridium perfringens* [66].

Wspomniane toksyny *B. cereus* sensu lato wydzielane są pozakomórkowo i prowadzą do rozpadu komórek zainfekowanych organizmów. Poza HBL, NHE oraz CytK, także szereg hemolizyn i fosfolipaz narusza integralność błon komórkowych. Z pozycji bakterii właściwość ta jest bardzo korzystna, gdyż zwiększa dostępność składników pokarmowych poprzez uwalnianie ich z komórek gospodarza. Co więcej, w badaniach Guillemet i wsp. [24] wykazano silną cytotoksyczność wielu sekretyn *B. cereus* sensu lato w stosunku do makrofagów, co ułatwia przełamywanie barier immunologicznych gospodarza i rozprzestrzeniania się infekcji. Dodatkowo uważa się, że proces agregacji bakterii na powierzchni nabłonka jelitowego powoduje zwiększoną koncentrację mediatorów chemicznych biorących udział w zjawisku *quorum sensing* powiązanym z aktywnością regulonu *plcR*. Mediatorzy te stymulują bakterie do bardziej intensywnej sekrecji enterotoksyn, w konsekwencji czego nasila się ich miejscowe działanie. Sugeruje się nawet, że komórki, które nie ulegną przytwierdzeniu do nabłonka jelitowego i nie osiągną odpowiedniej koncentracji, nie będą w stanie wydelać toksyn [60]. Przy okazji rysuje się inny ciekawy aspekt enterotoksyczności *B. cereus* sensu lato. Bakterie te bowiem są w stanie ułatwiać także rozwijanie się infekcji wywoływanych przez inne mikroorganizmy. Uszkodzenie błon komórkowych, masywna utrata soku komórkowego, zmiany pH w środowisku sprawiają, że oportunistyczne bakterie pozbawione szeregu mechanizmów zjadliwości są w stanie wspólnie z *B. cereus* sensu lato, odżywiać się, namnażać i rozprzestrzeniać po zaatakowanym organizmie [60].



Wymiotna postać zatruc pokarmowych to z kolei efekt intoksykacji cereulidyną – toksyną wymiotną w postaci cyklicznego dodekadepsypeptydu wytwarzanego w drodze nierybosomalnej syntezy [39]. Najczęściej wykrywa się szczepy zdolne do formowania cereulidyny w produktach spożywczych zawierających ryż oraz mleko, choć bakterie te izolowano także z gleby [5]. Cereulidyna przypomina pod względem budowy i mechanizmu działania walinomycynę, peptydowy antybiotyk syntetyzowany przez *Streptomyces griseus* i *S. tsusimaensis* [12]. Efektem intoksykacji jest wzrost przewodnictwa transbłonowego (tworzone są kanały potasowe), powiększanie mitochondriów oraz inhibicja przebiegu łańcucha oddechowego, wakuolizacja komórek i zmiany kondensacji chromatyny w jądrze komórkowym [53,54]. Należy podkreślić, że z uwagi na szybki rozwój objawów, których natężenie zależy od dawki toksyny, zatrucia cereulidyną mogą przebiegać gwałtownie i prowadzić do rozwoju ostrej niewydolności wątroby, zespołu hemolityczno-mocznicowego, obrzęku mózgu i śmierci [17]. Cereulidyna może także zwiększać tempo apoptozy niezależnej i zależnej od

Wirulencja *B. anthracis* wymaga obecności dwóch dużych plazmidów: pXO1 (181 kbp) oraz pXO2 (90 kbp). Na pierwszym z nich znajdują się geny *pag*, *lef* oraz *cya* kodujące odpowiednio: antygen ochronny PA, czynnik letalny LF oraz czynnik obrzękowy EF [48]. Z nich zaś formowane są dwie aktywne toksyny: toksyna zabójcza (PA-LF) oraz toksyna obrzękowa (PA-EF). Dodatkowo, w celu zapobiegania fagocytozie wirulentne komórki *B. anthracis* formują otoczkę, złożoną z kwasu poli-D-glutaminowego. Synteza tej otoczki jest warunkowana obecnością genu *cap*, zlokalizowanego na plazmidzie pXO2 [48]. W pierwszym etapie działania toksyny węglik, następuje fuzja antygenu ochronnego PA z wrażliwą komórką, po czym od PA oddysocjowuje niewielki fragment białka o ciężarze 20 kDa (PA20), pozostawiając połączony z błoną komórkową element PA63 (63 kDa). Do tak przekształconego białka PA63 mogą się wiązać elementy LF lub EF. Taki kompleks w postaci endosomu trafia do wnętrza komórki, gdzie ulega uwolnieniu do cytozolu. Tam czynnik EF (funkcjonujący jako cyklaza adenylanowa) powoduje wzrost poziomu cAMP, interleukiny 6 (IL-6) oraz czynnika martwicy guza (TNF-α), co wywołuje miejscowy obrzęk. Z kolei toksyna letalna LF jest metaloproteazą, która pośrednio inaktywuje specyficzne kinazy komórkowe z rodziny MAPK (*ang.* mitogen-activated protein kinases), co zaburza przekazywanie sygnału w komórce i prowadzi do apoptozy [48]. Efektem toksyczności pałeczek węglik jest rozwój pełnych objawów choroby, które w zależności od postaci i drogi zakażenia (płucna, pokarmowa lub skórna) mogą przyjmować

odmienną formę rzutującą na przebieg infekcji oraz rokowania dla pacjenta.

B. thuringiensis wykazuje aktywność w odniesieniu do bezkręgowców, a szczególnie larw wrażliwych owadów. Syntetyzuje bowiem ponad 100 rodzajów specyficznych dla rodzaju/gatunku różnorodnych krystalicznych białek paraspinalnych określanych jako białka Cry. Na przykład białka Cry 1 są aktywne w stosunku do przedstawicieli rzędu *Lepidoptera* (obejmującego między innymi motyle), Cry 3 działają bólczo na chrząszcze z rzędu *Coleoptera*, a Cry 11 na *Diptera* (m.in. komary). Co ciekawe, białka Cry formowane są w postaci nieaktywnych protoksyn, a dopiero ich enzymatyczna aktywacja umożliwia im reakcję ze swoistym receptorem w ścianie jelita [68]. Ten proces prowadzi do formowania porów, co powoduje wysięk do światła jelita larwy, uniemożliwia jej odżywianie się i powoduje śmierć wrażliwego organizmu. Ułatwia także rozprzestrzenianie się bakterii po całej zainfekowanej larwie.

Blisko połowa szczepów *B. thuringiensis* syntetyzuje także odporne na działanie temperatur egzotoksyny, na przykład egzotoksynę I. W czasie wzrostu wegetatywnego obserwuje się ponadto biosyntezę wegetatywnych białek owadobójczych czyli tzw. toksyn VIP, a także cytolitycznej toksyny Cyt oraz chitynazy [9, 68]. Specyficzność i różnorodność toksyn owadobójczych produkowanych przez *B. thuringiensis* daje duże możliwości zwalczania szkodników owadów, ponadto pozwala, dzięki wysokiej skuteczności i specyficzności, unikać narastania zjawiska oporności larw owadów i przy okazji oszczędzać organizmy pożyteczne, na przykład pszczołę miodną.

3. Podsumowanie

B. cereus sensu lato występują powszechnie w środowisku naturalnym wykazując różnorodne interakcje z organizmami żywymi. Poszczególni przedstawiciele tej grupy zajmują różnorodne nisze ekologiczne, z których łatwo mogą przedostawać się do organizmów żywych bądź surowców wykorzystywanych w produkcji żywności. Z uwagi na podobieństwo genetyczne oraz duże znaczenie horyzontalnego transferu genów w biologii *B. cereus* sensu lato, wydaje się zasadnym traktowanie całej grupy jako jednego polimorficznego gatunku bakteryjnego, w obrębie którego wyróżniają się typy filogenetyczne o odmiennych właściwościach ekologicznych i chorobotwórczych. Cechy te mają także ogromne znaczenie z punktu widzenia diagnostyki medycznej i weterynaryjnej. Psychrotolerancja i zdolność do syntezy różnorodnych czynników wirulencji sprawiają, że *B. cereus* sensu lato nadal pozostają ważnym zagrożeniem dla konsumentów. Okazuje się, że zdolność do formowania toksyn to nie tylko przejaw

przystosowania się do wirulentnego trybu życia, ale także sposób na efektywne wykorzystywanie zasobów środowiska i komunikowanie się między bakteriami. *B. cereus* sensu lato stanowią ciekawy model badawczy zarówno w odniesieniu do interakcji na poziomie bakteria-środowisko, jak i bakteria-gospodarz oraz bakteria-bakteria. Dostarczają także cennych danych do prac nad spójną i jednolitą koncepcją gatunku bakteryjnego.

Podziękowania

Niniejsza praca zawiera wyniki uzyskane w trakcie realizacji badań naukowych finansowanych w ramach projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki (na podstawie decyzji nr DEC-2011/03/B/NZ8/02835).

Piśmiennictwo

1. Ash C., Farrow J.A.E., Wallbanks S., Collins M.D.: Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Lett. Appl. Microbiol.* **13**, 202–206 (1991)
2. Auch A.F., von Jan M., Klenk H.P., Goker M.: Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Stand. Genomic Sci.* **28**, 117–134 (2010)
3. Bartoszewicz M., Bideshi D.K., Kraszevska A., Modzelewska E., Święcicka I.: Natural isolates of *Bacillus thuringiensis* display genetic and psychrotrophic properties characteristic of *Bacillus weihenstephanensis*. *J. Appl. Microbiol.* **106**, 1967–1975 (2009)
4. Bartoszewicz M., Hansen B.M., Święcicka I.: *Bacillus cereus* sensu lato are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. *Food Microbiol.* **25**, 588–596 (2008)
5. Bartoszewicz M., Kroteń M.A., Święcicka I.: Germination and proliferation of emetic *Bacillus cereus* sensu lato strains in milk. *Folia Microbiol.* **58**, 529–535 (2013)
6. Bartoszewicz M., Marjańska P.S.: Milk-originated *Bacillus cereus* sensu lato strains harbouring *Bacillus anthracis*-like plasmids are genetically and phenotypically diverse. *Food Microbiol.* **67**, 23–30 (2017)
7. Bartoszewicz M., Święcicka I., Buczek J.: Cereulidyna i enterotoksyny *Bacillus cereus* sensu lato. *Med. Weter.* **62**, 28–31 (2006)
8. Bavykin S.G., Lysov Y.P., Zakhariev V., Kelly J.J., Jackman J., Stahl D.A., Cherni A.: Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and *gyrB* sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 3711–3730 (2004)
9. Bednarczyk A., Dackowska-Kozon E.G.: Czynniki patogenności bakterii z grupy *Bacillus cereus*. *Post. Microbiol.* **47**, 51–63 (2008)
10. Berry C., O'Neil S., Ben-Dov E., Jones A.F., Myrphy L., Quail M.A., Holden M.T.G., Harris D., Zaritsky A., Parkhill J.: The toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5082–5095 (2002)
11. Bohm M.E., Huptas C., Krey V.M., Scherer S.: Massive horizontal gene transfer, strictly vertical inheritance and ancient duplications differentially shape the evolution of *Bacillus cereus* enterotoxin operons *hbl*, *cytK* and *nhe*. *BMC Evol. Biol.* **15**, 246 (2015)
12. Cheng Y-Q.: Deciphering the biosynthetic codes for the potent anti-SARS-CoV cyclodepsipeptide valinomycin in *Streptomyces tsuimaensis* ATCC 15141. *Chem. Bio. Chem.* **7**, 471–477 (2006)

13. Cherif A., Brusetti L., Borin S., Rizzi A., Boudabous A., Khyami-Horani H., Daffonchio D.: Genetic relationship in the *Bacillus cereus* group by rep-PCR fingerprinting and sequencing of a *Bacillus anthracis*-specific rep-PCR fragment. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 1108–1119 (2003)
14. Cohan F.M.: Sexual isolation and speciation in bacteria. *Genetica*, **116**, 359–370 (2002)
15. Czaban J., Książniak A., Perzyński A.: An attempt to protect winter wheat against *Fusarium culmorum* by the use of rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus mycoides*. *Pol. J. Microbiol.* **53**, 175–182 (2004)
16. Didelot X., Barker M., Falush D., Priest F.G.: Evolution of pathogenicity in the *Bacillus cereus* group. *Syst. Appl. Microbiol.* **32**, 81–90 (2009)
17. Dierick K., van Coillie C., Świącicka I., Meyfroidt G., Devlieger H., Meulemans A., Hoedemaekers G., Fourie L., Heyndrickx M., Mahillon J.: A fatal family outbreak of *Bacillus cereus* food poisoning. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 4277–4279 (2005)
18. Driks A.: *Bacillus anthracis* spore. *Mol. Asp. Med.* **30**, 368–373 (2009)
19. Ehling-Schulz M., Fricker M., Grallert H., Rieck P., Wagner M., Scherer S.: Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: Structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXO1. *BMC Microbiol.* **6**, 20 (2006)
20. Ehling-Schulz M., Scherer S. i wsp.: Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology*, **151**, 183–197 (2005)
21. Errington J.: Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat. Rev. Microbiol.* **1**, 117–126 (2003)
22. Graumann P.L., Marahiel M.A.: The major cold shock protein of *Bacillus subtilis* CspB binds with high affinity to the ATTGG- and CCAAT sequences in single stranded oligonucleotides. *FEBS Lett.* **338**, 157–160 (1994)
23. Graumann P.L., Marahiel M.A.: Cold shock response in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**, 203–209 (1999)
24. Guillemet E., Cadot C., Tra S.-L., Guinebretiere M.-H., Lereclus D., Ramaro N.: The InhA metalloproteases of *Bacillus cereus* contribute concomitantly to virulence. *J. Bacteriol.* **192**, 286–294 (2010)
25. Guinebretiere M.-H., Sorokin A. i wsp.: *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**, 31–40 (2013)
26. Guinebretiere M.H., de Vos P. i wsp.: Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. *Environ. Microbiol.* **10**, 851–865 (2008)
27. Helgason E., Okstad O.A., Caugant D.A., Johansen H.A., Fouet A., Mock M., Hegna I., Kolsto A.-B.: *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2627–2630 (2000)
28. Hoffmaster A.R., Fraser C.M. i wsp.: Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 8449–8454 (2004)
29. Hoton F.M., Andrup L., Świącicka I., Mahillon J.: The cereulide genetic determinants of emetic *Bacillus cereus* are plasmid-borne. *Microbiology*, **151**, 2121–2124 (2005)
30. Hoton F.M., Fornelos N., N'Guessan E., Hu X., Świącicka I., Dierick K., Jaaskelainen E., Salkinoja-Salonen M., Mahillon J.: Family portrait of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephensis* cereulide-producing strains. *Environ. Microbiol. Rep.* **1**, 177–183 (2009)
31. Hu X., Hansen B.M., Eilenberg J., Hendriksen N.B., Smidt L., Yuan Z., Jensen G.B.: Conjugative transfer, stability and expression of a plasmid encoding a *cryIAC* gene in *Bacillus cereus* group strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **231**, 45–52 (2004)
32. Jensen G.B., Hansen B.M., Eilenberg J., Mahillon J.: The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environ. Microbiol.* **5**, 631–640 (2003)
33. Jimenez G., Urdiain M., Cifuentes A., Lopez-Lopez A., Blanch A.R., Tamames J., Kampfer P., Kolsto A.-B., Ramon D., Martinez J.F.: Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparison of the species of the group by means of ANI calculations. *Syst. Appl. Microbiol.* **36**, 383–391 (2013)
34. Jung M.Y., Kim J.S., Peak W.K., Lim J., Lee H., Kim P.I., Ma J.Y., Kim W., Chang Y.H.: *Bacillus manliponensis* sp. nov., a new member of the *Bacillus cereus* group isolated from foreshore tidal flat sediment. *J. Microbiol.* **49**, 1027–1032 (2011)
35. Jung M.-Y., Paek W.K., Park I.-S., Han J.R., Sin Y., Peak J., Rhee M.-S., Kim H., Song H.S., Chang Y.-H.: *Bacillus gaemokensis* sp. nov., isolated from foreshore tidal flat sediment from the Yellow Sea. *J. Microbiol.* **48**, 867–871 (2010)
36. Kaminska P.S., Yernazarova A., Drewnowska J. M., Zambrowski G., Świecicka I.: The worldwide distribution of genetically and phylogenetically diverse *Bacillus cereus* isolates harbouring *Bacillus anthracis*-like plasmids. *Environ. Microbiol. Rep.* **7**, 738–745 (2015)
37. Keim P., Gruendike J.M., Klevytska A.M., Schupp J.M., Challa-lacombe J., Okinaka R.: The genome and variation of *Bacillus anthracis*. *Mol. Asp. Med.* **30**, 397–405 (2009)
38. Kolsto A.-B., Tourasse N.J., Okstad A.: What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species? *Annu. Rev. Microbiol.* **63**, 451–476 (2009)
39. Kroteń M.A., Bartoszewicz M., Świącicka I.: Cereulide and valinomycin, two important natural dodecadeptides with ionophoretic activities. *Pol. J. Microbiol.* **59**, 3–10 (2010)
40. Lechner S., Mayr R., Francis K.P., Pruß B.M., Kaplan T., Wießner-Gunkel E., Steward G.S.A.B., Scherer S.: *Bacillus weihenstephensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 1373–1382 (1998)
41. Liu B., Liu G.H., Hu G.S., Sengonca C., Lin N.Q., Tang J.Y., Tang W.Q., Lin Y.Z.: *Bacillus bingmayongensis* sp. nov., isolated from the pit soil of the Emperor Qin's Terra-cotta warriors in China. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **105**, 501–510 (2014)
42. Liu Y., Lai Q., Goker M., Meier-Kolthoff J.P., Wang M., Sun Y., Wang L., Shao Z.: Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Sci. Rep.* **5**, 14082 (2015)
43. Lund T., De Buyser M.L., Granum P.E.: A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol. Microbiol.* **38**, 254–261 (2000)
44. Lund T., Granum P.E.: Characterization of a non-hemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a food-borne outbreak. *FEMS Microbiol. Lett.* **141**, 151–156 (1996)
45. Maianski N.A., Roos D., Kuijpers T.W.: Tumor necrosis factor alpha induces a caspase – independent death pathway in human neutrophils. *Blood*, **101**, 1987–1995 (2003)
46. Małek W., Wdowiak-Wróbek S., Kalita M., Świącicka I.: W poszukiwaniu koncepcji gatunku bakteryjnego. *Post. Mikrobiol.* **44**, 323–328 (2005)
47. Miller R.A., Beno S.M., Kent D.J., Carroll L.M., Martin N.H., Boor K.J., Kovac J.: *Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**, 4744–4753 (2016)
48. Moayeri M., Leppla S.H.: Cellular and systemic effects of anthrax lethal toxin and edema toxin. *Mol. Asp. Med.* **30**, 439–455 (2009)
49. Moayeri M., Leppla S.H., Vrentas C., Pomerantsev A.P., Liu S.: Anthrax pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **69**, 185–208 (2015)

50. Modrie P., Beuls E., Mahillon J.: Differential plasmid transfer dynamics of pAW63 plasmid among members of the *Bacillus cereus* group in food microcosms. *J. Appl. Microbiol.* **108**, 888–897 (2010)
51. Moir A., Corfe B.M., Behravan J.: Spore germination. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 403–409 (2002)
52. Nakamura L.K.L.: *Bacillus pseudomycoides* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 1031–1035 (1998)
53. Paananen A., Jarvinen K., Sareneva T., Salkinoja-Salonen M.S., Timonen T., Holtta E.: Valinomycin induced apoptosis of human NK cells is predominantly caspase independent. *Toxicology*, **212**, 37–45 (2005)
54. Paananen A., Mikkola R., Sareneva T., Matikainen S., Hess M., Andersson M., Julkunen I., Salkinoja-Salonen M.S., Timonen T.: Inhibition of human natural killer cell activity by cereulide, an emetic toxin from *Bacillus cereus*. *Clin. Exp. Immunol.* **129**, 420–428 (2002)
55. Patino-Navarrete R., Sanchis V.: Evolutionary processes and environmental factors underlying the genetic diversity and lifestyles of *Bacillus cereus* group bacteria. *Res. Microbiol.* **168**, 309–318 (2017)
56. Perego M., Hoch J.A.: Commingling regulatory systems following acquisition of virulence plasmids by *Bacillus anthracis*. *Trends Microbiol.* **16**, 215–221 (2008)
57. Phelps R.J., McKillip J.L.: Enterotoxin production in natural isolates of *Bacillaceae* outside the *Bacillus cereus* group. *FEMS Microbiol. Lett.* **68**, 3147–3151 (2002)
58. Rasko D.A., Altherr M.R., Han C.S., Ravel J.: Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 303–329 (2005)
59. Rasko D.A., Read T.D. i wsp.: The genome sequence of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to *Bacillus anthracis* pXO1. *Nucleic Acids Res.* **32**, 977–988 (2004)
60. Raymond B., Bonsall M.B.: Cooperation and the evolutionary ecology of bacterial virulence: the *Bacillus cereus* group as a novel study system. *Bioessays*, **35**, 706–716 (2013)
61. Raymond B., Wyres K.L., Sheppard S.K., Ellis R.J., Bonsall M.B.: Environmental factors determining the epidemiology and population genetic structure of the *Bacillus cereus* group in the field. *PLoS Pathog.* **6**, e1000905 (2010)
62. Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D.R., Dean D.H.: *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 775–806 (1998)
63. Setlow P.: I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends Microbiol.* **15**, 172–180 (2007)
64. Slamti L., Lereclus D.: A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *EMBO J.* **21**, 4550–4559 (2002)
65. Sonenshein A.L.: Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 561–566 (2000)
66. Stenforss Arensen L.P., Fagerlund A., Granum P.E.: From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 579–606 (2008)
67. Svensson B., Ekelund K., Ogura H., Christiansson A.: Characterization of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants. *Int. Dairy J.* **14**, 17–27 (2004)
68. Świąćicka I.: Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in eukaryotic organisms: a case for symbiosis. *Biocontrol Sci. Tech.* **18**, 221–239 (2008)
69. Świąćicka I., Bartoszewicz M., Kasulyte-Creasey D., Drewnowska J., Murawska E., Yernazarova A., Łukaszuk E., Mahillon J.: Diversity of thermal ecotypes and potential pathotypes of *Bacillus thuringiensis* soil isolates. *FEMS Microbiol. Ecol.* **85**, 262–272 (2013)
70. Ulusu N.N., Tezcan E.F.: Cold shock proteins. *Turk. J. Med. Sci.* **31**, 283–290 (2001)
71. Vos M., Didelot X.: A comparison of homologous recombination rates in bacteria and archaea. *The ISME J.* **3**, 199–208 (2009)
72. Wouters J.A., Rombouts F.M., Kuipers O.P., de Vos W.M., Abee T.: The role of cold-shock proteins in low-temperature adaptation of food-related bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **23**, 165–173 (2000)
73. Zwick M.E., Read T.D. i wsp.: Genomic characterization of the *Bacillus cereus* sensu lato species: backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis*. *Genome Res.* **22**, 1512–1524 (2012)

Urszula Błaszczuk*, Kamila Dąbrowska

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

Wpłynęło w lipcu, zaakceptowano we wrześniu 2017 r.

1. Charakterystyka i klasyfikacja bakteriocyn cyklicznych. 2. Genetyka bakteriocyn cyklicznych. 3. Biosynteza bakteriocyn cyklicznych. 4. Struktura bakteriocyn cyklicznych. 5. Mechanizmy działania bakteriocyn cyklicznych. 6. Enterocyna AS-48. 7. Potencjalne zastosowanie bakteriocyn cyklicznych. 8. Podsumowanie

Characteristics and potential applications of circular bacteriocins

Abstract: Bacteriocins are ribosomally synthesized peptides or proteins exerting antagonistic activity toward organisms which are closely related to the producer strain. Circular bacteriocins are produced by Gram-positive bacteria, mainly lactic acid bacteria, and to a lesser extent by *Bacillus*, *Clostridium* and *Staphylococcus* genera. These bacteriocins are characterized by the head-to-tail cyclization of their backbone. The circular nature of these peptides makes them resistant to many proteolytic enzymes and provides great thermal and pH stability. Circular bacteriocins are divided into 2 subgroups based on their physicochemical properties and sequence identity. These bacteriocins are synthesized as linear precursors with a leader sequence which is cleaved off during maturation. The mature circular peptides are composed of 58–70 amino acid residues. Biosynthesis of circular bacteriocins requires three stages: cleavage of the leader sequence, circularization and export out of the cell. Circular bacteriocins have broad antimicrobial activity spectrum, including many food spoilage bacteria and pathogens, such as *Listeria*, *Staphylococcus* and *Clostridium* spp. Circular bacteriocins permeabilize the membrane of sensitive bacteria, causing loss of ions and dissipation of the membrane potential, and finally cell death. Enterocin AS-48 was the first identified circular bacteriocin and is best characterized so far. Circular bacteriocins or bacteriocin-producing lactic acid bacteria have great potential in food preservation, and possibly in pharmaceutical and cosmetic industries. Thanks to their properties, circular bacteriocins could be an alternative not only to preservatives and methods used to provide microbial food safety presently, but also to less stable, linear bacteriocins.

1. Characteristics and classification of circular bacteriocins. 2. Genetics of circular bacteriocins. 3. Biosynthesis of circular bacteriocins. 4. Structure of circular bacteriocins. 5. Modes of action of circular bacteriocins. 6. Enterocin AS-48. 7. Potential applications of circular bacteriocins. 8. Summary

Słowa kluczowe: aktywność antymikrobiologiczna, bakterie kwasu mlekowego, bakteriocyny cykliczne, enterocyna AS-48
Key words: antimicrobial activity, lactic acid bacteria, circular bacteriocins, enterocin AS-48

1. Charakterystyka i klasyfikacja bakteriocyn o budowie cyklicznej

Bakteriocyny stanowią zróżnicowaną funkcjonalnie rodzinę toksyn, a specyficzną cechą, która je łączy jest fakt, że są peptydami lub białkami syntetyzowanymi rybosomalnie. Wykazują działanie antagonistyczne w stosunku do szczepów przeważnie blisko spokrewnionych z producentem bakteriocyny, który jednocześnie posiada specyficzny sprzężony mechanizm immunologiczny chroniący go przed działaniem własnej toksyny [15, 42]. Bakteriocyny cykliczne wytwarzane są przez bakterie Gram-dodatnie, a ich antagonistyczna aktywność skierowana jest głównie w stosunku do bakterii kwasu mlekowego oraz bakterii z rodzajów *Staphylococcus*, *Listeria*, *Bacillus* i *Clostridium* [26]. W związku ze znacznym zróżnicowaniem bakteriocyn, peptydy cykliczne klasyfikowane są w niejednoznaczny sposób, m.in. jako należące do podklasy IIc według Cottera i wsp.

[2005], do podklasy IId według Nes i wsp. [2007], często zaliczane są również do nowej klasy IV (przy podziale bakteriocyn na lantybiotyki, termostabilne niezmodyfikowane postranslacyjnie bakteriocyny, duże termolabilne bakteriocyny i bakteriocyny cykliczne) [18, 45, 54] lub do nowo utworzonej klasy V uwzględniając podział Klaenhammera [47, 50, 75]. Bakteriocyny cykliczne charakteryzują się obecnością wiązania peptydowego między C- i N-końcem cząsteczki i cyklizacją szkieletu w układzie „głowa-ogon” („head-to-tail”). Budowa cykliczna czyni te bakteriocyny odpornymi na wiele enzymów proteolitycznych oraz działanie wysokich temperatur. Mimo iż peptydy o zbliżonej strukturze zostały zidentyfikowane w organizmach ssaków, roślin i grzybów, w odróżnieniu od cyklicznych polipeptydów produkowanych przez organizmy eukariotyczne, cykliczne bakteriocyny nie zawierają mostków disiarczkowych. Ponadto w przeciwieństwie do większości peptydów o budowie cyklicznej, które są wytwarzane jako

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

prekursory powstające dzięki wydłużeniu końców C i N, bakteriocyne cykliczne syntetyzowane są w wyniku wydłużenia jedynie N-końca [86].

Pierwszą bakteriocyną cykliczną, która została wyizolowana i zidentyfikowana, jest enterocyna AS-48, wytwarzana przez *Enterococcus faecalis*, dlatego obecnie jest najlepiej poznanym związkiem tego typu. Od odkrycia AS-48 w 1986 roku [29] i opisanie jej cyklicznej natury [79] do chwili obecnej zidentyfikowano kilkanaście innych bakteriocyne cyklicznych (Tab. I). Liczba ta jest jednak nieporównywalnie mniejsza od liczby opisanych bakteriocyne o strukturze liniowej. Ze względu na właściwości fizykochemiczne i podobieństwo sekwencji genu kodującego, bakteriocyne cykliczne dzieli się na dwie podgrupy. Podgrupa 1 to kationowe bakteriocyne cykliczne z punktem izoelektrycznym (pI) bliskim 10. Do wspomnianej podgrupy zalicza się m.in.: wspomnianą wyżej enterocynę AS-48, enterocynę NKR-5-3B syntetyzowaną przez *Enterococcus faecium* NKR-5-3 [44], garwicynę ML wytwarzaną przez *Lactococcus garvieae* [17], uberolizynę produkowaną przez *Streptococcus uberis* [87], karnocyklinę A pochodzącą od *Carnobacterium maltaromaticum* [64], laktocyklicynę Q syntetyzowaną przez *Lactococcus* sp. [81], amylocyklinę wytwarzaną przez *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 [82], cyrkularynę A, której producentem jest *Clostridium beijerinckii* [47] oraz leukocyklicynę Q pochodzącą od *Leuconostoc mesenteroides* [67] (Tab. I). Podgrupa 2 to bakteriocyne cykliczne o znacznie niższym pI (w przedziale 4–7): acydocyna B syntetyzowana przez *Lactobacillus acidophilus* M46 [3], gazerycyna A produkowana przez *Lactobacillus gasseri*

[50] oraz butyrywibriocyna AR10 wytwarzana przez *Butyrivibrio fibriosolvens* [46] (Tab. I). Początkowo do podgrupy 2 zaliczana była również reuterycyna 6. Jednak kolejne analizy wykazały, że masa cząsteczkowa (5,65 kDa) i struktura pierwszorzędowa reuterycyny 6 produkowanej przez *Lb. reuteri* LA6 są identyczne z masą i strukturą gazerycyny A [11, 48, 49]. Większość bakteriocyne cyklicznych zbudowana jest z 58–70 aminokwasów i posiada masę cząsteczkową w zakresie 5,6–7,2 kDa [26]. Do bakteriocyne o strukturze cyklicznej bywa również zaliczana subtylozyna A [51]. Jednak ze względu na znacznie mniejszą masę cząsteczkową (3,4 kDa, 35 aminokwasów), ale również nietypową budowę – obecność trzech mostków tioeterowych łączących atomy siarki 3 reszt cysteinowych z atomami węgla α Phe 22, Thr 28 i Phe 31, jej przynależność do bakteriocyne cyklicznych bywa kwestionowana [86].

2. Genetyka bakteriocyne cyklicznych

Struktura genetyczna niektórych bakteriocyne cyklicznych została dokładnie poznana, a analiza funkcjonalna klastrów genowych enterocyny AS-48 i kilku innych bakteriocyne cyklicznych dała wgląd w rolę poszczególnych genów kodujących procesy biosyntezy tych substancji. Klastry genowe bakteriocyne cyklicznych są zlokalizowane w chromosomach lub plazmidach i mają wiele cech wspólnych. Geny kodujące poszczególne bakteriocyne wykazują również zgodność sekwencji na poziomie 20–30%. Minimalny zestaw genów niezbędny do syntezy bakteriocyne cyklicznej

Tabela I
Zestawienie bakteriocyne o budowie cyklicznej

Bakteriocyna	Producent	Piśmiennictwo
Enterocyna AS-48	<i>Enterococcus faecalis</i> S-48	[29]
Garwicyna ML	<i>Lactococcus garvieae</i> DCC43	[17]
Uberolizyna	<i>Streptococcus uberis</i> 42	[87]
Karnocyklina A	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> UAL307	[64]
Laktocyklicyna Q	<i>Lactococcus</i> sp. szczep QU 12	[81]
Amylocyklina	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	[82]
Cyrkularyna A	<i>Clostridium beijerinckii</i> ATCC 25752	[47]
Leukocyklicyna Q	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> TK41401	[67]
Enterocyna NKR-5-3B	<i>Enterococcus faecium</i> NKR-5-3	[44]
Enterocyna NKR-5-3C	<i>Enterococcus faecium</i> NKR-5-3	[43]
Aureocyklicyna 4185	<i>Staphylococcus aureus</i> 4185	[76]
Pneumocyklicyna	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	[16]
Acydocyna B	<i>Lactobacillus acidophilus</i> M46	[3]
Gazerycyna A	<i>Lactobacillus gasseri</i> LA39	[50]
Reuterycyna 6	<i>Lactobacillus reuteri</i> LA6	[48]
Butyrywibriocyna AR10	<i>Butyrivibrio fibriosolvens</i> AR10	[46]

i oporności na nią obejmuje 5–7 genów [27]. Podstawową składową klastra jest gen strukturalny, który koduje peptyd prekursorowy, zawierający sekwencję liderową składającą się z 2–48 reszt aminokwasowych [26]. Poza tym wszystkie klastry genowe zawierają gen kodujący niewielkie, hydrofobowe białko kationowe, które odpowiedzialne jest za oporność producenta bakteriocyny na wytwarzaną bakteriocynę [26, 85]. Minimalny zestaw genów zawiera również gen kodujący ATPazę i białko błonowe z rodziny DUF95, które związane jest opornością i sekrecją bakteriocyn cyklicznych [27]. Ponadto w zależności od podgrupy, klastry genowe kodują duże, prawdopodobnie transbłonowe białko (podgrupa 1 bakteriocyn cyklicznych) lub białko błonowe wykazujące podobieństwo do rodziny transporterów typu ABC-2 (podgrupa 2) [26]. Większość klastrów genowych bakteriocyn podgrupy 1 zawiera również dodatkowy operon kodujący kompleks transportera ABC (permeazę, ATPazę i białko zewnątrzkomórkowe). Rola transportera ABC nie jest w pełni wyjaśniona. W przypadku enterocyny AS-48 prawdopodobnie jego rola polega na wzmacnianiu syntezy bakteriocyny i zwiększeniu oporności producenta na wytwarzaną bakteriocynę. Porównanie struktury genetycznej znanych bakteriocyn cyklicznych wskazuje, że z wyjątkiem subtylozyny A, której przynależność do bakteriocyn o budowie cyklicznej jest zresztą poddawana pod wątpliwość, polipeptydy te mają szereg cech wspólnych, co może świadczyć o ich podobnej biogenezie [54, 87].

3. Biosynteza bakteriocyn cyklicznych

Mechanizmy zachodzące podczas biosyntezy bakteriocyn cyklicznych, enzymy odpowiedzialne za ten proces, a zwłaszcza sprzężenie mechanizmów z działaniem enzymów, nie są w pełni poznane [73]. Bakteriocyny cykliczne to polipeptydy przeważnie hydrofobowe, co sugerowałoby, że są to białka związane z błoną komórkową, a co za tym idzie ich biosynteza prawdopodobnie zachodzi na powierzchni błon. Proces biosyntezy bakteriocyn cyklicznych obejmuje trzy etapy: odłączenie sekwencji liderowej, cyklizację i eksport z komórki [27].

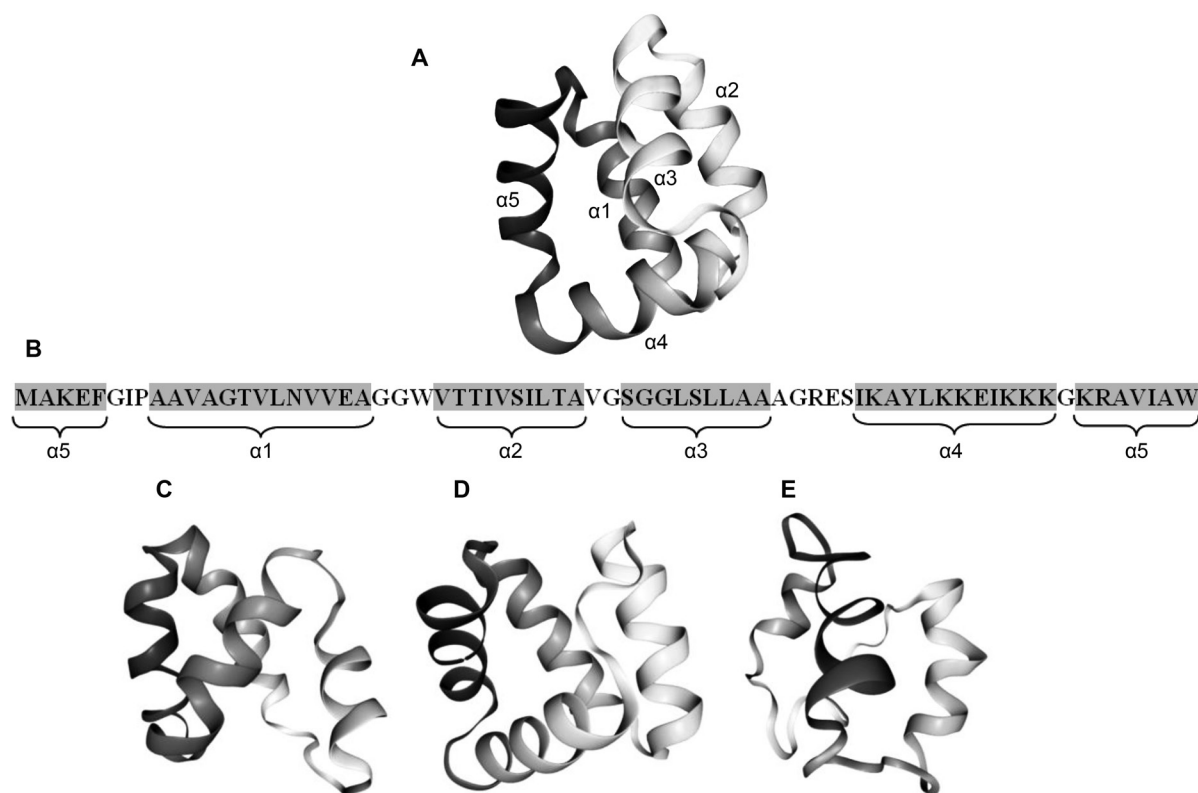
Proces oddzielenia sekwencji liderowej jako pierwszego etapu biosyntezy badano na przykładzie garwicy ML [27]. Wykazano, że odcięcie sekwencji liderowej i cyklizacja to dwa odrębne etapy. Ponadto wnioskowano, że odszczepienie sekwencji liderowej nie jest wynikiem działania żadnego z peptydów zakodowanych w klastrach genowych, a jest procesem katalizowanym przez specyficzny lub niespecyficzny, nieznaną enzym proteolityczny, co tłumaczyłoby brak genów kodujących enzymy proteolityczne w klastrach genowych. Możliwym jest, że sekwencja liderowa działa

na zasadzie punktu kontroli całego procesu biosyntezy bakteriocyn [26].

Cyklizacja – drugi etap biosyntezy bakteriocyn o budowie cyklicznej, odróżniający je od pozostałych bakteriocyn, to jeszcze mniej poznany obszar tego zagadnienia. Końce N i C bakteriocyn cyklicznych zbudowane są głównie z aminokwasów hydrofobowych, a miejsce połączenia C- i N-końca za pomocą wiązania peptydowego zlokalizowane wewnątrz α -helisy. Takie ułożenie wymaga, aby proces cyklizacji zachodził w hydrofobowym rdzeniu cząsteczki. Analiza mutacyjna bakteriocyny AS-48 wykazała, że zamiana aminokwasów na końcach N i C skutkuje powstaniem formy liniowej, zamiast cyklicznej. Obrazuje to więc, że natura końców N i C jest kluczowa w procesie cyklizacji [18]. Ponadto wydaje się, że za mechanizm cyklizacji nie jest odpowiedzialne tylko jedno białko, a raczej ich grupa, która składa się z minimum 3 białek transbłonowych i ATPazy. Określenie czy cyklizacja zachodzi według tego rozwiązania, wymaga jednak dalszych badań [26].

4. Struktura bakteriocyn cyklicznych

Jak wspomniano wcześniej bakteriocyny cykliczne dzieli się na dwie podgrupy. Wiedza o strukturze bakteriocyn cyklicznych z podgrupy 1 opiera się głównie o badania nad najlepiej poznaną bakteriocyną AS-48, znane są również struktury trójwymiarowe karnocykliny A i enetrocyny NKR-5-3B (Rys. 1A, C, D). Wspomniane bakteriocyny cykliczne charakteryzują się zwartą budową. Ich łańcuch polipeptydowy formuje struktury α -helisy (w przypadku enterocyny AS-48 – 5 α -helisy, karnocykliny A i enterocyny NKR-5-3B – 4 α -helisy), które obudowują hydrofobowy rdzeń [33, 44, 63, 74]. Reszty aminokwasowe odpowiedzialne za cyklizację zlokalizowane są w segmencie helikalnym. Na powierzchni cząsteczki znajdują się reszty aminokwasowe, które determinują kationowy charakter [26]. Badania nad strukturą AS-48 wykazały podobieństwo do NK-lizyny, polipeptydu zbudowanego z 78 reszt aminokwasowych. NK-lizyna produkowana jest m.in. przez komórki NK (Natural Killers) i wykazuje działanie antybakteryjne i cytotoksyczne. NK-lizyna charakteryzuje się obecnością domeny sapozynowej, zawierającej trzy mostki disiarczkowe [84]. Enterocyna AS-48 posiada także domenę o strukturze analogicznej do sapozynowej, pozbawioną jednak mostków disiarczkowych. Porównanie struktur obu związków sugeruje, że domena sapozynowa może mieć wpływ na działanie przeciwdrobnoustrojowe bakteriocyn cyklicznych zaliczanych do podgrupy 1 [33]. Co więcej, analiza właściwości antybakteryjnych liniowej formy AS-48, otrzymanej syntetycznie, wykazała, że charakteryzuje się ona niższą zawartością struktury helikalnej (badania



Rys. 1. Struktura bakteriocyn cyklicznych

A. Struktura trójwymiarowa enterocyny AS-48 (PDB: 1E68 [33]). B. Sekwencja aminokwasowa enterocyny AS-48. C. Karnocyklina A (PDB: 2KJF [63]). D. Enterocyna NKR-5-3B (PDB: 2MP8 [44]). E. Acydocyna B (PDB: 2MWR [3]). Trójwymiarowa wizualizacja – NGL Viewer [77, 78].

dichroizmu kołowego), a cyklizacja omawianego typu bakteriocyn, nie tyle wpływa na ich aktywność (choć zaobserwowano ograniczenie antagonistycznego działania), ale istotna jest do stabilizacji struktury [68]. Z drugiej strony w badaniach prowadzonych nad garwiczną ML nie wykazano aktywności przeciwdrobnoustrojowej formy liniowej, czyli budowa cykliczna w przypadku tej bakteriocyny wydaje się być niezbędna do prawidłowego działania [27].

Odnosnie bakteriocyn podgrupy 2, struktura trójwymiarowa butyrywibriocyny AR10 i gazercyny A nie jest dotąd poznana, udało się jednak, stosując technikę NMR, określić budowę acydocyny B [3] (Rys. 1E). Bakteriocyny cykliczne podgrupy 2 wykazują wysoki stopień podobieństwa sekwencji aminokwasowej, natomiast znacznie różnią się od bakteriocyn podgrupy 1. Prawdopodobnie wszystkie zbudowane są z 4 α -helis o zbliżonej długości, oddzielonych krótkimi fragmentami, zawierającymi glicynę lub prolinę. Pomimo że ogólny schemat struktury wydaje się być podobny do bakteriocyn podgrupy 1 (4 α -helisy otaczające hydrofobowy rdzeń z domeną sapozynową), występowanie różnic w budowie między podgrupami sugerują chociażby mocno różniące się punkty izoelektryczne, charakteryzujące przedstawicieli tych dwóch podgrup [63].

Niewielkie rozmiary i charakterystyczna budowa bakteriocyn cyklicznych decydują o ich oporności na

wysokie temperatury, zmiany pH i rozkład pod wpływem enzymów proteolitycznych. Poza tym podobieństwa struktury omawianych peptydów mogą oznaczać wspólny mechanizm ich działania. W szczególności dodatni ładunek na powierzchni cząsteczek bakteriocyn cyklicznych wydaje się odgrywać istotną rolę w oddziaływaniu i insercji do wnętrza ujemnie naładowanej błony fosfolipidowej komórek docelowych [26].

5. Mechanizm działania bakteriocyn cyklicznych

Uważa się, że bakteriocyny o budowie cyklicznej działają poprzez przerwanie integralności błon komórkowych komórek wrażliwych. Powoduje to wyciek jonów, degradację błon i w konsekwencji śmierć komórek [28]. Większość bakteriocyn wytwarzanych przez bakterie Gram-dodatnie jest aktywna wyłącznie przeciwko bakteriom Gram-dodatnim, co tłumaczone jest faktem, że zewnętrzna błona bakterii Gram-ujemnych stanowi dla tych bakteriocyn barierę. Zidentyfikowano jednak takie bakteriocyny bakterii Gram-dodatnich (AS-48, laktocyklina Q czy subtylozyna A), które wykazują aktywność w pewnych szczególnych warunkach również przeciwko bakteriom Gram-ujemnym. Wymaga to jednak dużo wyższych stężeń tych bakteriocyn, niż w przypadku aktywności typowej dla tej

grupy (przeciwko bakteriom Gram-dodatnim) albo zastosowania dodatkowego czynnika, który zaburza integralność błony zewnętrznej, jak np. EDTA [86].

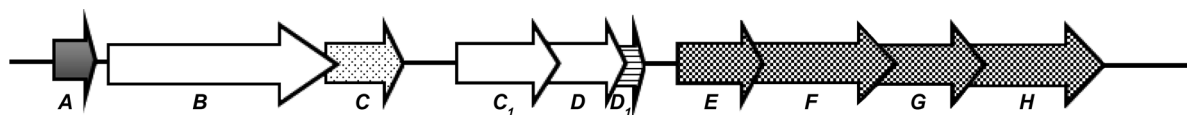
Jakkolwiek wspólne cechy strukturalne i właściwości fizykochemiczne bakteriocyn cyklicznych sugerują, że mechanizm działania tych związków jest podobny, jednak prowadzone do tej pory badania poszczególnych bakteriocyn wykazują między nimi sporo różnic. W badaniach mechanizmu działania enterocyny AS-48 dowiedziono, że do aktywności antymikrobiologicznej nie jest wymagane wiązanie z odpowiednim receptorem w błonie komórkowej komórki docelowej. Bakteriocyna ta tworzy nieselektywne pory w liposomach, co powoduje wyciek jonów i komponentów komórkowych o niskiej masie cząsteczkowej [28]. Inna bakteriocyna cykliczna – karnocyklina A również tworzy kanały jonowe w membranach lipidowych, są one jednak anio-noselektywne i ich przepuszczalność zależy od różnicy potencjałów [32].

W przypadku wielu bakteriocyn wykazano, że ich działanie przeciwdrobnoustrojowe jest związane z receptorami, czyli rozpoznawaniem specyficznych białek na powierzchni komórek wrażliwych. W związku z tym podjęto badania pod tym kątem, również w przypadku bakteriocyn o budowie cyklicznej. Trudno jednak wysnuć jednoznaczne wnioski. Analiza AS-48 i karnocykliny A wykazała jak wspomniano wyżej, że bakteriocyny te tworzą pory w liposomach i membranach lipidowych, co może wskazywać, że dla bakteriocyn o budowie cyklicznej wystarczająca i kluczowa dla działania, jest bezpośrednia interakcja z komórką wrażliwą. Pozwala to z kolei wykluczyć tezę, że niezbędne do działania antymikrobiologicznego tych związków są receptory na powierzchni komórek wrażliwych [26]. Enterocyna AS-48 i karnocyklina A analizowane były jednak pod tym kątem z wykorzystaniem dużo wyższych stężeń, w porównaniu do poziomów, które są wystarczające do ich działania *in vivo*. Z drugiej strony, analizując aktywność garwicyny ML wykazano korelację między działaniem bakteriocyny, a obecnością kompleksu transportera ABC w komórce wrażliwej. Obecność kompleksu transportera odpowiedzialna jest za wrażliwość komórek docelowych, natomiast jego brak warunkuje oporność komórki na garwicynę ML, co może oznaczać, że kompleks ten jest receptorem niezbędnym do działania bakteriocyny. Jednakże zwiększenie stężenia bakteriocyny również w tym przypadku skutkowało aktywnością niezależną od obecności receptora. Podsumowując, prawdopodobnym jest, że działanie bakteriocyn cyklicznych zależne jest od ich stężenia. Ich aktywność wydaje się być niespecyficzna w wyższych stężeniach, w niższych natomiast specyficzna i zależna od obecności receptora na powierzchni komórek szczepów bakterii wrażliwych [26].

6. Enterocyna AS-48

Enterocyna AS-48 to pierwsza opisana, a zarazem najlepiej poznana bakteriocyna o budowie cyklicznej. Struktura pierwszorzędowa AS-48 charakteryzuje się przewagą aminokwasów zasadowych w stosunku do kwaśnych (Rys. 1B). Stwierdzono znaczny udział aminokwasów hydrofobowych takich jak alanina, prolina, walina czy metionina, a także pozbawionych ładunku aminokwasów hydrofilowych (m.in. seryna, glicyna, treonina i tyrozyna). Wspomniana bakteriocyna syntetyzowana jest jako liniowy prekursor zbudowany z 105 aminokwasów, od którego odcinana jest sekwencja liderowa obejmująca 35 aminokwasów. Dojrzały peptyd składa się z 70 reszt aminokwasowych i nie zawiera mostków disiarczkowych; jego masa cząsteczkowa wynosi 7,14 kDa, a punkt izoelektryczny 10,09 [36]. Poznana została także budowa drugorzędowa i trzeciorzędowa enterocyny AS-48. Bakteriocyna ta składa się z 5 α -helis otaczających zwarty, hydrofobowy rdzeń (Rys. 1A). Wiązanie peptydowe pomiędzy N- i C-końcem znajduje się w środku piątej helisy, pomiędzy N-końcową metioniną a C-końcowym tryptofanem w pozycji 70 (Rys. 1A, B). Sekwencję aminokwasową AS-48 cechuje wysoce asymetryczny rozkład ładunków dodatnich – wszystkie zasadowe aminokwasy, których łącznie jest 10, znajdują się w segmencie 26 reszt, podczas gdy cały łańcuch polipeptydowy enterocyny zbudowany jest z 70 reszt [68]. Cyklizacja oraz zwarta budowa sprawiają, że enterocyna AS-48 cechuje się wyjątkową stabilnością struktury i opornością na wysoką temperaturę, zmiany pH, a także czynniki denaturujące.

Analiza uwarunkowań genetycznych wykazała, że bakteriocyna AS-48 kodowana jest przez geny znajdujące się w plazmidach zależnych od feromonów. Kłaster genowy *as-48* znajduje się w plazmidzie pMB2, region o długości 7,8 kbp koduje informacje niezbędne do syntezy i oporności na AS-48 [55]. Ekspresję AS-48 i oporność producenta na wspomnianą bakteriocynę warunkuje 10 genów w klastrze genowym, w tym gen strukturalny *as-48A*, gen *as-48D* kodujący białko opornościowe i geny kodujące kompleks transportera ABC (Rys. 2) [24, 25]. Dwa nakładające się geny *as-48BC* zlokalizowane są 73 nukleotydy poniżej nonsensownego kodonu TAA genu strukturalnego, od którego oddzielone są charakterystyczną odwróconą sekwencją powtórzoną IR (Inverted Repeat). IR jest sekwencją, która początkowo uważana była za sygnał terminatorowy transkrypcji [54]. Obecnie jednak przypisuje się IR rolę charakterystycznego substratu dla endorybonukleaz, zaangażowanych w modyfikację mRNA, i kluczowej sekwencji w kontroli ekspresji genów *as-48BC* [25]. W dalszej kolejności w klastrze genowym położone są nakładające się geny *as-48C₁DD₁*, oddzielone



Rys. 2. Organizacja klastra genowego *as-48* zaangażowanego w produkcję i oporność na enterocynę AS-48

A – gen strukturalny *as-48A* kodujący peptyd prekursorowy; *B* – gen *as-48B* kodujący duże, hydrofobowe białko transmembranowe; *C* – gen *as-48C* kodujący białko należące do rodziny DUF96; *C₁D* – geny *as-48C₁D* związane z odłączeniem sekwencji liderowej i eksportem bakteriocyny; *D* – gen *as-48D* kodujący białko wiążące ATP; *D₁* – gen *as-48D₁* kodujący białko odpowiadające za oporność producenta na AS-48; *EFGH* – geny *as-48EFGH* kodujące kompleks transportera ABC [24, 55].

międzygenowym regionem liczącym 205 nukleotydów od nakładających się genów *as-48EFGH*, poprzedzających sekwencję terminalną [24, 54] (Rys. 2).

Badania mechanizmu działania enterocyny AS-48 na komórki wrażliwe *E. faecalis* S-47 wykazały, że od 2 do 10 cząsteczek bakteriocyny potrzebne jest do inaktywacji jednej komórki wrażliwej. Odwracalność tego procesu zależy jednak od czasu ekspozycji na AS-48. W krótkim czasie od zastosowania bakteriocyny efekt inaktywacji może być odwrócony, np. poprzez dodatek trypsyny. Długi czas interakcji uniemożliwia powtórne odzyskanie aktywności przez komórki wrażliwe, które miały kontakt z enterocyną AS-48 [30].

Badania dotyczące mechanizmu działania enterocyny AS-48 przeprowadzano również na bakteriiach Gram-ujemnych (*E. coli*), wobec których AS-48 wykazuje działanie bakteriobójcze, ale nie aktywność bakteriolytyczną. Obserwowano podobne efekty jak w przypadku komórek wrażliwych *E. faecalis* oraz innych bakterii Gram-dodatnich, jednak ich osiągnięcie wymagało stosowania dużo wyższych stężeń bakteriocyny [31].

Analizowano także wpływ enterocyny nie tylko na żywotność, ale również na szereg innych parametrów życiowych badanych komórek. Wykazano, że bakteriocyna AS-48 zaburza zdolność komórek *E. faecalis* do gromadzenia szeregu prekursorów (np. [6-³H] tymidyny, L-[4,5-³H] leucyny), a co za tym idzie możliwości wbudowania ich w docelowe struktury, takie jak DNA, RNA i peptydoglikan ściany komórkowej. Ponadto obecność AS-48 uniemożliwia utrzymanie cytoplazmatycznego stężenia jonów K⁺ i podnosi poziom jonów Na⁺. Na podstawie tych analiz wnioskowano, że mechanizm działania bakteriocyny wiąże się z niszczeniem błony komórkowej [30, 31]. Z kolei inne badania wykazały szybki spadek potencjału błonowego komórek traktowanych AS-48, a co za tym idzie upośledzenie transportu aminokwasów oraz prekursorów, i co się z tym wiąże szlaków biosyntezy. Interpretacja wyników analizy wpływu AS-48 na transport i przenikanie pęcherzyków błonowych, pozwoliła na potwierdzenie, że zewnętrzna błona bakterii Gram-ujemnych wykazuje dużo większą oporność na działanie bakteriocyny niż komórki bakterii Gram-dodatnich oraz że potencjał błonowy nie jest niezbędny do tworzenia przez nią kanałów jonowych lub porów o niskiej specyficzności

w błonach komórek wrażliwych [28]. Na podstawie analizy struktury enterocyny AS-48 zaproponowano, że mechanizm działania tej bakteriocyny opiera się o funkcjonowanie dwóch konformacji dimerów – rozpuszczalnej w wodzie formy DF-I i związanej z błoną DF-II. Zmiana konformacji dimeru DF-I do DF-II wymaga rotacji cząsteczki, podczas której częściowo ukryte hydrofobowe α -helisy 1 i 2 ulegają rearanżacji, umożliwiając enterocynie AS-48 integrację z błoną komórki wrażliwej [80].

Oprócz właściwości bakteriobójczych, enterocyna AS-48 wykazuje również aktywność bakteriolytyczną, która wydaje się być wtórną w stosunku do oddziaływania na błonę komórek wrażliwych. Sugeruje się, że podczas interakcji z błoną, następująca jej depolaryzacja skutkuje utratą kontroli nad enzymami litycznymi ściany komórkowej. Inhibicja syntezy białek lub RNA w komórkach wrażliwych przed inkubacją z AS-48 wiąże się z ograniczeniem autolizy. Aktywność bakteriolytyczna enterocyny zależna jest ponadto od temperatury, wymaga potencjału czynnościowego błony oraz może być wstrzymana np. przez dodatek EDTA, a aktywowana przez trypsynę [36].

W badaniach dotyczących mechanizmu działania bakteriocyn cyklicznych zwrócono również uwagę na reakcję komórek wrażliwych na obecność bakteriocyny. Przykładem analizującym to zagadnienie jest badanie odpowiedzi szczepu *Bacillus cereus* ATCC 14579 na AS-48. Analiza transkryptomu *B. cereus* przeprowadzona na 5200 genach wykazała, że ekspresja 24 genów podlegała zmianom po zastosowaniu AS-48. Większość genów charakteryzowała zwiększona ekspresja, natomiast w przypadku operonu odpowiedzialnego za metabolizm argininy zaobserwowano efekt przeciwny, co autorzy badań tłumaczą jako wynik prawdopodobnie niewielkich różnic we wzroście komórek traktowanych AS-48 w stosunku do próby kontrolnej, niewidocznych w pomiarach gęstości optycznej (OD₆₀₀). Najbardziej wzmożona ekspresja dotyczyła operonu BC4206-BC4207, zawierającego gen *BC4206*, kodujący białko regulatorowe z rodziny PadR oraz gen *BC4207*, kodujący białko błonowe o nieznannej funkcji, zbudowane z 4 segmentów transbłonowych, które uznano za powiązane z mechanizmem oporności przeciwko enterocynie AS-48. Dokładne zrozumienie mechanizmów oporności

komórek wrażliwych na bakteriocyny, może odgrywać kluczową rolę w przyszłości, podczas prób stosowania bakteriocyn w przemyśle na szeroką skalę [34].

7. Potencjalne zastosowanie bakteriocyn cyklicznych

Większość jak dotąd opisanych bakteriocyn o budowie cyklicznej wytwarzanych jest przez bakterie fermentacji mlekowej, które w większości posiadają status GRAS (Generally Recognised As Safe). Ponadto bakteriocyny te charakteryzują się termostabilnością, a także wytrzymałością na zmiany pH i działanie szeregu enzymów proteolitycznych (np. karboksy- i aminopeptydaz). Cechy te powodują, że bakteriocyny o budowie cyklicznej są przedmiotem wielu badań prowadzonych szczególnie pod kątem ich potencjalnego zastosowania w przemyśle spożywczym. Połączenie wyżej wymienionych korzystnych właściwości z faktem, że nie stwierdzono toksyczności enterocyny AS-48 względem komórek eukariotycznych [36, 63, 65] może oznaczać, że bakteriocyny cykliczne nie tylko byłyby lepszymi dodatkami do żywności w stosunku do używanych obecnie konserwantów (np. azotanów (III) i (V)), ale również mniej stabilnych bakteriocyn o budowie liniowej. Stosowanie bakteriocyn o budowie cyklicznej w żywności mogłoby nie tylko doprowadzić do redukcji użycia konserwantów, ale także ograniczenia niektórych zabiegów przemysłowych, np. działania wysoką temperaturą na produkty spożywcze. Pozwoliłoby to otrzymać produkty bezpieczne dla zdrowia, o lepszej jakości organoleptycznej, a także zredukować koszty (choćby w przypadku eliminacji działania wysokiej temperatury), co byłoby korzystne zarówno dla konsumentów, jak i producentów [86].

Najliczniejsze badania pod kątem potencjalnego zastosowania do utrwalania żywności dotyczą najlepiej poznanej z bakteriocyn o budowie cyklicznej – enterocyny AS-48. Analiza wpływu enterocyny AS-48 na mikroflorę mleka i produktów mlecznych wykazała, że AS-48 znacząco ogranicza rozwój *Staphylococcus aureus* w odtłuszczonej mleku, dodatkowo zaobserwowano wzmocnienie efektu hamowania w kombinacji z niziną, jedyną bakteriocyną o strukturze liniowej, która posiada status GRAS i jest stosowana w przemyśle spożywczym. Zastosowanie AS-48 w połączeniu z techniką pulsacyjnego pola elektrycznego o wysokiej intensywności (HIPEF – High Intensity Pulsed Electric Field), która jest wykorzystywana m.in. do kontrolowania bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności, również skutkowało spotęgowaniem efektu inhibicji względem *S. aureus*. Wnioskowano, że połączenie dodatku AS-48 i techniki HIPEF, może być w przyszłości z powodzeniem stosowane w celu eliminacji *S. aureus*

z mleka [83]. Według Ananou i wsp. [8] dodatek AS-48 do odtłuszczonego mleka również prowadzi do inaktywacji bakterii *Listeria monocytogenes*. W badaniu zastosowano liofilizat AS-48, w przeciwieństwie do pozostałych analiz, w których badano płynny preparat enterocyny lub kulturę bakterii *E. faecalis*, zdolną do syntezy AS-48 w analizowanym produkcie. Obecność enterocyny w produktach mlecznych – w odtłuszczonych serach dojrzewających i niedojrzewających, także znacząco wpływała na zredukowanie ilości komórek *B. cereus* i *S. aureus* [70, 83].

Produkty mięsne również mogą stanowić źródło niebezpiecznych patogenów. W celu określenia możliwości biokontroli rozwoju *S. aureus* oraz *L. monocytogenes* przez bakteriocyny cykliczne, badano wpływ dodatku AS-48 do kielbasy wieprzowej [5, 7]. W odniesieniu do *L. monocytogenes*, zastosowano roztwory bakteriocyny o różnych aktywnościach (112 AU/g, 225 AU/g, 450 AU/g) oraz produkującą ją szczepu (*E. faecalis* A-48-32 i *E. faecium* S-32-81). Już najniższe stężenie AS-48 znacząco ograniczało wzrost *L. monocytogenes*, przy wyższej zawartości bakteriocyny (225 AU/g) przez pierwsze 3 dni doświadczenia obserwowano całkowite zahamowanie rozwoju badanego mikroorganizmu, podczas gdy zastosowanie najwyższego stężenia (450 AU/g) eliminowało wzrost *L. monocytogenes* przez 9 dni inkubacji w 20°C [5]. Użycie szczepów produkujących bakteriocynę w ilości 10⁷ jtk/g również prowadziło do zahamowania rozwoju niepożądanego mikroflory. Z kolei analiza kielbasy wieprzowej w kierunku kontroli wzrostu *S. aureus* wykazała, że zarówno dodatek częściowo oczyszczonej bakteriocyny (30 lub 40 µg/g), jak i produkującego ją szczepu *E. faecalis* (10⁷ jtk/g) znacząco ograniczało rozwój *S. aureus*. Zaobserwowano, że poza hamowaniem wzrostu wspomnianego mikroorganizmu, AS-48 działa antagonistycznie również w stosunku do bakterii mlekowych, co w przypadku badanego wyrobu jest traktowane jako efekt negatywny [7].

Innym produktem mięsnym, w którym analizowano aktywność antagonistyczną AS-48 wobec *L. monocytogenes* i *S. aureus*, była gotowana szynka wieprzowa. Badano wpływ samej enterocyny (20, 40 i 60 µg/g) lub w kombinacjach z powszechnie używanymi konserwantami (azotanami(III) i (V), trifosforanem pentasodowym, benzoanem sodu, sorbinianem potasu, octanem sodu, mleczanem sodu), a także w połączeniu z zastosowaniem temperatury subletalnej (60°C) [4]. Uzyskane wyniki potwierdziły, że kontrola mikrobiologiczna mięs jest możliwa przy użyciu enterocyny AS-48. Należy jednak podkreślić fakt, że zastosowanie samej enterocyny nie wyeliminowało ponownego wzrostu *L. monocytogenes* po fazie skutecznej inhibicji. Najbardziej obiecujące wyniki otrzymano w przypadku biokontroli tego drobnoustroju podczas przechowywania produktu w temperaturze 5°C, przy użyciu AS-48 (40 µg/g) w połączeniu

z azotanami (III) lub (V) w stężeniu 0,007%. Gatunek *S. aureus*, który określany jest jako bardziej oporny na działanie bakteriocydu, inaktywowany był już przy użyciu samej AS-48, a efekt potęgował dodatek azotanów (III) lub (V), trifosforanu pentasodowego, mleczanu sodu oraz octanu sodu. Największy stopień zahamowania rozwoju obydwu gatunków bakterii uzyskano w kombinacji AS-48 (60 µg/g) z trifosforanem pentasodowym, a efekt ten był wyraźnie wzmacniany przez działanie temperatury subletalnej [4].

Gotowana szynka wieprzowa była przedmiotem innego badania, dotyczącego aktywności AS-48 względem *Lactobacillus sakei* (gatunek powodujący zepsucie mięsa, objawiające się śluzowaceniem), *Brochothrix thermosphacta* (gatunek odpowiedzialny za psucie mięsa i ryb, rozwijający się zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych) oraz *Staphylococcus carnosus* (jego wzrost jest powodem nieprzyjemnego zapachu zepsutego mięsa) [12]. Rozpatrywano znaczenie dodatku samej enterocydu, jej aplikacji wraz z konserwantami (azotanami (III) i (V), trifosforanem pentasodowym, benzoanem, octanem sodu, mleczanem sodu oraz pirofosforanem sodu), a także przechowywania w modyfikowanej atmosferze (40% CO₂/60% N₂) oraz pakowania próżniowego. Najsilniejszą i nieodwracalną inhibicję względem *Lb. sakei* stwierdzono zarówno w przypadku zastosowania wyłącznie bakteriocydu AS-48 (60 µg/g), jak i przy jej niższym stężeniu (40 µg/g) w kombinacji z innymi konserwantami. W mniejszym, ale również znaczącym stopniu, AS-48 wykazywała aktywność antagonistyczną w stosunku do *S. carnosus* i *B. thermosphacta*. Przechowywanie w modyfikowanej atmosferze nie skutkowało żadnymi zmianami, pakowanie próżniowe natomiast spowodowało wzmocniony efekt inhibicji AS-48 wobec zarówno *B. thermosphacta*, jak i *Lb. sakei* [12].

Warto wspomnieć również o badaniu dotyczącym innego wyrobu mięsnego – fuetu (katalońskiej kiełbasy wieprzowej). W doświadczeniu analizowano wpływ AS-48 i wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP – High Hydrostatic Pressure) na rozwój *L. monocytogenes*, *S. aureus* i *Salmonella enterica*. Tak jak w poprzednich badaniach, otrzymano wyniki wskazujące, że po zastosowaniu bakteriocydu (148 AU/g) występowała znacząca redukcja liczby komórek *L. monocytogenes* (podczas dojrzewania wędliny i przechowywania w 7°C). Enterocydu AS-48 w kombinacji z HHP (400 MPa) znacząco hamowała rozwój *S. enterica* [6].

W doświadczeniach nad potencjalnym zabezpieczeniem żywności pochodzenia zwierzęcego uwzględniono również ryby i produkty rybne, które mogą stanowić ognisko rozprzestrzeniania się chorób przenoszonych przez żywność, głównie powodowanych przez biotoksyny morskie, aminy biogenne i wirusy. Większość schorzeń powoduje histamina, której toksyczny

wpływ może być wzmocniony przez obecność innych amin biogennych, np. putrescyny czy kadaweryny. W badaniu analizującym wpływ AS-48 na powstawanie amin biogennych w sardynkach stwierdzono, że enterocydu AS-48 znacząco obniżała poziom tych związków – putrescyny, kadaweryny, tyraminy i histaminy, a w połączeniu z przechowywaniem w modyfikowanej atmosferze lub pakowaniem próżniowym, również powodowała spadek aktywności bakterii kwasu mlekowego, produkujących tyraminę i histaminę [9]. Ponadto inne oznaczenia, w których obiektem były ryby (surowy morskiczek, surowy i wędzony łosoś), wykazały skuteczną inaktywację patogennego gatunku *L. monocytogenes* przez AS-48 [13].

Nie tylko produkty odzwierzęce stanowią potencjalne źródło zakażeń groźnymi patogenami, niebezpieczna może być również mikroflora związana z zepsuciem produktów roślinnych. Spożycie surowych owoców i warzyw może również być przyczyną niebezpiecznych infekcji drobnoustrojami chorobotwórczymi. Dodatkowo w przypadku warzyw i owoców ważne jest, aby wszelkie zabiegi mające na celu przedłużenie trwałości produktów i kontrolę mikroflory, również patogennej, miały znikomy wpływ na właściwości organoleptyczne żywności [2].

Prace doświadczalne sprawdzające wpływ AS-48 na rozwój *L. monocytogenes* w surowych owocach, prowadzone były z wykorzystaniem truskawek, malin, jeżyn, melona, arbuza, kiwi i gruszek. Próby stanowiły owoce myte roztworem bakteriocydu oraz mieszaniną bakteriocydu z konserwantami (trimetafosforanem sodu, mleczanem sodu, kwasem mlekowym, kwasem polifosforowym, karwakrolem, kwasem hydrocynamonowym, kwasem kumarowym, parabenem propylu, 2-nitropropanolem) i przechowywane w różnych temperaturach (-20, 6, 15, 22°C). Mycie z wykorzystaniem AS-48 skutkowało znaczną lub całkowitą inaktywacją *L. monocytogenes* w truskawkach, malinach i jeżynach, przechowywanych w 15 i 22°C do dwóch dni, a w przypadku truskawek i jeżyn przechowywanych w 6°C, nawet do sześciu dni. Działanie AS-48 w próbach pozostałych owoców, czyli melona, arbuza, kiwi i gruszek, przechowywanych w 15 i 22°C również wiązało się ze znacznym zmniejszeniem liczby komórek *L. monocytogenes*. Zaobserwowano jednak ponowne namnażanie komórek, które przetrwały kontakt z bakteriocyną. Zastosowanie kombinacji enterocydu z konserwantami wzmocniło efekty otrzymane w przypadku działaniem samej enterocydu, a użycie karwakrolu oraz parabenu propylu skutkowało wyeliminowaniem efektu ponownego wzrostu komórek przechowywanych nawet w 22°C [69].

Próby zapewnienia bezpieczeństwa mikrobiologicznego w surowcach roślinnych dotyczyły także warzyw. Ze względu na wzrastający popyt na surowe kiełki oraz szparagi, a także ich niski stopień obróbki przed spo-

życiem, przeprowadzono doświadczenia sprawdzające możliwości zastosowania enterocyny AS-48 do kontroli *L. monocytogenes* w próbach kiełków soi i lucerny oraz zielonych szparagów. W przypadku kiełków zaobserwowano znaczące zahamowanie wzrostu *L. monocytogenes* po umieszczeniu prób w roztworze bakteriocyny (25 µg/ml) przez okres 5 minut. Uzyskany efekt inhibicji potęgowało dodatkowo przechowywanie prób w temperaturze poniżej 22°C (6 i 15°C) oraz, podobnie jak w przypadku wcześniej opisywanych oznaczeń, gdy działanie enterocyny AS-48 połączono z użyciem chemicznych konserwantów. Istotne zahamowanie rozwoju *L. monocytogenes* uzyskano w kombinacji bakteriocyny z nadmanganianem potasu, kwasem octowym, kwasem cytrynowym, propionianem sodu lub sorbinianem potasu [19].

Kiełki soi, lucerny oraz szparagi użyto również w analogicznym oznaczeniu wykorzystania AS-48 w kierunku kontroli *B. cereus* i *Bacillus weihenstephanensis*. *B. cereus* to gatunek powszechnie występujący w glebie, względnie patogenny, czynnik etiologiczny m.in. zatruc pokarmowych, którego obecność stwierdzano w rozmaitych produktach spożywczych (m.in. produkty zbożowe, makarony, płatki, produkty mleczne, sosy i desery) [14]. *B. weihenstephanensis* natomiast jest psychrotolerancyjnym gatunkiem, zdolnym do wzrostu poniżej 7°C, bakteria ta była wykrywana w pasteryzowanym mleku przechowywanym w 7°C. Najsilniejsze ograniczenie rozwoju wspomnianych bakterii uzyskano w kombinacji AS-48 z chemicznymi konserwantami (chlorkiem heksadecylpirydyniowym, podchlorynem sodu oraz kwasem nadoctowym) [21].

Wpływ połączonego działania enterocyny, metod fizycznych oraz konserwantów na rozwój bakterii Gram-ujemnych badano w kiełkach soi. Pomimo że większość bakterii Gram-ujemnych jest oporna na działanie AS-48 poszukuje się czynników, które współdziałając z AS-48 mogłyby stanowić metody kontroli tej grupy bakterii w produktach roślinnych. Inaktywację *S. enterica* udało się osiągnąć w zasadowym roztworze (pH 9,0), zawierającym AS-48 w stężeniu 25 µg/ml, dodatkowo odgrzewanym przez 5 min. w 65°C. Efekt ten dodatkowo spotęgowało dodanie do roztworu takich składników jak EDTA, kwas nadoctowy, kwas polifosforowy, podchloryn sodu, chlorek heksadecylpirydyniowy, paraben propylu oraz kwas hydrocynamonowy. W przypadku innych badanych Gram-ujemnych bakterii skuteczne zahamowanie zaobserwowano po zastosowaniu enterocyny AS-48 (25 µg/ml) w połączeniu z kwasem polifosforowym (0,1 do 2%). Synergistyczne działanie tych związków znacząco ograniczyło lub całkowicie zahamowało rozwój *E. coli* O157:H7, *Enterobacter aerogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila*, *Shigella* spp. i *Pseudomonas fluorescens* w kiełkach soi przechowywanych w temperaturach 6°C i 15°C. Otrzymane wyniki wyka-

zują, że możliwe jest opracowanie metod konserwacji żywności opartych na kombinacji enterocyny AS-48 z innymi czynnikami, które skutecznie mogłyby obniżyć ryzyko zepsucia i zakażenia patogennymi bakteriami Gram-ujemnych surowców roślinnych [20].

Inną, dużą grupą surowców roślinnych badanych pod kątem zastosowania enterocyny AS-48 były zboża oraz półprodukty i produkty, będące wynikiem ich przetworzenia. Zepsucie chleba, które objawia się ciągliwym i upłynnionym miękkim oraz nieprzyjemnym smakiem i zapachem, najczęściej powodowane jest przez bakterie z rodzaju *Bacillus*, szczególnie *B. subtilis* i *B. licheniformis*, w mniejszym stopniu gatunki *B. pumilus* i *B. cereus*. Uważa się, że zepsucie chleba powodowane wspomnianymi mikroorganizmami może być skutkiem rozwoju bakterii już na etapie przygotowania ciasta. W związku z tym przeprowadzono analizę sprawdzającą skuteczność działania antagonistycznego AS-48 (4–7 µg/ml) w stosunku do bakterii z rodzaju *Bacillus* w cieście z mąki pszennej. Wyniki wskazują, że enterocyna nie tylko inaktywuje analizowane gatunki, ale efekty jej działania spotęgowane były w próbach ciasta przechowywanych w 22°C, w porównaniu do inkubacji w 10°C. Otrzymane wyniki są korzystne z punktu widzenia przemysłu piekarskiego, ze względu na wysokie temperatury, w których powinno garować ciasto do wypieku chleba [60]. *B. cereus* jak wspomniano wcześniej, izolowany jest z różnego rodzaju produktów spożywczych, często surowców roślinnych. Znaczącą eliminację obecności tych bakterii przy użyciu AS-48 (20–35 µg/ml) udało się osiągnąć w ryżu gotowanym i kleiku ryżowym. Co więcej, podczas inkubacji w temperaturze 37°C obserwowano zahamowanie syntezy enterotoksyny, a dzięki procesowi krótkotrwałego podgrzewania (gotowany ryż – 90°C/1 min, kleik ryżowy – 95°C/1 min) inaktywację przetrwalników [41]. Kolejnym badaniem, wynikającym z obecnych trendów konsumenckich, było badanie odpowiedzi komórek *S. aureus* na AS-48 w napojach owsianych i sojowych. Podobnie jak w poprzednich analizach, dodatek samej bakteriocyny AS-48 nie przyniósł zadawalających rezultatów w przeciwieństwie do efektów synergistycznego działania bakteriocyny i związków fenolowych lub 2-nitropropanolu [35].

Konieczność kontroli mikroflory produktów roślinnych nie ogranicza się do surowych owoców i warzyw, ale dotyczy także wyrobów będących wynikiem ich przetworzenia, takich jak soki, napoje, sosy, czy konserwy. Oznaczenie z wykorzystaniem świeżego soku jabłkowego wykazało synergistyczne działanie dodatku AS-48, techniki HIPEF oraz temperatury 40°C prowadzące do skutecznego ograniczenia rozwoju *S. enterica* [61]. Analiza wpływu kombinacji HIPEF oraz AS-48 w stosunku do *Pediococcus parvulus* (drobnoustroju wytwarzającego egzopolisacharydy, odpowiedzialnego

za zepsucie cydrów) potwierdziła oczekiwaną korelację między redukcją liczby komórek bakterii, a synergistycznym działaniem bakteriocynty i techniki HIPEF, które stosowane osobno, nie miały znaczącego wpływu na aktywność drobnoustrojów [62]. Badania pod kątem wykorzystania AS-48 w sokach, skierowane były również przeciwko *Alicyclobacillus acidoterrestis*. Jest to gatunek, którego endospory zdolne są do przetrwania w niskim pH oraz wysokich temperaturach, stosowanych podczas rozlewania soków na gorąco. Do oznaczenia wybrano świeży sok jabłkowy i pomarańczowy oraz komercyjne soki: pomarańczowy, jabłkowy, ananasowy, brzoskwiński i grejpfrutowy. Dodatek AS-48 do świeżych soków, inkubowanych w 37°C, skutkował ograniczeniem wzrostu *A. acidoterrestis* do 14 dni. Natomiast bakteriocynty w komercyjnych sokach (pomarańczowym i ananasowym), inkubowanych w temperaturach 37, 15 i 4°C, warunkowała bezpieczeństwo nawet do 90 dni. Odmienne wyniki otrzymano w przypadku soku jabłkowego, brzoskwińskiego i grejpfrutowego inkubowanych w 37°C, w których rozwój *A. acidoterrestis* ograniczony był jedynie do 60 dni. Zaobserwowano również inaktywację przetrwalników, nawet po 1 minucie ekspozycji na AS-48. Obserwacje pod mikroskopem elektronowym wykazały znaczne uszkodzenia i lizę komórek wegetatywnych oraz dezorganizację w strukturach endospor [39]. W kolejnym badaniu potwierdzono aktywność antymikrobiologiczną AS-48 w stosunku do *Bacillus licheniformis* (gatunek wytwarzający egzopolisacharydy, często odpowiedzialny za zepsucie cydru). Wykazano nie tylko inhibicję rozwoju *B. licheniformis*, ale również wzmożoną wrażliwość przetrwalników badanego gatunku na ciepło [40].

Analizy wpływu enterocynty na mikroorganizmy rozwijające się w napojach nie ominęły również spożywanych obecnie na dużą skalę napojów energetycznych i płynów dedykowanych do spożycia wśród sportowców. Napoje tego typu ze względu na niskie pH mogą powodować problemy stomatologiczne, dlatego dąży się do uzyskania w nich wyższego pH, a co za tym idzie pojawia się większe ryzyko rozwoju bakterii. W napojach o pH podwyższonym do 5,0 wykazano aktywność antagonistyczną AS-48 w stosunku do takich mikroorganizmów jak: *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. licheniformis* i *B. cereus* [57].

Badaniami możliwości zastosowania AS-48 do zapewnienia bezpieczeństwa mikrobiologicznego objęto również produkty konserwowe. Mikroorganizmem, którego odpowiedź na AS-48 analizowano był *Bacillus coagulans*, a badanymi produktami pasta pomidorowa, sok z ananasów i syrop z brzoskwiń. *B. coagulans* to termotolerancyjna bakteria, często obecna w produktach zakwaszanych, odpowiedzialna za tzw. zepsucie „płasko-kwaśne”, prowadzące do obniżenia pH produktu na skutek wytwarzania kwasów, głównie mlekowego

z węglowodanów, bez wydzielania gazów. Obecność AS-48 powodowała znaczący spadek liczby komórek wegetatywnych *B. coagulans*, efekt ten wzmacniał dodatek cukru (w badaniu glukoza i sacharoza). Co więcej, bakteriocynty AS-48 potęgowała efekt letalny w stosunku do endospor *B. coagulans*, osiągany przez użycie wysokiej temperatury [53]. Działanie AS-48 w odniesieniu do innego mikroorganizmu – *Geobacillus stearothermophilus*, sprawdzano w produktach takich jak: puszkowana kukurydza i groszek oraz cieszącym się dużym zainteresowaniem konsumentów mleku kokosowym. *G. stearothermophilus* to niepatogeny, niezwykle odporny na wysoką temperaturę gatunek, odpowiedzialny za zepsucie „płasko-kwaśne” produktów, szczególnie długo przechowywanych w wysokich temperaturach (np. automaty z jedzeniem lub żywność wykorzystywana podczas misji wojskowych w rejonach tropikalnych). Również w tym przypadku dodatek AS-48 skutkował szybką redukcją wzrostu wspomnianej bakterii [59].

Współcześni konsumenci coraz chętniej sięgają po gotowe produkty, w związku z tym przeprowadzono również analizy wpływu dodatku AS-48 do gotowych zup, purée i sosów warzywnych. Badane bakterie (*B. cereus*, *B. macroides*, *Paenibacillus polymyxa* i *P. amylolyticus*) wykazywały pewną oporność na działanie AS-48, w szczególności rodzaj *Paenibacillus*. Dopiero zastosowanie AS-48 wraz ze związkami fenolowymi (karwakrol, eugenol, geraniol i kwas hydrocynamonowy) skutkowało znacznie zwiększoną aktywnością bakteriobójczą [37]. Podobną zależność obserwowano w pokrewnym badaniu wpływu AS-48 na *S. aureus* w gotowych sosach (m.in. dostępne w komercyjnej sprzedaży sos neapolitański, carbonara oraz pesto). W tym przypadku *S. aureus* wykazywał najwyższą oporność w sosie carbonara, którą podobnie jak w wyżej opisanym badaniu, skutecznie obniżono stosując związki fenolowe [38].

Analizowano również aktywność antymikrobiologiczną bakteriocynty AS-48 w deserach. Dodatek AS-48 do bitej śmietany, deserów na bazie jogurtu sojowego czy puddingu żelatynowego, powodował inhibicję rozwoju *L. monocytogenes*, *S. aureus* i *B. cereus*, a stopień ograniczenia wzrostu wspomnianych mikroorganizmów zależał od zastosowanego stężenia AS-48. Ponadto wykazano, że dodatek bakteriocynty zapobiegał upłynnianiu deserów z dodatkiem żelatyny, wskutek zahamowania aktywności proteolitycznej *B. cereus* [58]. Przeprowadzono również analizy działania antagonistycznego AS-48 w takich produktach jak: płynny karmel, konfitura dyniowa, krem migdałowy, masło orzechowe, krem i syrop czekoladowy oraz syrop waniliowy. Antibakteryjna aktywność AS-48 w stosunku do *S. aureus* znacząco zależała od analizowanego produktu – od pełnej inaktywacji w płynnym karmelu, do nieznacznej inhibicji w wanili czy czekoladzie. Stopień

inhibicji skutecznie wzmacniało zastosowanie eugenolu, 2-nitropropanolu i nizyny wraz z AS-48 [56].

W związku z tym, że enterocyna AS-48 jest najlepiej poznaną bakteriocyną o budowie cyklicznej poświęca jej się szczególnie dużo uwagi, jednak podejmowane są próby mające na celu sprawdzenie możliwości zastosowania również pozostałych bakteriocyn cyklicznych w przemyśle spożywczym, jako naturalnych konserwantów. Warto zwrócić uwagę na karnocyklinę A (CclA) wywarzaną przez *C. maltaromaticum* – gatunek, który w USA i w Kanadzie jest dopuszczony przez USDA (United States Department of Agriculture) i FDA (Food and Drug Administration) do użytku jako konserwant produktów mięsnych. Atywność antagonizująca CclA w stosunku do *L. monocytogenes* wydaje się niezaprzeczalna, zwłaszcza że przeprowadzane już zostały badania analizujące mechanizm tego działania wraz z komórkową odpowiedzią *L. monocytogenes* na obecność bakteriocyny [52]. Jak nadmieniono wcześniej, zewnętrzna błona bakterii Gram-ujemnych stanowi barierę dla bakteriocyn o budowie cyklicznej, chociaż niektóre bakteriocyny stanowią wyjątek od tej reguły. W związku z tym przeprowadzono badanie z wykorzystaniem CclA w kierunku inaktywacji wybranych bakterii Gram-ujemnych: *E. coli* DH5α, *Pseudomonas aeruginosa* i *Salmonella Typhimurium*. Podobnie jak w przypadku aktywności AS-48 w stosunku do bakterii Gram-ujemnych, do osiągnięcia działania przeciwdrobnoustrojowego CclA niezbędne było zastosowanie dodatkowych czynników, takich jak EDTA. Taka kombinacja pozwoliła na znaczącą inhibicję rozwoju bakterii *E. coli* i *P. aeruginosa* [66].

Kolejną bakteriocyną, którą badano pod kątem potencjalnego stosowania w żywności jest gazerycyna A (GaaA). W oznaczeniu wykorzystano koncentrat zawierający GaaA, uzyskany po hodowli kultury *Lb. gasseri* w medium z serwatki serowej. Aktywność GaaA analizowano w stosunku do wybranych drobnoustrojów: *B. cereus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Achromobacter denitrificans* i *P. fluorescens*. W przypadku użycia wyłącznie bakteriocyny stwierdzono wzrost badanych gatunków. Natomiast całkowitą inhibicję wzrostu analizowanych drobnoustrojów zaobserwowano po użyciu GaaA z dodatkiem glicyny [10, 71].

Bakteriocyny o budowie cyklicznej stanowią obiekt badań przede wszystkim pod kątem ich wykorzystania jako naturalnych konserwantów żywności. Zarówno przechowywanie surowców, jak i duża ilość procesów technologicznych wymaga często stosowania ekstremalnych warunków, dlatego bakteriocyny cykliczne, ze względu na swoje właściwości, wydają się być dużo skuteczniejsze w potencjalnym zabezpieczeniu żywności przed patogenami niż bakteriocyny o strukturze liniowej. Jednak stabilność bakteriocyn o budowie cyklicznej i ich szerokie spektrum działania jest powodem, dla

którego poszukuje się innych sposobów wykorzystania tej grupy związków. Potencjalnie mogą znaleźć zastosowanie m.in. w weterynarii, np. w leczeniu mastitis (zapalenia wymienia) u krów mlecznych [23]. Ponadto należy rozważyć również wykorzystanie tych związków w medycynie, np. jako terapeutyków czy nośników substancji czynnych [65]. Dowiedzono także, że enterocyna AS-48 wywołuje efekt letalny w stosunku do pierwotniaków *Leishmania*, zarówno w postaci promastygotów, jak i amastygotów [1]. Sugeruje się ponadto, że w związku z prawdopodobnie unikalnym mechanizmem biosyntezy, który nie jest jeszcze całkowicie poznany, bakteriocyny o budowie cyklicznej mogłyby być używane w bioinżynierii, do projektowania nowych peptydów [88].

Ze względu na wyjątkowe właściwości, które są poniekąd rozszerzeniem właściwości bakteriocyn o strukturze liniowej, bakteriocyny cykliczne mogą znaleźć zastosowanie także jako dodatki do kosmetyków lub substytutu antybiotyków.

8. Podsumowanie

Bakteriocyny cykliczne to niewielki zbiór peptydów charakteryzujących się nie tylko cyklizacją struktury, ale i wyjątkowymi właściwościami – odpornością na działanie wielu enzymów proteolitycznych, wysokich temperatur, a także zmiany pH. Bakteriocyny cykliczne wytwarzane są przez bakterie Gram-dodatnie i ich aktywność antymikrobiologiczna w głównej mierze skierowana jest przeciwko bakteriom Gram-dodatnim. Jednak po zastosowaniu wysokich stężeń lub dodatkowych czynników, takich jak np. EDTA, niektóre bakteriocyny mogą również hamować wzrost bakterii Gram-ujemnych, np. *E. coli*. Bakteriocyny o budowie cyklicznej stanowią potencjalnie obiecującą alternatywę dla powszechnie stosowanych metod i środków zabezpieczania żywności przed mikrobiologicznym zepsuciem. Istnieje duże zapotrzebowanie rynku na tego typu związki jako naturalne konserwanty lub produkujące je bakterie jako kultury starterowe i probiotyki. Badania z wykorzystaniem enterocyny AS-48 są dowodem na to, że bakteriocyny cykliczne mogłyby znaleźć zastosowanie w rozmaitych gałęziach przemysłu spożywczego. Skuteczną inaktywację wielu gatunków mikroorganizmów, zarówno bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych, w tym bakterii powodujących zepsucie żywności oraz patogennych, uzyskano w analizach dotyczących wpływu enterocyny AS-48 jako dodatku do różnych surowców i produktów spożywczych. Badania nad zastosowaniem bakteriocyn w żywności ukazują również perspektywy ich użycia w innych celach, m.in. do ograniczenia powstawania niebezpiecznych amin biogennych czy w zapobieganiu procesowi upłynniania się produktów żelatynowych.

Mimo obiecujących wyników potwierdzających działanie bakteriocyn cyklicznych w stosunku do szeregu gatunków bakterii rozwijających się w żywności, w tym gatunków patogennych, należy podkreślić potrzebę dalszych badań tych związków. Stan wiedzy na temat bakteriocyn o budowie cyklicznej, jest wciąż niewystarczający, szczególnie biorąc pod uwagę tak istotne zagadnienia, jak pełne wyjaśnienie mechanizmów biosyntezy tych związków, rozpoznawania komórek docelowych i sposobów działania. Innym zagadnieniem, zgłębnym w bardzo niewielkim stopniu, jest nabywanie oporności na działanie bakteriocyn przez mikroorganizmy docelowe. Być może, dopiero poznanie tych mechanizmów pozwoli na opracowanie racjonalnych metod stosowania bakteriocyn o budowie cyklicznej w przemyśle spożywczym, a niewykluczone, że w przyszłości również w medycynie.

9. Piśmiennictwo

1. Abengózar M.A., Cebrián R., Saugar J.M., Gárate T., Valdivia E., Martínez-Bueno M., Maqueda M., Rivas L.: Enterocin AS-48 as evidence for the use of bacteriocins as new leishmanicidal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, e02288–16 (2017)
2. Abriouel H., Lucas R., Ben Omar N., Valdivia E., Gálvez A.: Potential applications of the cyclic peptide enterocin AS-48 in the preservation of vegetable foods and beverages. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, **2**, 77–89 (2010)
3. Acedo J.Z., van Belkum M.J., Lohans C.T., McKay R.T., Miskolzie M., Vederas J.C.: Solution structure of acidocin B, a circular bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 2910–2918 (2015)
4. Ananou S., Baños A., Maqueda M., Martínez-Bueno M., Gálvez A., Valdivia E.: Effect of combined physico-chemical treatments based on enterocin AS-48 on the control of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in a model cooked ham. *Food Control*, **21**, 478–486 (2010)
5. Ananou S., Garriga M., Hugas M., Maqueda M., Martínez-Bueno M., Gálvez A., Valdivia E.: Control of *Listeria monocytogenes* in model sausages by enterocin AS-48. *Int. J. Food Microbiol.* **103**, 179–190 (2005)
6. Ananou S., Garriga M., Jofré A., Aymerich T., Gálvez A., Maqueda M., Martínez-Bueno M., Valdivia E.: Combined effect of enterocin AS-48 and high hydrostatic pressure to control food-borne pathogens inoculated in low acid fermented sausages. *Meat Sci.* **84**, 594–600 (2010)
7. Ananou S., Maqueda M., Martínez-Bueno M., Gálvez A., Valdivia E.: Control of *Staphylococcus aureus* in sausages by enterocin AS-48. *Meat Sci.* **71**, 549–556 (2005)
8. Ananou S., Muñoz A., Martínez-Bueno M., González-Tello P., Gálvez A., Maqueda M., Valdivia E.: Evaluation of an enterocin AS-48 enriched bioactive powder obtained by spray drying. *Food Microbiol.* **27**, 58–63 (2010)
9. Ananou S., Zentar H., Martínez-Bueno M., Gálvez A., Maqueda M., Valdivia E.: The impact of enterocin AS-48 on the shelf-life and safety of sardines (*Sardinia pilchardus*) under different storage conditions. *Food Microbiol.* **44**, 185–195 (2014)
10. Arakawa K., Kawai Y., Iio H., Tanioka M., Nishimura J., Kitazawa H., Tsurumi K., Saito T.: Effects of gasserins A and T, bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri*, with glycine on custard cream preservation. *J. Dairy Sci.* **92**, 2365–2372 (2009)
11. Arakawa K., Kawai Y., Ito Y., Nakamura K., Chujo T., Nishimura J., Kitazawa H., Saito T.: HPLC purification and re-evaluation of chemical identity of two circular bacteriocins, gasserin A and reuterin 6. *Lett. Appl. Microbiol.* **50**, 406–411 (2010)
12. Baños A., Ananou S., Martínez-Bueno M., Gálvez A., Maqueda M., Valdivia E.: Prevention of spoilage by enterocin AS-48 combined with chemical preservatives, under vacuum, or modified atmosphere in a cooked ham model. *Food Control*, **24**, 15–22 (2012)
13. Baños A., García-López J.D., Núñez C., Martínez-Bueno M., Maqueda M., Valdivia E.: Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in fish by enterocin AS-48 and *Listeria* lytic bacteriophage P100. *LWT – Food Sci. Technol.* **66**, 672–677 (2016)
14. Bednarczyk A., Daczowska-Kozon E.G.: Czynniki patogenności bakterii z grupy *Bacillus cereus*. *Post. Mikrobiol.* **47**, 51–63 (2008)
15. Błaszczuk U., Moczarny J.: Bakteriocyny bakterii Gram-ujemnych – struktura, mechanizm działania i zastosowanie. *Post. Mikrobiol.* **55**, 157–171 (2016)
16. Bogaardt C., van Tonder A.J., Brueggemann A.B.: Genomic analyses of pneumococci reveal a wide diversity of bacteriocins – including pneumocyclin, a novel circular bacteriocin. *BMC Genomics*, **16**, 544, 1–16 (2015)
17. Borrero J., Brede D.A., Skaugen M., Diep D.B., Herranz C., Nes I.F., Cintas L.M., Hernandez P.E.: Characterization of garvicin ML, a novel circular bacteriocin produced by *Lactococcus garvieae* DCC43, isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 369–373 (2011)
18. Cebrián R., Maqueda M., Neira J. L., Valdivia E., Martínez-Bueno M., Montalbán-López M.: Insights into the functionality of the putative residues involved in enterocin AS-48 maturation. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 7268–7276 (2010)
19. Cobo Molinos A., Abriouel H., Ben Omar N., Valdivia E., López R.L., Maqueda M., Martínez Cañamero M., Gálvez A.: Effect of immersion solutions containing enterocin AS-48 on *Listeria monocytogenes* in vegetable foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 7781–7787 (2005)
20. Cobo Molinos A., Abriouel H., López R.L., Valdivia E., Omar N.B., Gálvez A.: Combined physico-chemical treatment based on enterocin AS-48 for inactivation of Gram-negative bacteria in soybean sprouts. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 2912–2921 (2008)
21. Cobo Molinos A., Abriouel H., Lucas López R., Ben Omar N., Valdivia E., Gálvez A.: Inhibition of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* in raw vegetables by application of washing solutions containing enterocin AS-48 alone and in combination with other antimicrobials. *Food Microbiol.* **25**, 762–770 (2008)
22. Cotter P.D., Hill C., Ross R.P.: Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 777–788 (2005)
23. Davidse E.K., Balla E., Holzapfel W.H., Muller C.J.C., Cloete S.W.P., Dicks L.M.T.: Peptide AS-48 (*Enterococcus faecalis*) for prevention and treatment of mastitis in dairy cows. *Online J. Vet. Res.* **8**, 22–32 (2004)
24. Diaz M., Valdivia E., Martínez-Bueno M., Fernández M., Soler-González A.S., Ramírez-Rodrigo H., Maqueda M.: Characterization of a new operon, as-48EFGH, from the as-48 gene cluster involved in immunity to enterocin AS-48. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1229–1236 (2003)
25. Fernández M., Sánchez-Hidalgo M., García-Quintás N., Martínez-Bueno M., Valdivia E., López P., Maqueda M.: Processing of as-48ABC RNA in AS-48 enterocin production by *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **190**, 240–250 (2008)
26. Gabrielsen C., Brede D.A., Nes I.F., Diep D.B.: Circular bacteriocins: biosynthesis and mode of action. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 6854–6862 (2014)

27. Gabrielsen C., Brede D.A., Salehian Z., Nes I.F., Diep D.B.: Functional genetic analysis of the GarMl gene cluster in *Lactococcus garvieae* DCC43 gives new insights into circular bacteriocin biosynthesis. *J. Biotechnol.* **196**, 911–919 (2014)
28. Gálvez A., Maqueda M., Martínez-Bueno M., Valdivia E.: Permeation of bacterial cells, permeation of cytoplasmic and artificial membrane vesicles, and channel formation on lipid bilayers by peptide antibiotic AS-48. *J. Bacteriol.* **173**, 886–892 (1991)
29. Gálvez A., Maqueda M., Valdivia E., Quesada A., Montoya E.: Characterization and partial purification of a broad spectrum antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus faecalis*. *Can. J. Microbiol.* **32**, 765–771 (1986)
30. Gálvez A., Valdivia E., Martínez M., Maqueda M.: Bactericidal action of peptide antibiotic AS-48 against *Escherichia coli* K-12. *Can. J. Microbiol.* **35**, 318–321 (1989)
31. Gálvez A., Valdivia E., Martínez M., Maqueda M.: Effect of peptide AS-48 on *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* S-47. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 641–645 (1989)
32. Gong X., Martin-Visscher L.A., Nahirney D., Vederas J.C., Duszynski M.: The circular bacteriocin, carnocyclin A, forms anion-selective channels in lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, **1788**, 1797–1803 (2009)
33. González C., Langdon G.M., Bruix M., Gálvez A., Valdivia E., Maqueda M., Rico M.: Bacteriocin AS-48, a microbial cyclic polypeptide structurally and functionally related to mammalian NK-lysin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 11221–11226 (2000)
34. Grande Burgos M.J., Kovács A.T., Mironczuk A.M., Abriouel H., Gálvez A., Kuipers O.P.: Response of *Bacillus cereus* ATCC 14579 to challenges with sublethal concentrations of enterocin AS-48. *BMC Microbiol.* **9**, 227–234 (2009)
35. Grande Burgos M.J., López Aguayo M.C., Pérez Pulido R., Gálvez A., Lucas López R.: Inactivation of *Staphylococcus aureus* in oat and soya drinks by enterocin AS-48 in combination with other antimicrobials. *J. Food Sci.* **80**, 2030–2034 (2015)
36. Grande Burgos M.J., Pérez Pulido R., López Aguayo M.C., Gálvez A., Lucas R.: The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: isolation, mode of action, and possible food applications. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 22706–22727 (2014)
37. Grande M.J., Abriouel H., Lucas López R., Valdivia E., Ben Omar N., Martínez-Bueno M., Martínez-Cañamero M., Gálvez A.: Efficacy of enterocin AS-48 against bacilli in ready-to-eat vegetable soups and purees. *J. Food Prot.* **70**, 2339–2345 (2007)
38. Grande M.J., López R.L., Abriouel H., Valdivia E., Ben Omar N., Maqueda M., Martínez-Cañamero M., Gálvez A.: Treatment of vegetable sauces with enterocin AS-48 alone or in combination with phenolic compounds to inhibit proliferation of *Staphylococcus aureus*. *J. Food Prot.* **70**, 405–411 (2007)
39. Grande M.J., Lucas R., Abriouel H., Omar N.B., Maqueda M., Martínez-Bueno M., Martínez-Cañamero M., Valdivia E., Gálvez A.: Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. *Int. J. Food Microbiol.* **104**, 289–297 (2005)
40. Grande M.J., Lucas R., Abriouel H., Valdivia E., Ben Omar N., Maqueda M., Martínez-Cañamero M., Gálvez A.: Inhibition of *Bacillus licheniformis* LMG 19409 from ropy cider by enterocin AS-48. *J. Appl. Microbiol.* **101**, 422–428 (2006)
41. Grande M.J., Lucas R., Abriouel H., Valdivia E., Omar N.B., Maqueda M., Martínez-Bueno M., Martínez-Cañamero M., Gálvez A.: Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocin AS-48. *Int. J. Food Microbiol.* **106**, 185–194 (2006)
42. Güllüce M., Karadayi M., Bariş Ö.: Bacteriocins: promising natural antimicrobials (w) Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education, red. A. Mendes-Vilas, Formatex Research Center, Badajoz, 2013, s. 1016–1027
43. Himeno K., Fujita K., Zendo T., Wilaipun P., Ishibashi N., Masuda Y., Yoneyama F., Leelawatcharamas V., Nakayama J., Sonomoto K.: Identification of enterocin NKR-5-3C, a novel class IIa bacteriocin produced by a multiple bacteriocin producer, *Enterococcus faecium* NKR-5-3. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**, 1245–1247 (2012)
44. Himeno K., Rosengren K.J., Inoue T., Perez R.H., Colgrave M.L., Lee H.S., Chan L.Y., Henriques S.T., Fujita K., Ishibashi N., Zendo T., Wilaipun P., Nakayama J., Leelawatcharamas V., Jikuya H., Craik D. J., Sonomoto K.: Identification, characterization, and three-dimensional structure of the novel circular bacteriocin, enterocin NKR-5-3B, from *Enterococcus faecium*. *Biochemistry*, **54**, 4863–4876 (2015)
45. Jurkowski M., Błaszczak M.: Charakterystyka fizjologiczno-biochemiczna bakterii fermentacji mlekowej. *KOSMOS Problemy Nauk Biologicznych*, **3**, 493–504 (2012)
46. Kalmokoff M.L., Cyr T.D., Hefford M.A., Whitford M.F., Teather R.M.: Butyrivibriocin AR10, a new cyclic bacteriocin produced by the ruminal anaerobe *Butyrivibrio fibrisolvens* AR10: characterization of the gene and peptide. *Can. J. Microbiol.* **49**, 763–773 (2003)
47. Kemperman R., Kuipers A., Karsens H., Nauta A., Kuipers O., Kok J.: Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1589–1597 (2003)
48. Kawai Y., Ishii Y., Uemura K., Kitazawa H., Saito T., Itoh T.: *Lactobacillus reuteri* LA6 and *Lactobacillus gasseri* LA39 isolated from faeces of the same human infant produce identical cyclic bacteriocin. *Food Microbiol.* **18**, 407–415 (2001)
49. Kawai Y., Kemperman R., Kok J., Saito T.: The circular bacteriocins gasserin A and circularin A. *Curr. Protein Pept. Sci.* **5**, 393–398 (2004)
50. Kawai Y., Saito T., Kitazawa H., Itoh T.: Gasserin A; an uncommon cyclic bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA39 linked at N- and C-terminal ends. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 2438–2440 (1998)
51. Kawulka K., Sprules T., McKay R.T., Mercier P., Diaper C.M., Zuber P., Vederas J.C.: Structure of subtilisin A, an antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual posttranslational modifications linking cysteine sulfurs to alpha-carbons of phenylalanine and threonine. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 4726–4727 (2003)
52. Liu X., Basu U., Miller P., McMullen L.M.: Stress response and adaptation of *Listeria monocytogenes* 08-5923 exposed to a sublethal dose of carnocyclin A. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 3835–3841 (2014)
53. Lucas R., Grande M.J., Abriouel H., Maqueda M., Ben Omar N., Valdivia E., Martínez-Cañamero M., Gálvez A.: Application of the broad-spectrum bacteriocin enterocin AS-48 to inhibit *Bacillus coagulans* in canned fruit and vegetable foods. *Food Chem. Toxicol.* **44**, 1774–1781 (2006)
54. Maqueda M., Sánchez-Hidalgo M., Fernández M., Montalbán-López M., Martínez-Bueno E.V., Martínez-Bueno M.: Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 2–22 (2008)
55. Martínez-Bueno M., Valdivia E., Gálvez A., Coyette J., Maqueda M.: Analysis of the gene cluster involved in production and immunity of the peptide antibiotic AS-48 in *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.* **27**, 347–358 (1998)
56. Martínez Viedma P., Abriouel H., Ben Omar N., Lucas López R., Gálvez A.: Antistaphylococcal effect of enterocin AS-48 in bakery ingredients of vegetable origin, alone and in combination with selected antimicrobials. *J. Food Sci.* **74**, 384–389 (2009)
57. Martínez Viedma P., Abriouel H., Ben Omar N., Lucas López R., Valdivia E., Gálvez A.: Antibacterial protection by enterocin

- AS-48 in sport and energy drinks with less acidic pH values. *J. Food Prot.* **71**, 881–884 (2009)
58. Martínez Viedma P., Abriouel H., Ben Omar N., Lucas López R., Valdivia E., Gálvez A.: Assay of enterocin AS-48 for inhibition of foodborne pathogens in desserts. *J. Food Prot.* **72**, 165–1659 (2009)
 59. Martínez Viedma P., Abriouel H., Ben Omar N., Lucas López R., Valdivia E., Gálvez A.: Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* in canned food and coconut milk samples by addition of enterocin AS-48. *Food Microbiol.* **26**, 289–293 (2009)
 60. Martínez Viedma P., Abriouel H., Ben Omar N., López Lucas R., Gálvez A.: Inhibition of spoilage and toxigenic *Bacillus* species in dough from wheat flour by the cyclic peptide enterocin AS-48. *Food Control*, **22**, 756–761 (2011)
 61. Martínez Viedma P., Sobrino López A., Ben Omar N., Abriouel H., Lucas López R., Martín Belloso O., Gálvez A.: Enhanced bactericidal effect of enterocin AS-48 in combination with high-intensity pulsed-electric field treatment against *Salmonella enterica* in apple juice. *Int. J. Food Microbiol.* **128**, 244–249 (2008)
 62. Martínez Viedma P., Sobrino López A., Ben Omar N., Abriouel H., Lucas López R., Martín Belloso O., Gálvez A.: Increased inactivation of exopolysaccharide-producing *Pediococcus parvulus* in apple juice by combined treatment with enterocin AS-48 and high-intensity pulsed electric field. *J. Food Prot.* **73**, 39–43 (2010)
 63. Martin-Visscher L.A., Gong X., Duszyk M., Vederas C.: The three-dimensional structure of carnocyclin A reveals that many circular bacteriocins share a common structural motif. *J. Biol. Chem.* **284**, 28674–28681 (2009)
 64. Martin-Visscher L.A., van Belkum M.J., Garneau-Tsodikova S., Whittall R.M., Zheng J., McMullen L.M., Vederas J.C.: Isolation and characterization of carnocyclin A, a novel circular bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 4756–4763 (2008)
 65. Martin-Visscher L.A., van Belkum M.J., Vederas J.C.: Class Iic or circular bacteriocins (w): Prokaryotic Antimicrobial Peptides. From genes to application, red. Drider D. Rebuffat S., Springer, Nowy York, Dordrecht, Heidelberg, Londyn, 2011, s. 232
 66. Martin-Visscher L.A., Yoganathan S., Sit C.S., Lohans C.T., Vederas J.C.: The activity of bacteriocins from *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307 against Gram-negative bacteria in combination with EDTA treatment. *FEMS Microbiol. Lett.* **317**, 152–159 (2011)
 67. Masuda Y., Ono H., Kitagawa H., Ito H., Mu F., Sawa N., Zendo T., Sonomoto K.: Identification and characterization of leucocyclin Q, a novel cyclic bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* TK41401. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 8164–8170 (2011)
 68. Montalbán-López M., Spolaore B., Pinato O., Martínez-Bueno M., Valdivia E., Maqueda M., Fontana A.: Characterization of linear forms of the circular enterocin AS-48 obtained by limited proteolysis. *FEBS Lett.* **582**, 3237–3242 (2008)
 69. Molinos A.C., Abriouel H., Ben Omar N., Lucas R., Valdivia E., Gálvez A.: Inactivation of *Listeria monocytogenes* in raw fruits by enterocin AS-48. *J. Food Prot.* **71**, 2460–2467 (2008)
 70. Muñoz A., Maqueda M., Gálvez A., Martínez-Bueno M., Rodríguez A., Valdivia E.: Enterotoxigenic *Bacillus cereus* in a nonfat hard cheese by an Enterococcal strain-producing enterocin AS-48. *J. Food Prot.* **7**, 1517–1521 (2004)
 71. Nakamura K., Arakawa K., Kawai Y., Yasuta N., Chujo T., Watanabe M., Iioka H., Tanioka M., Nishimura J., Kitazawa H., Tsurumi K., Saito T.: Food preservative potential of gassericin A – containing concentrate prepared from cheese whey culture supernatant of *Lactobacillus gasseri* LA39. *Anim. Sci. J.* **84**, 144–149 (2013)
 72. Nes I.F., Diep D.B., Holo H.: Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.* **189**, 1189–1198 (2007)
 73. Perez R.H., Ishibashi N., Inoue T., Himeno K., Masuda Y., Sawa N., Zendo T., Wilaipun P., Leelawatcharamas V., Nakayama J., Sonomoto K.: Functional analysis of genes involved in the biosynthesis of enterocin NKR-5-3B, a novel circular bacteriocin. *J. Bacteriol.* **198**, 291–300 (2016)
 74. Perez R.H., Sugino H., Ishibashi N., Zendo T., Wilaipun P., Leelawatcharamas V., Nakayama J., Sonomoto K.: Mutations near the cleavage site of enterocin NKR-5-3B prepeptide reveal new insights into its biosynthesis. *Microbiology*, **163**, 431–441 (2017)
 75. Pandey N., Malik R.K., Kaushik J.K., Singroha G.: Gassericin A: a circular bacteriocin produced by lactic acid bacteria *Lactobacillus gasseri*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 1977–1987 (2013)
 76. Potter A., Ceotto H., Coelho M.L., Guimarães A.J., Bastos M.: The gene cluster of aureocyclin 4185: the first cyclic bacteriocin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, **160**, 917–928 (2014)
 77. Rose A.S., Bradley A.R., Valasatava Y., Duarte J.M., Prlić A., Rose P.W.: Web-based molecular graphics for large complexes. ACM Proceedings of the 21st International Conference on Web3D Technology (Web3D'16), 185–186 (2016)
 78. Rose A.S., Hildebrand P.W.: NGL Viewer: a web application for molecular visualization. *Nucl. Acids. Res.* **43**, W576–W579 (2015)
 79. Samyn B., Martinez-Bueno M., Devreese B., Maqueda M., Gálvez A., Valdivia E., Coyette J., Van Beeumen J.: The cyclic structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *FEBS Lett.* **352**, 87–90 (1994)
 80. Sánchez-Barrena M.J., Martínez-Ripoll M., Gálvez A., Valdivia E., Maqueda M., Cruz V., Albert A.: Structure of bacteriocin AS-48: from soluble state to membrane bound state. *J. Mol. Biol.* **334**, 541–549 (2003)
 81. Sawa N., Zendo T., Kiyofuji J., Fujita K., Himeno K., Nakayama J., Sonomoto K.: Identification and characterization of lactocyclin Q, a novel cyclic bacteriocin produced by *Lactococcus* sp. strain QU 12. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 1552–1558 (2009)
 82. Scholz R., Vater J., Budiharjo A., Wang Z., He Y., Dietel K., Schwecke T., Herfort S., Lasch P., Borris R.: Amylocyclin, a novel circular bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J. Bacteriol.* **196**, 1842–1852 (2014)
 83. Sobrino-Lopez A., Viedma-Martínez P., Abriouel H., Valdivia E., Gálvez A., Martín-Belloso O.: The effect of adding antimicrobial peptides to milk inoculated with *Staphylococcus aureus* and processed by high-intensity pulsed-electric field. *J. Dairy Sci.* **92**, 2514–2523 (2009)
 84. Towle K.M., Vederas J.C.: Structural features of many circular and leaderless bacteriocins are similar to those in saposins and saposin-like peptides. *Med. Chem. Commun.* **8**, 276–285 (2017)
 85. van Belkum M.J., Martin-Visscher L.A., Vederas J.C.: Cloning and characterization of the gene cluster involved in the production of the circular bacteriocin carnocyclin A. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, **2**, 218–225 (2010)
 86. van Belkum M.J., Martin-Visscher L.A., Vederas J.C.: Structure and genetics of circular bacteriocins. *Trends Microbiol.* **19**, 411–418 (2011)
 87. Wirawan R.E., Swanson K.M., Kleffmann T., Jack R.W., Tagg J.R.: Uberolysin: a novel cyclic bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. *Microbiology*, **153**, 1619–1630 (2007)
 88. Zendo T.: Screening and characterization of novel bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 893–899 (2013)

POST. MIKROBIOL.,
2017, 56, 4, 465–469
<http://www.pm.microbiology.pl>

ZMIANY W TAKSONOMII γ -PROTEOBACTERIA, MODYFIKACJA NAZWY RZĘDU ENTEROBACTERIALES I NOWE RODZINY W OBRĘBIE ENTEROBACTERIALES ORD. NOV.

Paweł Nawrotek*, Bartłomiej Grygorcewicz, Adrian Augustyniak

Katedra Immunologii, Mikrobiologii i Chemii Fizjologicznej, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt,
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Wpłynęło w lipcu, zaakceptowano w sierpniu 2017 r.

1. Wstęp. 2. Zasady dotyczące wprowadzania zmian taksonomicznych. 3. Przesłanki wprowadzania zmian taksonomicznych. 4. Zmiany w rzędzie *Enterobacterales* ord. nov. 5. Bazy danych a zmiany w taksonomii rzędu *Enterobacterales* ord. nov. 6. Podsumowanie

Changes in the taxonomy of γ -Proteobacteria, modification of the order *Enterobacterales* and novel families within *Enterobacterales* ord. nov.

Abstract: Prokaryotic diversity increases every year with each new described species. Since the first discoveries of microorganisms, researchers' endeavours are dedicated to the systematisation of all known living organisms in a consistent taxonomy. Originally based on morphology, in recent years modern taxonomy develops thanks to the implementation of new discoveries in the fields of biochemistry and genetics. In the last thirty years, ribotyping was the leading technique used to classify microorganisms. Due to problems with the comparison of certain species, novel methods based on the analysis of proteins have been applied. In-depth analysis of *Enterobacteriaceae* family showed that its members are more dissimilar than previously thought, which eventually led to dividing this family into seven families and resulted in a change to the name of the order: from *Enterobacteriales* to *Enterobacterales*. These changes were applied in some biggest accessible databases. However, there are still many other which have not modified their taxonomy records to date. Such situation may lead to unnecessary confusion, which strengthens the necessity to create one, unified taxonomy which is approved by the whole scientific community.

1. Introduction. 2. Principles regarding the introduction of taxonomical changes. 3. Justification of taxonomical changes. 4. Modifications in the order *Enterobacterales* ord. nov. 5. Databases and changes in the taxonomy of the order *Enterobacterales* ord. nov. 6. Summary

Słowa kluczowe: *Enterobacteriaceae*, *Enterobacterales*, nowa taksonomia

Key words: *Enterobacteriaceae*, *Enterobacterales*, novel taxonomy

1. Wstęp

Taksonomia drobnoustrojów podlega ciągłym zmianom. Równolegle z rozwojem mikrobiologii tworzył się i zmieniał system nazewnictwa mikroorganizmów. Było to możliwe głównie dzięki wprowadzaniu nowych metod badawczych umożliwiających uzyskanie oryginalnych danych doświadczalnych. Dużym przełomem w identyfikacji i różnicowaniu bakterii, a tym samym w ich nomenklaturze, było wprowadzenie w 1884 roku przez Hansa Christiana Joachima Grama złożonej metody barwienia pozwalającej na wprowadzenie podziału bakterii na Gram-dodatnie i Gram-ujemne [19]. Bazując na morfologicznych i fizjologicznych przesłankach stopniowo odkrywano kolejne mikroorganizmy reprezentujące określone grupy i podejmowano próby ich klasyfikacji. Systemy oparte na analizie cech fenotypowych stanowią obecnie zasadniczy element rutynowej diagnostyki mikrobiologicznej, jednak dopiero odkry-

cie budowy i funkcjonowania komórek na poziomie molekularnym, począwszy od zaproponowanego przez Jamesa Watsona i Francis Cricka w 1953 roku modelu struktury DNA (na podstawie radiogramów wykonanych przez Rosalind Elsie Franklin) [18], doprowadziło do kolejnych badań i odkryć umożliwiających rozwój diagnostyki bazującej na nowych markerach przydatnych w określaniu przynależności taksonomicznej organizmów, w tym bakterii. W latach 90. XX wieku Carl Richard Woese zaproponował przełomowy model klasyfikacji organizmów oparty na analizie molekularnej sekwencji kodującej 16S rRNA. Wprowadzony dzięki temu podział świata żywego nie tylko pozwolił stworzyć uniwersalny system ukazujący rzeczywiste powiązania filogenetyczne pomiędzy organizmami, ale ustalił również najwyższe rangę taksony (zwane domenami) – Archaea, Bacteria oraz Eukarya [20]. Wykorzystywanie w rutynowej praktyce genu kodującego 16S rRNA jako molekularnego markera [3] doprowadziło

* Autor korespondencyjny: Paweł Nawrotek, Katedra Immunologii, Mikrobiologii i Chemii Fizjologicznej, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, al. Piastów 45, 70-311 Szczecin; tel. 91 449 67 10; fax: 91 454 16 42; e-mail: pawel.nawrotek@zut.edu.pl

do zrewidowania wcześniejszych ustaleń dotyczących systematyki wielu mikroorganizmów. Na tej podstawie dokonano m.in. szeregu zmian w taksonomii rodzaju *Bacteroides*, które zostały uwzględnione w ostatnim wydaniu Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [15]. Ponadto, dzięki zastosowaniu rybotypowania udało się także zaktualizować systematykę Gram-zmiennych ziarniako-pałeczek *Gardnerella vaginalis*, które ze względu na swój pleomorfizm, pierwotnie zaliczane były do rodzajów *Haemophilus* i *Corynebacterium* [4, 17, 12]. Aktualnie bakteria ta jest przyporządkowana do typu *Actinobacteria* (promieniowce) i rodziny *Bifidobacteriaceae* (wg bazy UniProt). Niestety stosowanie 16S rDNA w taksonomii ma swoje ograniczenia. Wraz ze wzrostem liczby dostępnych sekwencji w bazach danych stwierdzono, że system ten nie jest wystarczająco wiarygodny do oznaczania przynależności gatunkowej wielu różnych drobnoustrojów. W dużej mierze związane jest to z występowaniem podobieństwa pomiędzy sekwencjami nukleotydowymi, co z kolei może powodować trudności z wyborem specyficznych par starterów zapewniających odpowiedni poziom dyskryminacji prób analizowanych z użyciem techniki PCR [13]. Na tego typu problem natknęto się m.in. podczas porównywania sekwencji nukleotydowych 16S rDNA bakterii z rodzajów *Streptomyces* i *Kitasatospora*. W tym przypadku gen kodujący 16S rRNA okazał się nieprzydatny do różnicowania występujących w ich obrębie gatunków, a sam rodzaj *Kitasatospora* ulegał kolejnym zmianom reklasyfikacyjnym [9]. Wskazane trudności skłaniają do poszukiwania i stosowania alternatywnych metod różnicowania drobnoustrojów. W tym kontekście szczególne znaczenie przypisuje się metodom, które uwzględniają zarówno dane uzyskiwane z analizy filogenetycznej sekwencjonowanych genomów, genów konstytutywnych oznaczanych z użyciem techniki MLSA (Multilocus Sequence Analysis) oraz unikalnych insercji lub delecji obecnych w szeroko rozpowszechnionych białkach (CSI – Conserved Signature Insertions/Deletions), w tym w kluczowych białkach bakteryjnych, m.in. występujących w nukleoidzie czy też białkach rybosomalnych [1, 10].

W 2016 roku dokonano radykalnej zmiany w aksonomii rodziny *Enterobacteriaceae*, z której nie tylko wydzielono kilka nowych rodzin, ale także uzgodniono, że bakterie zaliczane wcześniej do *Enterobacteriaceae*, obecnie będą klasyfikowane do taksonu w randze rzędu. Dodatkowo zaproponowano zmianę dotychczasowej nazwy rzędu „*Enterobacteriales*” na „*Enterobacterales*” [1]. Niniejsza praca ma na celu przedstawienie zmian w aktualnej systematyce bakterii z rzędu *Enterobacterales* ord. nov., wskazanie argumentów, które doprowadziły do modyfikacji wcześniejszego systemu klasyfikacji oraz instytucji, które zaakceptowały proponowane zmiany taksonomiczne pałeczek jelitowych.

2. Zasady dotyczące wprowadzania zmian taksonomicznych

Nazewnictwem taksonomicznym Prokaryota zajmuje się Międzynarodowy Komitet ds. Systematyki Prokaryota (ICSP – International Committee on Systematics of Prokaryotes). Pomysł powstania systemu ujednoliconego nazewnictwa drobnoustrojów powstał podczas pierwszego międzynarodowego kongresu mikrobiologii, który odbył się w Paryżu w 1930 roku [8]. Przez lata był on zmieniany i uaktualniany. Początkowo dotyczył jedynie bakterii, ale następnie został rozszerzony także o archeony. Jedną z istotniejszych zmian w nomenklaturze taksonomicznej organizmów prokariotycznych było wprowadzenie dodatkowych zasad dotyczących prawidłowego oznaczania gatunków niehodowlanych w warunkach laboratoryjnych, które weszły w życie od 1 stycznia 2001 roku. Ostatnie dostępne sugestie dotyczące zasad wprowadzania zmian w nazewnictwie Prokaryota zostały opublikowane w 2015 roku jako draft manuskryptu z roku 2008 [16]. Od publikacji w Internecie (20/11/2015) był on cytowany 35 razy w pracach, które przedstawiały sugestie i komentarze dotyczące zapisów tego dokumentu. Autorzy umieścili w nim 65 reguł, które powinny być stosowane w nomenklaturze mikroorganizmów prokariotycznych. Za właściwe czasopismo, które zajmować się będzie zbieraniem i aktualizowaniem danych dotyczących nazewnictwa bakterii i archeonów uznano *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, w którym przedstawiono m.in. zasady właściwego wprowadzania nowego nazewnictwa, a także zasady przechowywania i udostępniania szczepów drobnoustrojów [8, 16]. Podejście oparte na ciągłym zbieraniu i publikowaniu danych w czasopiśmie dostępnym w sieci internetowej wydaje się być dobrym rozwiązaniem. Ze względu na szybkość dostępu do danych ma ono zasadniczą przewagę nad tradycyjnymi publikacjami książkowymi, które przez dziesięciolecia były zasadniczym źródłem informacji na temat nazewnictwa taksonomicznego drobnoustrojów, takimi jak „*The Prokaryotes*” (wyd. Springer-Verlag) czy „*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*” (wyd. Springer-Verlag). Ten ostatni tytuł został zmodyfikowany i od 2015 roku jest dostępny na stronie wydawnictwa John Wiley & Sons, Inc. jako „*Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*” [2].

3. Przesłanki wprowadzania zmian taksonomicznych

Od wielu lat złotym standardem identyfikacji drobnoustrojów była analiza oparta o sekwencję genu kodującego 16S rRNA, czyli małą podjednostkę rybosomu. Każdego roku bazy danych są uzupełniane o nowe

sekwencje, które na bieżąco są publikowane m.in. na stronie NCBI (National Center for Biotechnology Information), a także w bazie RDP (Ribosomal Database Project) [6]. Ilość sekwencji zdeponowanych w bazie RDP wynosi ponad 3,3 mln. Identyfikacja w oparciu o 16S rRNA opiera się na porównaniu częściowej lub całkowitej sekwencji genu do sekwencji referencyjnej. Takiego porównania można łatwo dokonać wykorzystując aplikację BLAST dostępną na portalu NCBI. Podobieństwa pomiędzy sekwencjami mogą być także analizowane za pośrednictwem programów komputerowych, takich jak MEGA 7 oraz Ugene. W modelowaniu przestrzennym i porównywaniu białek pomocne może być ponadto oprogramowanie Chimera, które umożliwia przepisywanie sekwencji nukleotydowych na aminokwasowe i odwrotnie.

Sekwencje rybosomalne są użyteczne w taksonomii ze względu na ich wysoce konserwatywny charakter. Bez prawidłowego funkcjonowania rybosomów, komórki nie byłyby zdolne do przeprowadzania procesu translacji, a tym samym nie mogłyby wytwarzać białek. Dlatego mutacje w genach kodujących podjednostki rybosomu ograniczone są funkcją rybosomalnego RNA, w przeciwieństwie do mutacji innych genów. Dla przykładu, defekt jednego z enzymów odpowiedzialnych za metabolizowanie źródeł węgla prawdopodobnie spowoduje uruchomienie innego szlaku metabolicznego i wykorzystanie węgla w innej formie. Defekt rybosomów z reguły skazuje daną komórkę na śmierć [5].

Z drugiej strony konserwatywny charakter sekwencji małej podjednostki rybosomu może być także wadą genotypowania, ze względu na ściśle ograniczoną liczbę możliwych mutacji, a przez to ograniczoną liczbę wariantów. Problem ten jest zauważalny zwłaszcza w przypadku blisko spokrewnionych gatunków bakterii, takich jak np. *Streptomyces* i *Kitasatospora*, w przypadku których sama analiza 16S rRNA jest niewystarczająca do ich skutecznego odróżnienia. W wymienionym przykładzie za dodatkowy marker, który umożliwił zróżnicowanie obu gatunków, uznano wysoce konserwatywne białka z rodziny Ssg odpowiadające za procesy morfogenetyczne związane ze złożonym cyklem rozwojowym promieniowców, w których odbywa się podział komórki i wytwarzanie spor [9].

4. Zmiany w rzędzie *Enterobacterales* ord. nov.

W roku 2016 dokonano znaczących zmian w taksonomii rodziny *Enterobacteriaceae*, a także rzędu *Enterobacterales*, którego nazwę zmieniono na *Enterobacterales* ord. nov. W pracy Adeolu i wsp. [1] zaprezentowano wyniki kompleksowych badań genomicznych opartych na analizie porównawczej poszczególnych przedstawicieli

rzędu *Enterobacterales*, które doprowadziły do rekonstrukcji filogenetycznej tego rzędu. Działania te polegały na analizie 1548 bakteryjnych białek rdzeniowych (core proteins), 53 białek rybosomalnych oraz analizie MLSA czterech białek (GyrB, RpoB, AtpD i InfB), w zakresie obecnych w nich unikalnych insercji lub delecji (CSI). Te konserwatywne zmiany stanowią ważne markery molekularne pozwalające na dokładne oznaczenie zależności filogenetycznych pomiędzy mikroorganizmami [11]. Dzięki nim można otrzymać szczegółowe mapy filogenetyczne o wyższej rozdzielczości, co zostało dokładnie opisane w pracy Glaeser i Kampfer [10]. Dodatkowo, Adeolu i wsp. [1] wyznaczyli pokrewieństwo między przedstawicielami rzędu *Enterobacterales*, na podstawie analizy ogólnego podobieństwa ich genomów.

Nowo zaproponowane, przez Adeolu i wsp. [1], zmiany w rzędzie *Enterobacterales* ord. nov. obejmują przekształcenie monotypowego rzędu *Enterobacteriales*, zawierającego tylko jedną rodzinę *Enterobacteriaceae*, w politypowy rząd *Enterobacterales* ord. nov. obejmujący łącznie siedem rodzin, w tym: *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae* oraz *Budviciaceae*. Nową taksonomię pałeczek jelitowych z rzędu *Enterobacterales* ord. nov. zestawiono w tabeli I.

Należące do rodziny *Enterobacteriaceae* bakterie posiadają aż 21 specyficznych dla nich konserwatywnych insercji/delecji aminokwasowych w kluczowych białkach, takich jak: NADH zależna oksydoreduktaza ubikwitynowa (podjednostka M), białko ruchliwości drgającej PilT, AMP zależna ligaza 2,3-dihydroksybenzoesu, białko wiążące ATP/GTP, wielofunkcyjny kompleks utleniający kwas tłuszczowy (podjednostka alfa), hydrolaza S-formyloglutenu, dehydrogenaza asparaginianowo-semialdehydowa, epimeraza, białko membranowe, dehydrogenaza mrówczanu (podjednostka 7), transferaza glutationu, mutaza fosfoglukozaminy, hydrolaza glikozylowa, 23 rRNA, metylotransferaza uracylu, kochaperon HscB, amidaza N-acetylmuramilo-L-alaniny, białko transportujące siarczki, białko wiążące ATP (CysA), białko budujące LPS (LptD) [1]. Z kolei, rodzina *Erwiniaceae* obejmuje gatunki bakterii posiadające konserwatywne wzory CSI w 12 białkach: ligazie glutaminowo-cysteinowej, podjednostce B gyrazy DNA, białku formowania LPSu (LptD), prekursorze DsbA, helikazie RNA, syntazie TruD, białku transportującym glicynę/betainę ABC, białku wiążącym ATP, dysmutazie ponadtlenkowej, białkach fazy stacjonarnej czy dwuskładnikowego sensora kinazy histydyliny [1]. Członków rodziny *Pectobacteriaceae* można odróżnić od innych przedstawicieli rzędu *Enterobacterales* ord. nov. z wykorzystaniem czterech konserwatywnych indeli (insercji/delecji) znajdujących się w aktywności transkrypcji białek RhaS, białku motorycznym MotB,

Tabela I
Nowy podział rodzin wydzielonych z *Enterobacteriaceae* w obrębie
rzędu *Enterobacterales* ord. nov. oraz ich główni przedstawiciele
[na podstawie 1]

Rząd	Rodzina	CSI*	Główni przedstawiciele
<i>Enterobacterales</i> ord. nov.	<i>Enterobacteriaceae</i>	21	<i>Escherichia</i> **
			<i>Salmonella</i>
			<i>Shigella</i>
			<i>Enterobacter</i>
			<i>Klebsiella</i>
			<i>Citrobacter</i>
	<i>Erwinaceae</i>	12	<i>Erwinia</i> **
			<i>Pantoea</i>
			<i>Phaseolibacter</i>
			<i>Tatumella</i>
			<i>Wigglesworthia</i>
	<i>Pectobacteriaceae</i>	4	<i>Pectobacterium</i> **
			<i>Brenneria</i>
			<i>Dickeya</i>
	<i>Yersiniaceae</i>	3	<i>Yersinia</i> **
			<i>Ewingella</i>
			<i>Serratia</i>
	<i>Hafniaceae</i>	4	<i>Hafnia</i> **
			<i>Edwardsiella</i>
	<i>Morganellaceae</i>	7	<i>Morganella</i> **
			<i>Proteus</i>
			<i>Providencia</i>
			<i>Moellerella</i>
	<i>Budviciaceae</i>	9	<i>Budvicia</i> **
			<i>Leminorella</i>
			<i>Pragia</i>

* CSI (conserved signature insertions/deletions)

** nazwa rodzaju bakterii reprezentatywna dla rodzin
w obrębie *Enterobacterales* ord. nov.

dwuskładnikowym białku kinazy histydynowej oraz
jednym białku hipotetycznym [1].

W świetle przedstawionych zmian rodzina *Yersinia*-
ceae charakteryzuje się obecnością trzech charaktery-

stycznych, konserwatywnych sygnatur CSI występują-
cych w białkowym regulatorze transkrypcji z rodziny
TetR oraz białku hipotetycznym [1]. Bakterie z rodziny
Hafniaceae można odróżnić od innych przedstawicieli
Enterobacterales ord. nov. na podstawie obecności kon-
serwatywnych insercji/delecji aminokwasów, w takich
białkach jak: dwuskładnikowy regulator odpowiedzi
GIR, adenylotransferaza glukozo-1-fosforanowa, akty-
wator transkrypcyjny NhaR, czy sensor kinazy histy-
dynowej [1]. *Morganellaceae* to z kolei rodzina, którą
charakteryzuje obecność siedmiu konserwatywnych
CSI znalezionych w białkach: sukcynylotransferazy
dihydrolipoamidowej, dipeptydazy Xaa-Pro, UDP-
-zależnej hydrolazy, czynnika sprzężonego z naprawą
transkrypcji, dipeptydazy Xaa-Pro, acetylotransferazy
fosforanowej, ligazy histydyna-tRNA, amidazy N-acety-
lomuramilo-L-alaniny [1]. Natomiast bakterie należące
do rodziny *Budviciaceae* charakteryzują się insercjami/
delecjami występującymi w dwufunkcyjnej białkowo-
-disiarczanowej izomerazie/oksydoreduktazie (DsbC),
białku transportującym L-metioninę, ligazie D-alanina-
-D-alanina oraz w sześciu białkach hipotetycznych [1].

5. Bazy danych a zmiany w taksonomii rzędu *Enterobacterales* ord. nov.

Każda zmiana w taksonomii czy nomenklaturze
niesie za sobą konieczność aktualizowania informacji
w odpowiednich bazach danych. W tabeli II przedsta-
wiono wiodące bazy danych wraz z aktualnymi adre-
sami ich stron internetowych, w których na bieżąco
uwzględniane są zmiany taksonomiczne mikroorganiz-
mów. Należy podkreślić, iż trzy największe, międzyna-
rodowe bazy danych (NCBI, UniProt, RDP) wprowa-
dziły zmiany do prezentowanej taksonomii pałeczek
jelitowych, w innych podawana jest jeszcze dawna sys-
tematyka. W związku z tym aktualnie funkcjonują dwa
podziały taksonomiczne dotyczące γ -Proteobacteria,
co może powodować pewien chaos informacyjny.
Przykładowo w zbiorowej pracy „Bergey's Manual of

Tabela II
Internetowe bazy danych, w których uwzględniane są zmiany taksonomiczne mikroorganizmów

Nazwa bazy internetowej	Uwzględnienie nowej taksonomii pałeczek jelitowych*	Adres internetowy bazy
LPSN (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature)	Nie	bacterio.net
RDP (Ribosomal Database Project)	Tak	rdp.cme.msu.edu
NCBI (National Center for Biotechnology Information)	Tak	ncbi.nlm.nih.gov
BacDive (The Bacterial Diversity Metadatabase)	Nie	bacdive.dsmz.de
DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)	Nie	dsmz.de
UniProt (The Universal Protein Resource)	Tak	uniprot.org/taxonomy/

* Zmiany taksonomiczne w konwencji zaproponowanej przez Adeolu i wsp. [1]

Systematics of Archaea and Bacteria”, która ostatnio była aktualizowana w marcu 2017 roku, taksonomia rodziny *Enterobacteriaceae* pozostała bez zmian. Co więcej, mimo starań wciąż brakuje ujednoliconych wytycznych dotyczących „oficjalnego” nazewnictwa i taksonomicznego przyporządkowania drobnoustrojów, które byłyby jednolite i uznane przez całe środowisko naukowe. Wiązałoby się to m.in. z globalnym aktualizowaniem źródeł podających najbardziej aktualne i wiarygodne informacje taksonomiczne. W dostępnych źródłach brakuje zwłaszcza podsumowań rocznych lub dwuletnich informujących o zmianach, które zostały zatwierdzone i właściwie wprowadzone do systemu taksonomicznego w taksonach wyższych niż rodzaj. W tym kontekście na szczególną uwagę zasługuje baza DSMZ, która regularnie publikuje i uaktualnia listę nazw opublikowanych zgodnie z założeniami International Code of Nomenclature of Bacteria [7]. Istnieje także możliwość sprawdzenia, czy nazwa określonego mikroorganizmu została opublikowana zgodnie z zasadami ICSP w internetowej bazie „NamesforLife” [14]

Podsumowanie

Postępy w diagnostyce mikrobiologicznej powodują, iż taksonomia wielu mikroorganizmów podlega znaczącym zmianom i reklasyfikacjom. Dawniej brane w tym celu pod uwagę cechy fenotypowe, później genotypowe oparte o sekwencje kodujące rRNA czy zsekwencjonowane genomy, są obecnie uzupełniane o informacje pozyskiwane ze struktury aminokwasowej białek pełniących w komórkach kluczowe funkcje. Wyniki uzyskiwane z badań molekularnych z pewnością są pomocne w prawidłowym konstruowaniu drzew filogenetycznych umożliwiających skuteczniejsze różnicowanie mikroorganizmów. Konieczne wydaje się jednak tworzenie jednolitych i usystematyzowanych zasad wprowadzania zmian w taksonomii, które byłyby uznane przez całe środowisko naukowe.

Piśmiennictwo

1. Adeolu M., Alnajjar S., Naushad S., Gupta R.S.: Genome based phylogeny and taxonomy of the “*Enterobacterales*”: proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**, 5575–5599 (2016)
2. Brenner D.J., Farmer J.: *Enterobacteriaceae* (w) Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2015, s. 1–24
3. Case R.J., Kjelleberg S. i wsp.: Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 278–288 (2007)
4. Catlin B.W.: *Gardnerella vaginalis*: Characteristics, clinical considerations, and controversies. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**, 213–237 (1992)
5. Clarridge J.E., Alerts C.: Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 840–862 (2004)
6. Cole J.R., Tiedje J.M.: The Ribosomal Database Project: Improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* **37**, D141–D145 (2009)
7. DSMZ: List of prokaryotic names validly published., 04.2017, https://www.dsmz.de/fileadmin/Bereiche/ChiefEditors/BacterialNomenclature/DSMZ_Bactnames.pdf (30.06.2017)
8. Garrity G.M.: Report on the activities of the International Committee on Systematics of Prokaryotes. (2014)
9. Girard G., van Wezel G.P. i wsp.: A novel taxonomic marker that discriminates between morphologically complex actinomycetes. *Open Biol.* **3**, 130073 (2013)
10. Glaeser S.P., Kämpfer P.: Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Syst. Appl. Microbiol.* **38**, 237–245 (2015)
11. Gupta R.S.: Protein phylogenies and signature sequences: A reappraisal of evolutionary relationships among archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1435–1491 (1998)
12. Jarosik G.P., Chandler R. i wsp.: Acquisition of Iron by *Gardnerella vaginalis*. *Infect. Immun.* **66**, 5041–5047 (1998)
13. Klindworth A., Glöckner F.O. i wsp.: Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* **41**, 1–11 (2013)
14. NamesforLife: NamesforLife technology, <https://www.namesforlife.com/search> (30.06.2017)
15. Niestępski S., Harnisz M., Korzeniewska E., Osińska A., Dziuba B.: *Bacterioides* spp. – znaczenie kliniczne, lekooporność i metody jej oznaczania. *Post. Mikrobiol.* **56**, 67–76 (2017)
16. Parker C.T., Tindall B.J., Garrity G.M.: International Code of Nomenclature of Prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* DOI:10.1099/ijsem.0.000778 (2015)
17. Piot P., Van Dyck E., Goodfellow M., Falkow S.: A Taxonomic Study of *Gardnerella vaginalis* (*Waemophilus vaginalis*) Gardner and Dukes 1955. *J. Gen. Microbiol.* **119**, 373–396 (1980)
18. Watson J.D., Crick F.H.C.: Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, **171**, 737–738 (1953)
19. Wilhelm M.J., Dai H.L. i wsp.: Gram’s stain does not cross the bacterial cytoplasmic membrane. *ACS Chem. Biol.* **10**, 1711–1717 (2015)
20. Woese C.: A new biology for a new century. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 173–186 (2004)

POST. MIKROBIOL.,
2017, 56, 4, 471–476
<http://www.pm.microbiology.pl>

INFORMACJE Z POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW

Konferencja pod patronatem PTM



IV edycja konferencji

„Wektory i patogeny – w przeszłości i przyszłości”

Wrocław, 24 listopada 2017ó

Szanowni Państwo,

Instytut Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego oraz Wrocławski Oddział Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów i Wrocławski Oddział Polskiego Towarzystwa Parazytologicznego zapraszają na IV edycję konferencji pt. *„Wektory i patogeny – w przeszłości i przyszłości”*.

Konferencja ma na celu prezentację badań z zakresu mikrobiologii i parazytologii jakie są prowadzone aktualnie w krajowych jak i zagranicznych jednostkach naukowych. Pragniemy również udokumentować historyczny dorobek polskich naukowców w tych dziedzinach. W tym roku szczególną uwagę objęty będzie problem uwarunkowanych środowiskowo chorób infekcyjnych i inwazyjnych, których czynnikami etiologicznymi są patogeny transmitowane przez stawonogi (wektory), głównie hematófagiczne kleszcze i komary, a także ukazanie skutecznych sposobów zapobiegania i monitorowania tych zagrożeń.

Podczas konferencji planowana jest prezentacja praktycznych osiągnięć 20-letniej współpracy Instytutu Genetyki i Mikrobiologii UWr z Wydziałem Środowiska i Rolnictwa Urzędu Miasta Wrocławia w zakresie biologicznego (mikrobiologicznego) zwalczania komarów na terenie Aglomeracji Wrocławskiej. Ważnym celem konferencji jest także integracja środowiska naukowego oraz ukazanie osiągnięć naukowych młodych adeptów nauki.

Szczegółowe informacje zamieszczone są na stronie:

<http://www.mikrobiologia.uni.wroc.pl>

Organizator:

Uniwersytet Wrocławski, Instytut Genetyki i Mikrobiologii

Miejsce:

Uniwersytet Wrocławski, Instytut Genetyki i Mikrobiologii
ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław

Konferencja pod patronatem PTM



V edycja konferencji

Viruses of Microbes V: Biodiversity and future applications

Wrocław, 9–13 lipca 2018

Jest to piąte już spotkanie z serii międzynarodowych konferencji towarzystwa International Society for Virus of Microbes (ISVM) poświęconej wirusom drobnoustrojów.

Konferencje Virus of Microbes odbywają się co dwa lata, a rozpoczęły się w 2010 roku w Instytucie Ludwika Pasteura w Paryżu, a następnie kontynuowane były w Brukseli (2012), Zurichu (2014), i Liverpoolu (2016), gromadząc na każdym spotkaniu ok. 400–500 uczestników z całego świata.

Przyszłoroczne spotkanie zatytułowane jest „Biodiversity and future application”. Tematyka pięciodniowej konferencji poświęcona będzie podstawowym i aplikacyjnym badaniom naukowym nad wirusami mikroorganizmów (algi, archaea, bakterie, grzyby, pierwotniaki i wirusy). Wirusy są kluczowym elementem warunkującym bioróżnorodność i ewolucję mikrobiologiczną, jak również służą jako narzędzie w biologii molekularnej. W ostatnich czasie coraz większym zainteresowaniem cieszą się badania nad bakteriofagami, które stanowią obiecującą alternatywę leczenia infekcji wywołanych zwłaszcza przez wielolekooporne szczepy patogenów człowieka, a są stosowane już w konserwacji żywności, hodowli zwierząt i produkcji roślin uprawnych.

Uniwersytet Wrocławski (prof. dr hab. Zuzanna Drulis-Kawa) wraz z Laboratorium Bakteriofagowym Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu (prof. dr hab. Krystyna Dąbrowska), mają zaszczyt organizować kolejną międzynarodową edycję tej konferencji w 2018 roku.

Konferencja porusza tematykę niezwykle aktualną i będzie dedykowana do wszystkich osób zajmujących się zagadnieniami z zakresu zwalczania zakażeń bakteryjnych, jak również ekologii i różnorodności biologicznej drobnoustrojów.

Konferencja została objęta patronatem przez European Molecular Biology Organization jako EMBO Workshop „Viruses of microbes 2018” <http://www.embo.org/events>

Lokalizacja:

Uniwersytet Wrocławski, Wydział Prawa, Administracji i Ekonomii, ul. Uniwersytecka 22/26, 50-145 Wrocław

Organizatorzy:

Uniwersytet Wrocławski, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN

Kontakt:

prof. Zuzanna Drulis-Kawa, zuzanna.drulis-kawa@uwr.edu.pl, tel. 71 375 62 90

prof. Krystyna Dąbrowska, dabrok@iitd.pan.wroc.pl, tel. 71 337 11 72 wewn. 316

VIRUSES OF MICROBES V

Biodiversity and future applications

9–13 July 2018 Wrocław, Poland

Institute of Genetics and Microbiology

University of Wrocław

&

Hirschfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy

Polish Academy of Sciences

On behalf of the organising committee of the ISVM conference on the Viruses of Microbes, we are pleased to invite to the fifth meeting in an international series that began in 2010 at the Pasteur Institute.

This event is one that focuses on basic and applied scientific research on viruses infecting microbes (algae, archaea, bacteria, fungi, protozoa and viruses). Viruses have always been a key element of microbial diversity and evolution, as well as a tool for the molecular biologist to learn more about how the host cell functions, but this information has also been put to productive use in latter days to control infections and fouling in many areas of our modern life.

The conference is included to the EMBO Workshop list <http://www.embo.org/events>

Location:

Uniwersytet Wrocławski, Wydział Prawa, Administracji i Ekonomii

ul. Uniwersytecka 22/26, 50-145 Wrocław

Organizers:

Uniwersytet Wrocławski; Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN

Contact:

prof. Zuzanna Drulis-Kawa, zuzanna.drulis-kawa@uwr.edu.pl, tel. 71 375 62 90

prof. Krystyna Dąbrowska, dabrok@iitd.pan.wroc.pl, tel. 71 337 11 72/ 316



INFORMACJA O PRACY PREZYDIUM ZARZĄDU GŁÓWNEGO PTM

30 sierpnia, 12 września, 31 października 2017 r. odbyły się elektroniczne głosowania przez członków Prezydium ZG PTM szeregu Uchwał, które poniżej omówiono.

1) Zgłosiło się szereg kandydatów, którzy chcieliby zapisać się do PTM. Jednomyślnie przyjęto **Uchwałę nr 23-2017 z dnia 30.08.2017 r. w sprawie przyjęcia 20 nowych członków zwyczajnych PTM.**

2) Dużo wysiłku wkładamy w porządkowanie przynależności osób do PTM i kwestii opłacania przez nich składek członkowskich. Dokładna liczba członków PTM jest trudna do ustalenia, ale określamy ją na około 1000 osób. Jednakże na dzień 28.08.2017 r. składki za dany rok zapłaciło: 2015 r. – 693, 2016 r. – 760, 2017 r. – 595 osób. Zgodnie ze Statutem PTM par. 15 p. 3: „Członkostwo zwyczajne ustaje na skutek skreślenia z listy członków Towarzystwa z powodu nie zapłacenia składki członkowskiej przez dwa kolejne lata, skreślenie może nastąpić dopiero po pisemnym uprzedzeniu o zamiarze skreślenia, przez Oddział Terenowy PTM i upływie wyznaczonego terminu dodatkowego do uregulowania zaległych składek”. Do osób które w przewidzianym przez Statut PTM i Uchwałę ZG PTM z dnia 04.02.2014 nie opłaciły zaległych składek członkowskich i do których mieliśmy adresy wysłano w lipcu 2017 r. listy z zawiadomieniem o planowanym skreśleniu. Część z tych osób uzupełniła składki, część przysłała listy o rezygnacji z członkostwa w PTM. Pozostają osoby, do których nie możemy dotrzeć oraz osoby nieplacące składek przez wiele lat, ale nie skreślone z listy PTM z powodu niedopatrzenia tej sprawy. Jednomyślnie przyjęto **Uchwałę nr 24-2017 z dnia 30.08.2017 r. w sprawie uporządkowania listy członków zwyczajnych PTM i usunięcia z tej listy osób nie płacących składek członkowskich w statutowo przewidzianym terminie.** Na początku września br. wysłaliśmy listy do ponad 170 osób z informacją, że zostają wykreśleni z listy członków zwyczajnych PTM. Na zaktualizowanej liście pozostaną osoby, które regularnie opłacały składki do 2014 r. i zapłaciły składki za 2015 i/lub 2016 i/lub 2017. Nie dotyczy to osób, które przystąpiły do PTM w okresie 2015–2017.

3) Brak regularnego płacenia składek członkowskich jest niewątpliwie zaniedbaniem lub świadomą decyzją tych osób, jednakże wydaje się, że w minionym okresie Towarzystwo nie wykazało należytej aktywności w przypominaniu o konieczności zapłacenia zaległych składek i wysyłaniu do dłużników e-maili i listów w tej sprawie. Wiele osób zasłużonych dla mikrobiologii zaniedbało obowiązku regularnego płacenia składek. Opinie na temat utworzenia możliwości ponownego przystąpienia do PTM osobom, skreślonym z powodu niepłacenia składek, wśród członków Prezydium były podzielone. Większość członków Prezydium była jednak za przyjęciem **Uchwały nr 25-2017 z dnia 30.08.2017 r. w sprawie możliwości ponownego przystąpienia do PTM po rocznym okresie karencji osób skreślonych z listy członków PTM za niepłacenie składek członkowskich**. Tym samym wprowadza się możliwość ponownego przystąpienia do PTM osobom skreślonym z listy członków zwyczajnych z powodu niepłacenia składek członkowskich, po rocznym okresie karencji, od 01.10.2018 r., na zasadach nowo przystępujących do Towarzystwa członków zwyczajnych.

4) Dosyć długo zajmowaliśmy się kwestią przygotowania stanowiska PTM w sprawie przyznania absolwentom uniwersyteckich studiów magisterskich na kierunku Mikrobiologia prawa wykonywania zawodu Diagnosty Laboratoryjnego. Przy wsparciu 3-osobowego zespołu, którego prace koordynowała Pani prof. Beata Sadowska przygotowano propozycję tekstu, w którym staraliśmy się osiągnąć kompromis stanowisk. Większość członków Prezydium była za przyjęciem **Uchwały nr 26-2017 z dnia 30.08.2017 r. w sprawie stanowiska PTM odnośnie przyznania absolwentom uniwersyteckich studiów magisterskich na kierunku Mikrobiologia prawa wykonywania zawodu Diagnosty Laboratoryjnego**. Poniżej zamieszczony jest tekst, który będzie opublikowany w czasopiśmie PTM oraz został przekazany do Pana Prezydenta RP Andrzeja Dudy, Pani Premier Beaty Szydło, Panów Ministrów ds. Zdrowia Konstantego Radziwiłła i ds. Nauki Jarosława Gowina. Od Pana Ministra K. Radziwiłła otrzymaliśmy odpowiedź, że prace nad ustawą są prowadzone i nasze stanowisko będzie wzięte pod uwagę.

**Stanowisko Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów
w sprawie przyznania absolwentom uniwersyteckich studiów magisterskich na kierunku Mikrobiologia
prawa wykonywania zawodu Diagnosty Laboratoryjnego**

W oparciu o Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 14 listopada 2008 r. (Dz. U. Nr 208, Poz. 1312), wpisujące mikrobiologię na listę dziedzin mających zastosowanie w ochronie zdrowia oraz ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym z 2011 r. (Dz. U. Nr 84, poz. 455), utworzono niezależne kierunki Mikrobiologia na wydziałach pięciu Polskich uniwersytetów posiadających odpowiednie uprawnienia (Uniwersytetu Łódzkiego, Szczecińskiego, Warmińsko-Mazurskiego, Wrocławskiego oraz Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego). Opracowano standard kształcenia dla kierunku Mikrobiologia, dokonując przesunięcia profilu kształcenia z ogólnobiotycznego w kierunku ogólnomedycznym, co wydaje się, że powinno zapewnić zdobywanie przez studentów kierunku Mikrobiologia wiedzy i umiejętności upoważniających do podejmowania samodzielnych czynności w ramach szeroko rozumianej medycznej diagnostyki laboratoryjnej. Standard ten został opracowany przez mikrobiologów, immunologów i genetyków z uniwersytetów: Łódzkiego, Warszawskiego, Wrocławskiego i UMCS w Lublinie, przy współpracy z członkami Komitetu Mikrobiologii PAN oraz w porozumieniu z Krajową Radą Diagnostów Laboratoryjnych oraz kierownikami laboratoriów medycznych, i zatwierdzony przez Radę Główną Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Na podstawie ww. znowelizowanej ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym, standard ten został przepisany na odpowiednie efekty kształcenia w zakresie wiedzy, umiejętności i kompetencji społecznych.

Podczas pięcioletnich, dwustopniowych studiów (3+2), osoby uzyskujące najpierw licencjat na kierunku Mikrobiologia, a następnie tytuł zawodowy magistra Mikrobiologii powinni uzyskać efekty kształcenia wymagane do wykonywania zawodu Diagnosty Laboratoryjnego określone w Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 24 sierpnia 2016 r. (Poz. 1434), które mają obowiązywać od roku akademickiego 2017/2018 studentów kierunku Analityka Medyczna/Medycyna Laboratoryjna. Studenci obu stopni studiów kierunku Mikrobiologia uzyskują wszystkie wymagane tym Rozporządzeniem i weryfikowane podczas egzaminów i kolokwium zaliczeniowych, efekty kształcenia. Biorąc pod uwagę odpowiedzialność, jaka spoczywa na zawodzie Diagnosty Laboratoryjnego, wyrażamy przekonanie, iż tylko osiąganie określonych standardów/ efektów kształcenia w ramach wybranych kierunków studiów wyższych, może być gwarancją przygotowania absolwentów do pracy w tym zawodzie, zapewniając jednocześnie bezpieczeństwo pacjentów i prawidłową współpracę diagnostów z lekarzami.

W związku z powyższym większość członków Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów uważa, iż uprawnienia do tytułu Diagnosty Laboratoryjnego powinny być uzależnione od odpowiednich efektów kształcenia, które muszą być ustalone dla każdego kierunku, a nie od nazwy kierunku studiów. Absolwenci uniwersyteckich kierunków Mikrobiologia, z tytułem magistra mikrobiologii, powinni mieć prawo do starania się o wpis na Listę Diagnostów Laboratoryjnych, ponieważ podczas studiów uzyskują efekty kształcenia wymagane do wykonywania zawodu Diagnosty Laboratoryjnego, zgodne ze standardem przewidywanym dla kierunku Analityka Medyczna/Medycyna Laboratoryjna, dokumentowane dyplomem, dorobkiem (praca licencjacka, magisterska, doktorska, publikacje) oraz odbytymi praktykami i stażami zawodowymi. Prawo wpisu na Listę Diagnostów Laboratoryjnych dla absolwentów kierunku Mikrobiologia można by uzyskać po ukończeniu studiów i po rocznym stażu w wieloprofilowym laboratorium medycznym oraz zdaniu egzaminu państwowego.

5) Co roku odbywają się w różnych miastach Europy spotkania zarządu FEMS i przedstawicieli europejskich towarzystw mikrobiologicznych, tzw. FEMS Council. Zwykle jest to około 60 osób. Obrady trwają 2 dni piątek i sobotę w I połowie września. Poruszane są sprawy dotyczące FEMS, akceptowane sprawozdania, organizowane wybory członków zarządu, itp. sprawy organizacyjne. Na ubiegłorocznym spotkaniu w Atenach zapytano, czy nie można by zorganizować FEMS Council w Warszawie – nigdy nie było takiego spotkania w Polsce. Wydaje się, że wypadłoby po 43 latach takich spotkań zorganizować FEMS Council w Warszawie we wrześniu 2018 r. Przy okazji Konferencji krakowskiej zgłosiły się firmy: Global Congress sp. z o.o. oraz Warsaw Convention Bureau, które po rozmowach zaoferowały pomoc w organizacji FEMS Council oraz pewien wkład finansowy na pokrycie: cocktailu powitalnego, wycieczki po Warszawie i częściowe dofinansowanie wieczornej kolacji (to są stałe punkty każdego FEMS Council). Federacja opłaca wynajem pomieszczeń na obrady, a koszty hotelu i podróży każdy z uczestników pokrywa we własnym zakresie. Pewne koszty, ale wydaje się do zaakceptowania, poniesie PTM. Niemniej z powodu braku do tej pory organizacji FEMS Council w Polsce i ze względów prestiżowych wskazane jest podjęcie tego wysiłku. Warto zaznaczyć, że FEMS przyznało grant w wysokości 3000 Euro na organizację Konferencji 90 lat PTM

w Krakowie. Członkowie Prezydium jednomyślnie przyjęli **Uchwałę nr 27-2017 z dnia 30.08.2017 r. w sprawie zorganizowania we wrześniu 2018 r. spotkania FEMS Council w Warszawie.**

6) W związku ze zgłoszoną przez Panią prof. Izabelę Sitkiewicz na ostatnim posiedzeniu ZG PTM chęcią rezygnacji z funkcji Redaktora Naczelnego czasopisma Polish Journal of Microbiology, po rozeznaniu istniejącej sytuacji, postanowiono przychylić się do tej prośby i dokonać odpowiednich zmian kadrowych. Z dniem 01.09.2017 r. powierzono funkcję Redaktora Naczelnego PJM Pani prof. Jolancie Soleckiej z Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie. Jednocześnie Pani prof. Elżbiecie A. Trafny zostaje powierzona funkcja Zastępcy Redaktora Naczelnego PJM (Deputy Editor). Zmiana składu zespołu redakcyjnego została już przeprowadzona przez Redaktora Naczelną PJM. Jednomyślnie podjęto **Uchwałę nr 28-2017 z dnia 30.08.2017 r. w sprawie zmiany Redaktora Naczelnej i członków zespołu redakcyjnego czasopisma Polish Journal of Microbiology.**

7) Trudna sytuacja finansowa PTM, spowodowana przede wszystkim wycofaniem się MNiSW z dofinansowywania czasopism w 2016 r. (otrzymywaliśmy kwoty: 66 970 zł w 2013 i 2014, 51 000 zł w 2015 r.) wymusza podjęcie drastycznych kroków, aby ograniczyć koszty wydawania i dystrybucji czasopism PJM i PM. Roczny koszt to ponad 120 000 zł. Koszt samych znaczków do wysyłki czasopism to ponad 20 000 zł. PTM jako Towarzystwo którego przychody oparte są na składkach członkowskich nie jest w stanie finansować wydawanego w takiej formie czasopisma, należy w jak najszybszym czasie znaleźć możliwość znacznego zredukowania ponoszonych przez Towarzystwo, czyli nas wszystkich kosztów. Nowa Redaktor Naczelna PJM i zespół redakcyjny proponowali zrezygnować z wydawania papierowej wersji czasopisma Polish Journal of Microbiology od stycznia 2018 r. przy pozostawieniu tylko wersji internetowej – online. Większość członków Prezydium PTM podzieliło to stanowisko, przyjmując **Uchwałę nr 29-2017 z dnia 30.08.2017 r. w sprawie zaprzestania wydawania papierowej wersji czasopisma Polish Journal of Microbiology od stycznia 2018 r. i pozostawienia tylko wersji internetowej.**

8) Oszczędności muszą dotyczyć również procesu wydawniczego i dystrybucji Postępów Mikrobiologii. Względy finansowe zmuszają do zrezygnowania z bezpłatnego przekazywania zeszytów PM dla członków PTM. Czasopismo będzie się ukazywało nadal w wersji elektronicznej – online. Jeżeli ktoś z członków PTM chciałby otrzymywać papierową wersję PM, mógłby to uzyskać w 2018 r. w ramach płatnej prenumeraty. Musimy się jednak zorientować ile to by było osób i jaki byłby realny koszt takiej prenumeraty. Druk zostanie utrzymany jedynie dla prenumeratorów (osób i instytucji), a wersja papierowa PM rozsyłana będzie tylko do określonych adresatów w liczbie 100 egzemplarzy. Dokładna liczba prenumeratorów na rok 2018 zostanie określona w grudniu 2017 r. Członkowie Prezydium jednomyślnie przyjęli **Uchwałę nr 30-2017 z dnia 30.08.2017 r. w sprawie zaprzestania od stycznia 2018 r. nieodpłatnej wysyłki czasopisma Postępy Mikrobiologii do członków PTM.**

9) W zamian za zaprzestanie nieodpłatnej wysyłki czasopism PJM i PM członkowie PTM otrzymają od 2018 r. nowy przywilej, tj. możliwość, po zalogowaniu się na stronie PTM, dostępu do najnowszego, bieżącego numeru czasopism PJM i PM. Czyli tylko członkowie PTM, którzy opłacili składki na dany rok, prenumeratorzy, a także członkowie honorowi PTM oraz członkowie wspierający PTM będą mieli dostęp do internetowych wersji najnowszego bieżącego numeru PJM i PM. Pozostałe, starsze numery będą dostępne dla wszystkich osób, także nie należących do PTM. Przypominamy, że przywilejem jest również, iż autorzy korespondencyjni artykułów będący członkami PTM mają zniżkę na opłatę redakcyjną w czasopismach PM i PJM. Członkowie Prezydium jednomyślnie podjęli **Uchwałę nr 31-2017 z dnia 30.08.2017 r. w sprawie ograniczonego dostępu do bieżących najnowszych numerów PJM i PM w internecie, od stycznia 2018 r. Dostęp do bieżących numerów tych czasopism będzie jedynie dla członków PTM z opłaconą na dany rok składką członkowską dla prenumeratorów oraz dla członków honorowych i wspierających PTM. Pozostałe numery czasopism będą ogólnodostępne.** Prace nad wprowadzeniem systemu logowania do strony PTM już trwają i są zaawansowane.

10) Ponadto w zamian za zaprzestanie nieodpłatnej wysyłki czasopism PJM i PM członkowie PTM otrzymają drugi nowy przywilej, tj. członkowie PTM z opłaconą bieżącą składką członkowską biorący udział w konferencjach współorganizowanych przez PTM będą otrzymywać zniżki na opłatę konferencyjną. Tak było na Zjazdach PTM, na tegorocznej Konferencji 90-lat PTM i niedawnej konferencji Mikrobiologia Farmaceutyczna. Wysokość zniżek ustalana zostanie przez komitet organizacyjny danej konferencji w porozumieniu z ZG PTM. Członkowie Prezydium jednomyślnie przyjęli **Uchwałę nr 32-2017 z dnia 30.08.2017 r. w sprawie wprowadzenia zniżki na opłatę konferencyjną dla członków PTM biorących udział w konferencjach współorganizowanych i wspieranych przez PTM, od stycznia 2018 r.**

11) Na ostatnim zebraniu ZG PTM podnoszono sprawę dostępu do środków finansowych PTM przez Oddziały Terenowe. Jak wiadomo główne źródło przychodów PTM to składki członkowskie, z których finansowane jest wydawanie czasopism PM i PJM oraz ich dystrybucja do członków PTM (np. w przypadku dystrybucji PJM do członków PTM konieczna była ponad 50% dopłata Towarzystwa), bieżąca działalność biura PTM i całego Towarzystwa. Składki płacone są nieregularnie i nie są w stanie pokryć kosztów Towarzystwa w dotychczas prowadzonej formie. Stąd poszukiwanie dróg redukcji wydatkowania funduszy poprzez obniżenie kosztów wydawania czasopism. Ponadto poszukujemy dodatkowych źródeł przychodów, jak np. Członków Wspierających PTM. Bardzo słaba jest aktywność Oddziałów Terenowych w pozyskiwaniu dodatkowych środków finansowych, natomiast zgłaszane są potrzeby, stąd propozycja aktywizacji Oddziałów w omawianym obszarze i możliwość pozyskania przez nich środków na swoje cele statutowe. Członkowie Prezydium jednomyślnie przyjęli **Uchwałę nr 33-2017 z dnia 30.08.2017 r. w sprawie udostępnienia Oddziałom Terenowym PTM od stycznia 2018 r., 50% kwoty uzyskanej z tytułu pozyskania sponsora, Członka Wspierającego PTM, darowizny, lub innej dodatkowej kwoty, na rzecz PTM, przez dany Oddział, na pokrycie kosztów prowadzenia działalności statutowej przez ten Oddział.** Uzyskane kwoty rozliczane byłyby przez biuro i księgowość PTM.

12) Jednomyślnie przyjęto **Uchwałę nr 34-2017 z dnia 30.08.2017 r. w sprawie zmiany sekretarki ZG PTM od 01.11.2017 r.**

13) Aby zostać członkiem zwyczajnym PTM trzeba spełnić 2 warunki – a) wypełnić Deklarację Członka Zwyczajnego oraz b) wnieść składkę członkowską za dany rok. Decyzja ZG PTM o przyjęciu kandydata na członka PTM zapada przed lub po wniesieniu opłaty członkowskiej. Po podjęciu ww. decyzji z biura PTM wysyłany jest e-mail do danej osoby z informacją o przyjęciu w poczet członków PTM i prośbą o opłacenie składki rocznej, jeżeli nie została ona dokonana. Okazało się, że szereg osób wypełnia tylko Deklarację członkowską i nie płaci pierwszej składki członkowskiej, ale uważa się za przyjętych do Towarzystwa, bo taką decyzję podjął ZG PTM. W związku z tą

nieprawidłową sytuacją Członkowie Prezydium jednomyślnie podjęli **Uchwałę nr 35-2017 z dnia 12.09.2017 r. w sprawie wprowadzenia poprawki w tekście Deklaracji Członka Zwyczajnego PTM**. W deklaracji zaznaczono: **Pierwsza składka zostanie wpłacona w ciągu 30 dni od otrzymania drogą elektroniczną zawiadomienia o pozytywnej decyzji ZG PTM** oraz, że „ZG PTM rekomenduje na podstawie § 28 statutu Towarzystwa, przyjmując – odmówić przyjęcia – kandydata na członka zwyczajnego Oddziału Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. **Przyjęcie nastąpi po wpłaceniu pierwszej składki członkowskiej**”.

14) Przy okazji organizacji Konferencji 90-lat PTM udało nam się pozyskać 3 nowych Członków Wspierających PTM. Uchwałami Prezydium PTM (**nr 36-2017, nr 37-2017 i nr 38-2017**), jako Członka Wspierającego PTM – srebrnego, przyjęto firmę ECOLAB Sp. z o.o., jako Członka Wspierającego PTM – srebrnego, przyjęto firmę Miejskie Przedsiębiorstwo Wodociągów i kanalizacji S.A. w Krakowie WODOCIĄGI KRAKOWSKIE oraz Członka Wspierającego PTM – zwyczajnego przyjęto firmę MERCK Sp. z o.o.

15) Większością głosów podjęto **Uchwałę nr 39-2017 z dnia 31.10.2017 r., w której wyrażono pozytywną decyzję o objęciu patronatem przez PTM konferencji „Virus of Microbes, 2018” zaplanowanej w dniach 9–13 lipca 2018 r. we Wrocławiu, pod warunkiem uzyskania zniżki 10% (co najmniej 100 zł) na opłatę konferencyjną dla członków PTM**.

16) Wydawanie Polish Journal of Microbiology jest bardzo kosztowne, jakość naukowa szeregu nadsyłanych manuskryptów jest niska. W uzgodnieniu z Redaktorem Naczelnym PJM niezbędne jest wprowadzenie szeregu istotnych zmian w funkcjonowaniu czasopisma. Wycho-
dząc z założenia, że PJM powinno się samofinansować, a ponadto wsłuchując się w głosy delegatów PTM obecnych na Konferencji 90 lat PTM postulujących, aby część środków finansowych PTM udostępnić Oddziałom Terenowym, postanowiono w **Uchwale nr 40-2017 z dnia 31.10.2017 r., przyjętej większością głosów członków Prezydium ZG PTM, aby dla manuskryptów otrzymywanych przez redakcję PJM od 01.07.2018 r. podnieść opłaty redakcyjne za publikację w PJM, odpowiednio: dla autorów korespondencyjnych będących członkami PTM z: 125 USD + 23% VAT do 250 USD + 23% VAT oraz dla pozostałych osób z 250 USD + 23% VAT do 500 USD + 23% VAT**.

17) Ponadto uważamy, że Polish Journal of Microbiology posiada niewykorzystany potencjał naukowy. Proces redakcyjny i wydawniczy prowadzony na wysokim poziomie za pomocą specjalistycznego oprogramowania edytorskiego, połączony z odpowiednią reklamą czasopisma, powinien przynieść wzrost cytowania artykułów PJM i zwiększenie współczynnika Impact Factor. Redakcja PJM korzysta obecnie z firmy edytorskiej Index Copernicus, jednakże współpraca z tą firmą w coraz większym zakresie nie spełnia podstawowych potrzeb i oczekiwań czasopisma, co skutkuje opóźnieniami w procesie wydawniczym i opóźnieniami w publikacji wersji internetowej artykułów. Ponadto Firma edytorska Index Copernicus, z którą źle się współpracuje redakcja PJM, zmienia aktualnie system edytorski, co powoduje bałagan związany z funkcjonowaniem obu systemów edytorskich i widać, że nowy system ma szereg wad. W wyniku rozmów prowadzonych przy współudziale redakcji PJM, z dwiema firmami wydawniczymi, których koszt byłby do zaakceptowania przez PTM, uznano, że firma EXELEY INC. z Nowego Jorku, Stany Zjednoczone, byłaby najbardziej odpowiednia i rokująca nadzieję na poprawę funkcjonowania PJM. **W związku z powyższym jednomyślnie podjęto Uchwałę nr 41-2017 z dnia 31.10.2017 r. w sprawie zmiany firmy edytorskiej umożliwiającej pracę redakcji Polish Journal of Microbiology w profesjonalnym systemie edytorskim oraz wydającej wersję elektroniczną PJM i podpisania umowy na okres 3 lat na wydawanie PJM on-line. Rozmowy z firmą EXELEY INC są zaawansowane i zmierzają do podpisania umowy na nowy system wydawniczy, który byłby uruchomiony od 01.01.2018 r.**

18) Dwaj członkowie PTM otrzymali Granty FEMS na wyjazdy do naukowych ośrodków zagranicznych. Złożone zostały 2 wnioski o granty FEMS dofinansowujące wyjazdy na konferencje naukowe.

19) Podjęliśmy współpracę z Kancelarią Prawną w celu uzyskania opinii odnośnie możliwości powołania Pełnomocników Delegatów na Nadzwyczajne Walne Zgromadzenie Delegatów PTM podczas Konferencji 90 lat PTM. Umożliwiło to uzyskanie *quorum* na Walnym Zgromadzeniu Delegatów wymaganego do wprowadzania zmian w Statucie PTM. Po uzyskaniu wszystkich materiałów z NWZD, z pomocą Kancelarii Prawnej zostanie przygotowany wniosek do sądu (KRS), który zatwierdzi proponowane zmiany Statutu PTM.

20) Bardzo dużo pracy i wysiłku poświęciliśmy na przygotowanie i organizację naszej Konferencji „PTM wczoraj – dziś – jutro”. Odbędzie się ona w dniach 22–23 września 2017 roku w Auditorium Maximum Uniwersytetu Jagiellońskiego. Współorganizatorem Konferencji był Uniwersytet Jagielloński; Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii oraz Katedra Mikrobiologii Wydziału Lekarskiego. Konferencja została zorganizowana z okazji przypadającej w tym roku 90-tej rocznicy powołania Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, 160-lecia urodzin Profesora Odon Bujwida – Ojca mikrobiologii polskiej i twórcy Katedry Higieny na Uniwersytecie Jagiellońskim, a także z okazji 130 rocznicy wygłoszenia przez Profesora na Uniwersytecie Jagiellońskim słynnych „Pięciu odczytów o Bakteryach” uznanych za pierwszy wykład z mikrobiologii i opublikowanych jako pierwszy polski podręcznik mikrobiologii. W konferencji wzięło udział 217 osób, w tym 54 osoby do 35 roku życia, które otrzymały wsparcie finansowe FEMS. Tematyka naukowa Konferencji, wraz z częścią poświęconą historii polskiej mikrobiologii oraz upamiętnieniu działalności i zasług Prof. Odon Bujwida, dała możliwość zaprezentowania współczesnych osiągnięć z różnych dyscyplin mikrobiologii. Odbędzie się sesje wykładowe z zakresu mikrobiologii lekarskiej, weterynaryjnej, przemysłowej, żywności i środowiska. Wyniki badań naukowych były również prezentowane w trakcie sesji plakatowych, na których przedstawiono 148 plakatów. Uczestnicy konferencji otrzymali reprint wygłoszonych wykładów Prof. O. Bujwida, zamieszczonych w publikacji „PIĘĆ ODCZYTÓW O BAKTERYACH Rys ogólnych zasad bakteriologii w zastosowaniu do chorób zakaźnych z dołączeniem uwag o surowicach leczniczych, szczepieniach ochronnych i dezynfekcji z tablicą zdjęć mikro-fotograficznych własnych” wydanie trzecie znacznie poszerzone, opublikowanych w 1907 roku, Skład Główny w księgarni Gebethnera i Sp. Konferencja była także okazją do zaprezentowania działalności i historii 14 terenowych oddziałów PTM.

SEKRETARZ
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów
A. Landy
dr n. farm. Agnieszka E. Landy

PREZES
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów
prof. dr hab. Stefan Tyski

CZŁONKOWIE WSPIERAJĄCY PTM

Członek Wspierający PTM – Złoty
od 27.03.2017 r.



Hygiene & Cleaning
Solutions

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

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

Członek Wspierający PTM – Srebrny
od 07.06.2017 r.



Aesculap Chifa Sp. z o.o.
ul. Tysiąclecia 14, 64-300 Nowy Tomyśl
tel. (61) 44 20 100, fax (61) 44 23 936
www.chifa.com.pl

Aesculap Chifa Sp. z o.o. jest członkiem grupy B. Braun, jednej z wiodących na świecie firm medycznych, produkującej i dystrybuującej między innymi preparaty do antyseptyki rąk, skóry, błon śluzowych, do mycia i dezynfekcji wyrobów medycznych oraz powierzchni.

Członek Wspierający PTM – Srebrny
od 12.09.2017 r.



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

Członek Wspierający PTM – Srebrny



WODOCIĄGI
Krakowskie

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

Członek Wspierający PTM – Zwyczajny
od 12.09.2017 r.



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

SPIS TREŚCI

A. Staniszevska, A. Kunicka-Styczyńska, K. Ziemiński – Zanieczyszczenia mikro-biologiczne podziemnych magazynów gazu i gazociągów	381
P. Mirosław, A. Antos, M. Polak – Zmienność genetyczna wirusa biegunki bydła i choroby błon śluzowych	389
K. Abramczyk, A. Gałązka – Zabójcze drobnoustroje – mikroorganizmy wykorzystywane jako broń biologiczna	395
E. Pawlikowska, D. Kręgiel – Niekonwencjonalne drożdże <i>Metschnikowia pulcherrima</i> i ich zastosowanie w biotechnologii	405
K. Ratajczak, A. Piotrowska-Cyplik – Metabolity bakterii kwasu mlekowego i ich zastosowanie w przemyśle	416
W. Kurzątkowski, J. Kuczerowska – Biosynteza abitybiotyków i metabolitów wtórnych przez wydajne szczepy <i>Streptomyces</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> i <i>Acremonium chrysogenum</i>	422
M. Padzik, E.B. Hendiger, J.P. Szaflik, L. Chomicz – Pełzaki z rodzaju <i>Acanthamoeba</i> – czynniki etiologiczne stanów patologicznych ludzkiego organizmu	429
M. Bartoszewicz, U. Czyżewska – Taksonomia, wirulencja i cykle życiowe <i>Bacillus cereus</i> sensu lato	440
U. Błaszczuk, K. Dąbrowska – Charakterystyka i potencjalne zastosowanie bakteriocyn cyklicznych	451
PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY	
P. Nawrotek, B. Grygorcewicz, A. Augustyniak – Zmiany w taksonomii γ -Proteobacteria, modyfikacja nazwy rzędu <i>Enterobacteriales</i> i nowe rodziny w obrębie <i>Enterobacterales</i> ord. nov.	465
KOMUNIKATY, INFORMACJE	471

CONTENTS

A. Staniszevska, A. Kunicka-Styczyńska, K. Ziemiński – Microbiological contaminations of underground gas storage facilities and natural gas pipelines	381
P. Mirosław, A. Antos, M. Polak – Genetic diversity of bovine diarrhea virus and mucosal disease	389
K. Abramczyk, A. Gałązka – Deadly microbes – microbes used as a biological weapon	395
E. Pawlikowska, D. Kręgiel – Non-conventional yeast <i>Metschnikowia pulcherrima</i> and its application in biotechnology	405
K. Ratajczak, A. Piotrowska-Cyplik – Metabolites of lactic acid bacteria – overview and industrial applications	416
W. Kurzątkowski, J. Kuczerowska – Antibiotic biosynthesis and secondary metabolism in high-yielding strains of <i>Streptomyces</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> and <i>Acremonium chrysogenum</i>	422
M. Padzik, E.B. Hendiger, J.P. Szaflik, L. Chomicz – Amoebae of the genus <i>Acanthamoeba</i> – pathological agents in humans	429
M. Bartoszewicz, U. Czyżewska – Taxonomy, virulence and life cycles of <i>Bacillus cereus</i> sensu lato	440
U. Błaszczuk, K. Dąbrowska – Characteristics and potential applications of circular bacteriocins	451
METHODS AND STANDARDS	
P. Nawrotek, B. Grygorcewicz, A. Augustyniak – Changes in the taxonomy of γ -Proteobacteria, modification of the order <i>Enterobacteriales</i> and novel families within <i>Enterobacterales</i> ord. nov. ...	465
NEW REPORTS, INFORMATION	471

