

Kwartalnik

Tom 45

Zeszyt 1 • 2006

CODEN:

PMKMAV 45 (1)

2006

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Postępy Mikrobiologii

Advances in Microbiology

RADA REDAKCYJNA

JACEK BIELECKI (Uniwersytet Warszawski), MIECZYŚLAW K. BŁASZCZYK (Uniwersytet Rzeszowski),
RYSZARD CHRÓST (Uniwersytet Warszawski), JERZY DŁUGOŃSKI (Uniwersytet Łódzki),
DANUTA DZIERŻANOWSKA (Centrum Zdrowia Dziecka), EUGENIA GOSPODAREK (Akademia Medyczna w Bydgoszczy),
JERZY HREBENDA (Uniwersytet Warszawski), WALERIA HRYNIEWICZ (Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego),
MAREK JAKÓBISIAK (Akademia Medyczna w Warszawie), MIROSŁAW KAŃTOCH (Państwowy Zakład Higieny),
ANDRZEJ PASZEWSKI (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN), ANDRZEJ PIEKAROWICZ (Uniwersytet Warszawski),
ANTONI RÓŻALSKI (Uniwersytet Łódzki), BOHDAN STAROŚCIAK (Akademia Medyczna w Warszawie),
BOGUSŁAW SZEWCZYK (Uniwersytet Gdański), ELŻBIETA TRAFNY (Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii),
STANISŁAWA TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA (Państwowy Zakład Higieny),
GRZEGORZ WĘGRZYN (Uniwersytet Gdański), PIOTR ZIELENKIEWICZ (Uniwersytet Warszawski)

REDAKCJA

JERZY HREBENDA (redaktor naczelny), JACEK BIELECKI (zastępca),
BOHDAN STAROŚCIAK (sekretarz)

Adresy redakcji

Redaktorzy:

Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, tel. (0 22) 554 13 05/304, fax (0 22) 554 14 04
e-mail: j.hrebenda@biol.uw.edu.pl; jbielecki@biol.uw.edu.pl

Sekretarz

Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Akademia Medyczna
ul. Ocзки 3 (parter), 02-007 Warszawa, tel. (0 22) 628 08 22, (0 22) 621 13 51
e-mail: bjstaros@amwaw.edu.pl

CZASOPISMO WYDAWANE Z FINANSOWĄ POMOCĄ KOMITETU BADAŃ NAUKOWYCH

Index Copernicus 3,41 (2005); Pismo indeksowane w EMBASE/Excerpta Medica

Na okładce: Listeria monocytogenes na włóknach naprężeniowych komórek nabłonkowych linii Int 407. SEM LEO, powiększenie 8500× (fot. Jarosław Wiśniewski – Instytut Mikrobiologii i Magda Sobolewska – Pracownia Mikroskopii Elektronowej, Wydział Biologii UW)

Projekt okładki: Jerzy Grzegorkiewicz

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

Nakład 1150 + 15 egz., Objętość 10 arkuszy wyd., Papier offser 80 g

Skład i druk:

Zakład Wydawniczy *Letter Quality*, 01-216 Warszawa, Bryłowska 35/38,



Anna Jadwiga Podhajska

1938–2006

lekarz, profesor biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego,
specjalista w dziedzinie mikrobiologii,
biologii molekularnej oraz inżynierii genetycznej

W dniu 05.02.2006 roku odeszła od nas Profesor Anna Podhajska, wspaniały człowiek i wychowawca wielu roczników mikrobiologów i biologów molekularnych. Anna, częściej zwana przez nas Jagodą, całe swoje życie związała z Trójmiastem. Ukończyła studia na Wydziale Lekarskim AMG i od 1965 roku rozpoczęła pracę zawodową w Katedrze Mikrobiologii AMG. W 1968 roku obroniła doktorat i uzyskała specjalizację z zakresu mikrobiologii lekarskiej. W 1987 roku habilitowała się na Wydziale Lekarskim AMG, a w 1996 roku otrzymała tytuł profesora. Niemalże od początku istnienia Uniwersytetu Gdańskiego tworzyła Wydział Biologii i Nauk o Ziemi pracując najpierw w Katedrze Biochemii kierowanej przez Profesora Karola Taylora, a później kierując Zakładem Mikrobiologii. Jednostką tą, przekształconą później w Katedrę Mikrobiologii, kierowała do 1996 roku. Od początku lat siedemdziesiątych Jagoda bardzo ściśle współpracowała z Profesorem Wacławem Szybalskim z Uniwersytetu Wisconsin w Madison. W ciągu kilkunastu lat odbyła wielokrotne staże naukowe w tym laboratorium, co zaowocowało wieloma znaczącymi publikacjami, ale również ideą utworzenia unikalnego Wydziału Biotechnologii łączącego uczelnie Wybrzeża. Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Akademii Medycznej w Gdańsku powstał ostatecznie w 1993 roku, przede wszystkim dzięki tytanicznej pracy Jagody i Profesora Karola Taylora. Zasady studiowania na Wydziale były inne niż te, które były dotychczas regułą na uczelniach; zostały wprowadzone zmiany, które dopiero kilka, a nawet kilkanaście lat później pojawiły się w innych szkołach wyższych. Od samego początku istnienia Wydziału obowiązywał system kredytowy, studenci mieli możliwość wyboru

wielu przedmiotów oferowanych na innych uczelniach, jednym z ważnych kryteriów doboru studentów była biegła znajomość języka obcego. Pasją Jagody było kształcenie studentów w zakresie najnowszych technik badawczych opartych o inżynierię genetyczną i biologię molekularną. Od 1994 roku organizowała dla studentów Letnie Szkoły Biotechnologii, na które zapraszani byli najwybitniejsi przedstawiciele światowej nauki. Dzięki tym działaniom absolwenci Wydziału Biotechnologii z łatwością znajdowali zatrudnienie w kraju i za granicą.

Od 1996 roku Jagoda rozpoczęła tworzenie od podstaw Katedry Biotechnologii na naszym Wydziale. Katedrą kierowała do końca swojej aktywności zawodowej. Objęcie kierownictwa tej właśnie Katedry wynikało z wielkiej pasji Jagody do upowszechniania i komercjalizacji wyników naukowych. Dzięki jej zaangażowaniu doszło do utworzenia w Gdańsku Centrum Transferu Technologii, a w Gdyni Pomorskiego Parku Naukowo-Technologicznego. Konieczność przenoszenia wyników badań do firm biotechnologicznych propagowała również na forum międzynarodowym. Była wiceprezydentem Stowarzyszenia Scanbałt powołanego przez uczelnie wyższe i firmy biotechnologiczne zlokalizowane w basenie Morza Bałtyckiego w celu prowadzenia wspólnych badań i wdrażania nowoczesnych technologii.

Jagoda była wybitnym naukowcem i nauczycielem akademickim. Opublikowała kilkadziesiąt prac naukowych, wiele z nich w czasopismach zagranicznych o najwyższym poziomie. Wypromowała prawie 100 magistrantów i około 20 doktorów; czterech z nich zostało profesorami. Swoje liczne kontakty zagraniczne wykorzystywała między innymi do kierowania swoich

współpracowników na staże naukowe do czołowych amerykańskich i europejskich ośrodkach naukowych. Jej pasję i rolę w tworzeniu i popularyzacji nauki doceniły również różne organizacje społeczne, między innymi nominując do bardzo prestiżowej nagrody Women in Science.

To pożegnanie nie byłoby pełne gdybyśmy nie poświęcili kilku zdań Jagodzie – niesłychanie wrażliwemu i dobremu człowiekowi. Wierzyła w ludzi, w ich wewnętrzną dobroć. Pomagała nam wszystkim, szczególnie jeśli ktoś z nas był nieszczęśliwy, chory lub w inny sposób poszkodowany przez los. Większość z nas

będzie to zawsze pamiętała. Jagoda kochała nie tylko ludzi, kochała też zwierzęta. Jej dom był zawsze pełen przygarniętych uratowanych zwierząt. Bezdomne psy, koty (ale zdarzały się też – okaleczony jeź, gołąb czy mewa) znajdowały trwały lub czasowy azyl w jej domu.

Taką będziemy Ciebie pamiętać – doskonałego naukowca i organizatora nauki, ale również wspańskiego człowieka pomagającego innym, nawet wtedy kiedy to Ty potrzebowałaś tej pomocy najbardziej. Żegnaj Jagodo.

Pracownicy Wydziału Biotechnologii UG-AMG

5-tego lutego 2006 r. po długotrwałej i bardzo ciężkiej chorobie zmarła prof. dr hab. Anna Jadwiga Podhajska, mikrobiolog, profesor Uniwersytetu Gdańskiego. Śp Pani Profesor współpracowała z Redakcją *Postępów Mikrobiologii* jako Autor, Recenzent oraz Doradca.

Dzięki jej staraniom mogliśmy w 1994 r. jako jedyni w kraju wydrukować w przekładzie na język polski materiały z jubileuszowego Sympozjum COGENE pt. *From the Double Helix to the Human Genome: 40 Years of Molecular Genetics*. Sympozjum pod auspicjami UNESCO odbyło się w Paryżu w kwietniu 1993 roku.

Podziwialiśmy prof. A. Podhajska za Jej niezwykłą wiedzę, mądrość, życzliwość oraz optymizm. Teraz brak nam jej będzie

*Za Redakcję
Jerzy Hrebenda*

Mirosława Włodarczyk, Dorota Giersz

Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-926 Warszawa, e-mail: miraw@biol.uw.edu.pl

Wpłynęło w lutym 2006

1. Wprowadzenie – plazmidy jako pozachromosomowe elementy genetyczne. 2. Plazmidy liniowe – ogólna charakterystyka. 3. Struktura bakteryjnych plazmidów liniowych/typy zakończeń cząsteczki. 3.1. Plazmidy liniowe o kowalencyjnie zamkniętych końcach/struktura szpilki do włosów. 3.2. Plazmidy liniowe o telomerach połączonych z białkami terminalnymi. 4. Replikacja plazmidów liniowych. 4.1. Replikacja plazmidów zakończonych strukturą szpilki do włosów. 4.2 Replikacja plazmidów niosących TP w porównaniu do innych inwertronów. 5. Mechanizmy stabilizujące. 6. Geny zlokalizowane na plazmidach liniowych nie związane z funkcjami „maintenance”. 6.1. Geny identyfikowane na replikonach liniowych z zakończeniami typu szpilki do włosów. 6.2. Cechy kodowane przez geny plazmidów z przyłączonymi TP 7. Pochodzenie i ewolucja bakteryjnych plazmidów liniowych. 7.1. Ewolucja i rearanżacje plazmidów typu inwertronu. 7.2. Pochodzenie i zmiany genetyczne plazmidów o zakończeniach typu szpilki do włosów. Podsumowanie

Linear plasmids in bacteria

Abstract: Although the majority of bacterial plasmids exist as circular DNA molecules, plasmids naturally occurring in linear form have been discovered. There are two known types of linear plasmids: the first one contains plasmids with protein attached to the 5' end of the DNA molecule, and the other type consists of plasmids with covalently closed (hairpin-type) ends. Plasmids with attached terminal proteins belong to the group of invertebrates. Usually they encode phenotypic traits advantageous for their bacterial host, e.g. degradation of xenobiotics, heavy metal resistance, production of antibiotics. The hairpin-type plasmids are common genetic elements in pathogenic *Borrelia* spirochetes, in which they play an essential role in hiding from the host immunological response. This review deal with such topics as the structure of linear plasmids (including prophage/plasmid genomes), replication and stable inheritance mechanisms, phenotypic traits encoded by them. Some theories concerning their possible origin, evolution and genetic rearrangements are also discussed.

1. Introduction – plasmids as an extrachromosomal genetic elements. 2. Linear plasmids; general characterization. 3. Structure of bacterial linear plasmids/types of plasmid particle terminus. 3.1. Linear plasmids with covalently closed ends/hairpin structure. 3.2. Linear plasmids with telomers carrying terminal proteins. 4. Linear plasmids replication. 4.1. Replication of plasmids with hairpin structure. 4.2. Replication of plasmids with terminal proteins comparing to other types of invertebrates. 5. Stable inheritance mechanisms. 6. Genes localized on linear plasmids – other than required for maintenance functions. 6.1. Genes identified on linear replicons with hairpin terminus structure. 6.2. Phenotypic traits encoded by plasmids carrying terminal proteins. 7. Origin and evolution of bacterial plasmids. 7.1. Evolution and genetic rearrangements of invertebrate-type linear plasmids. 7.2. Origin and genetic instability of plasmids with hairpin structures. 8. Summary

Słowa kluczowe: Białko terminalne (TP), inwertron, plazmid, plazmid liniowy, telomer
Keywords: Linear plasmid, invertebrate, plasmid, telomere, terminal protein (TP)

1. Wprowadzenie – plazmidy jako pozachromosomowe elementy genetyczne

Jakkolwiek informacja zawarta w chromosomie komórki prokariotycznej jest wystarczająca do pełnienia podstawowych funkcji życiowych, to w komórce znajdować się mogą dodatkowe elementy genetyczne, które nadają jej w specyficznych (odmiennych niż typowe dla niej) warunkach przewagę selekcyjną na komórkę bezplazmidową i warunkują wtedy jej przeżycie. Takie pozachromosomowe cząsteczki DNA zdolne do autonomicznego powielania, utrzymywania i przenoszenia się z komórki do komórki, określane są terminem **plazmidy**. Stanowią one pulę dodatkowej informacji genetycznej o znacznym, szczególnie w przy-

padku dużych lub wielokopiowych plazmidów, udziale procentowym wobec całkowitego DNA komórkowego. Jednocześnie charakteryzują się zdolnością do ulegania dynamicznym przemianom oraz do efektywnego transferu horyzontalnego. Elementy genetyczne spełniające powyższą definicję plazmidów występują także u eukariotów, w tym przypadku należy jednak dodatkowo zaznaczyć, że do tej grupy nie zaliczamy genomów/chromosomów organelli komórkowych (np. mitochondriów czy chloroplastów).

Plazmidy u bakterii odkryto we wczesnych latach pięćdziesiątych dwudziestego wieku w eksperymentach z zakresu „klasycznej genetyki bakterii”, co podsumowują retrospektywne prace L e d e r b e r g a [39] i H e l i n s k i e g o [25]. Fizyczną obecność cząsteczki

DNA plazmidowego w komórce bakteryjnej wykazano na początku lat 60., dzięki wykorzystaniu metody ultrawirowania w gradiencie gęstości chlorku cezu z bromkiem etydydy opracowanej przez zespół V i n o g r a d a i wykorzystywanej uprzednio do izolacji genomów mitochondrialnych [32, 58].

Plazmidy to cząsteczki dwuniciowego DNA, najczęściej o strukturze kowalennie zamkniętego koła (cccDNA – ang. covalently closed circle). Mniej liczną grupę stanowią plazmidy liniowe, występujące u niektórych grup prokariotów i eukariotów. Wielkość plazmidów waha się w granicach od 1 kbp (tysiąca par zasad) do 2000 kbp – te największe, tzw. megaplazmidy mogą przewyższać rozmiarem niektóre chromosomy bakteryjne [84]. Małe plazmidy często zawierają tylko informację niezbędną do replikacji własnej cząsteczki i zapewniającą jej stabilność, podczas gdy duże plazmidy kodują zazwyczaj systemy warunkujące zdolność do koniugacji i oraz niosą geny odpowiedzialne za różnorodne cechy metaboliczne lub fizjologiczne [82].

2. Plazmidy liniowe – ogólna charakterystyka

Plazmidy liniowe spotyka się w zarówno w gatunkach bakterii Gram-dodatnich (z rodzajów *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Clavibacter*, *Lactobacillus*,) oraz u Gram-ujemnych z rodzajów *Borrelia*, *Xantobacter*, *Klebsiella* [36, 41, 47, 53, 54, 71, 83], rzadziej u archeonów [42, 48]. Elementy genetyczne typu liniowych plazmidów znaleziono także u organizmów eukariotycznych, szczególnie często spotykane są u drożdży [18] i grzybów nitkowatych [22], ale także u roślin wyższych (*Brassica*, *Zea*, *Sorghum*). Plazmidom eukariotycznym poświęcony jest artykuł przeglądowy Leśniewicza [40]. Ta forma plazmidów odkryta została stosunkowo późno w porównaniu do kolistych plazmidów – bo dopiero w latach osiemdziesiątych ubiegłego wieku. Pierwszy bakteryjny plazmid liniowy wyizolowany został ze *Streptomyces rochei* w 1979 r. [24]. Opóźnienie to było wynikiem tego, iż powszechnie stosowane metody identyfikacji i oczyszczania plazmidów oparte na technice lizy komórek w warunkach wysokiego pH, np. metoda B i r n b o i m i D o l l y [5] i jej modyfikacje, preferują identyfikację form kolistych. Plazmidy liniowe podczas takiej preparatyki ulegają nieodwracalnej denaturacji, podczas gdy formy dwuniciowego DNA, zwłaszcza nieduże, po obniżeniu pH łatwo renaturują powracając do formy natywnej, dzięki czemu mogą zostać uwidocznione w wyniku bezpośredniej analizy elektroforetycznej lizatu jak i być oczyszczone metodą ultrawirowania w gradiencie CsCl z bromkiem etydydy lub z zastosowaniem komercyjnych zestawów do oczyszczania plazmidów kolistych. Ponadto stosowane, dość

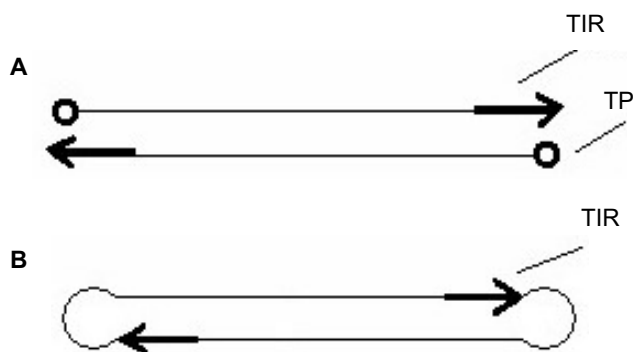
zróżnicowane metody odbiałczania lizatów komórkowych mogły prowadzić do niekontrolowanej utraty frakcji DNA zawierającej liniowe plazmidy, lub w pewnych przypadkach uniemożliwiać ich wnikanie do żeli agarozowych. Poznanie kolejnych plazmidów liniowych umożliwiło upowszechnienie techniki elektroforezy typu PFGE, która pozwala stosunkowo łatwo odróżnić formy liniowe DNA od kolistych. Wciąż jednak jest to forma plazmidu trudna do uzyskania w czystej postaci inną techniką niż eluowanie z żelu agarozowego, co z kolei w przypadku dużych cząsteczek jest procedura mało wydajną.

Analiza strukturalna oraz badanie mechanizmów replikacji i stabilnego utrzymywania (ang. maintenance) plazmidów liniowych pozwoliła zaobserwować, że wykazują one istotne podobieństwo do występującej w komórkach bakteryjnych autonomicznej (profagowej) postaci niektórych bakteriofagów, czego modelowym przykładem może być bakteriofag N15 [65]. Podobieństwo profagowej formy genomu N15 i „prawdziwych” liniowych plazmidów o kowalennie zamkniętych końcach (patrz poniżej) jest na tyle znaczące, że w artykułach publikowanych w renomowanych czasopismach stosowany jest termin „N15 prophage plasmid” lub wręcz „N15 linear plasmid” na określenie profagowej formy genomu faga N15 [59, 60, 62, 65, 71]. W niniejszej pracy stosowany będzie termin profag/plazmid w przypadkach odnoszących się do sytuacji, kiedy to bakteriofag w formie lizogennej występuje w komórce w postaci analogicznej do liniowego plazmidu (imitującej liniowy plazmid), a służy jako model ilustrujący zdarzenia wspólne dla obu typów tych elementów genetycznych.

3. Struktura bakteryjnych plazmidów liniowych/typy zakończeń cząsteczki

Wspólną cechą wszystkich bakteryjnych plazmidów liniowych jest posiadanie na końcach cząsteczki odwróconych powtórzeń sekwencji DNA (ang. terminal inverted repeats – oznaczane jako TIR lub ITR), co oznacza, że sekwencja nukleotydowa jednego końca powtarza się w odwrotnej orientacji na przeciwnym końcu. Długość TIR jest różna u różnych plazmidów liniowych, a takie zakończenia liniowego replikonu prokariotycznego podobnie jak w przypadku liniowych chromosomów eukariotycznych przyjęto nazywać telomerami.

Wśród plazmidów liniowych wyróżnia się dwa typy budowy zakończeń cząsteczki: 1) cząsteczka liniowa ma końce kowalencyjnie zamknięte i tworzące symetryczne struktury tzw. szpilki do włosów (ang. hairpin loop); 2) końcowe fragmenty cząsteczki (telomery) połączone są z białkiem, związanym kowalencyjnie



Rys. 1. Struktura plazmidów liniowych

(A) Plazmidy o końcach 5' połączonych z białkami terminalnymi

(B) Plazmidy o kowalencyjnie zamkniętych końcach

z 5'końcem nici DNA, noszącym nazwę białka terminalnego (ang. terminal protein, TP).

3.1. Bakteryjne plazmidy liniowe o kowalencyjnie zamkniętych końcach/struktura szpilki do włosów

Plazmid liniowy o kowalencyjnie zamkniętych końcach to w istocie jedna kolistą zamkniętą nić DNA wykazująca wysoki poziom wewnętrznej homologii, co powoduje, że w wyniku parowania komplementarnych zasad przyjmuje ona postać liniowej dwuniciowej (spłaszczonej) struktury z jedynie kilkunukleotydowymi pętlami na końcach (patrz rys. 1b). Tego typu drugorzędowa struktura cząsteczki DNA (dwuniciowy trzonek i jednoniciowa pętla) jest formą określaną zazwyczaj jako szpilka do włosów (ang. hairpin-loop), co powoduje że plazmidy tego rodzaju nazywane są także plazmidami o końcach typu szpilki do włosów. Plazmidy liniowe o opisanym strukturze wykryto wyłącznie u bakterii Gram-ujemnych, szczególnie szeroko rozpowszechnione są u krętków z rodzaju *Borrelia*. Rzadko spotyka się je u innych gatunków z tej grupy, wykryto je np. u *Klebsiella pneumoniae* [41] i *Xanthobacter* sp.[36] i jak niektórzy autorzy podają u *Escherichia coli* [np. 61]. W przypadku *E. coli* mamy jednak do czynienia ze wspomnianą wyżej liniową formą genomu profaga N15 opisaną przez Rybchina [65], czyli zgodnie z przyjętą zasadą profago/plazmidem N15. Należy zaznaczyć, że liniowy DNA profago/plazmidu N15 ma inną strukturę niż liniowy genom faga zawarty w główce fagowej. Sposób przekształcenia formy „dzikiej” genomu w formę profaga/plazmidu jest opisany w rozdziale 4.1. Analogiczną do N15 budową charakteryzują się także formy profagowe faga PY54 z *Yersinia enterocolitica* i Φ KO2 z *Klebsiella oxytoca* [7, 26]; chociaż pierwotnie Φ KO2 z *K. oxytoca* pod nazwą pKO2 uważany był za typowy plazmid liniowy [73].

U krętków z rodzaju *Borrelia* liniowe formy DNA spotykane są tak powszechnie, że kolisty DNA stanowi mniejszość całkowitego DNA w komórce, a niektóre

gatunki, np. *B. anserina*, *B. parkeri* i *B. duttoni*, patogeny wywołujące gorączkę powrotną (ang. relapsing fever), zawierają wyłącznie DNA o liniowej strukturze. Wszystkie badane gatunki z rodzaju *Borrelia* zawierają liniowy chromosom o wielkości około 1000 kbp, natomiast ich (zwykle liczne) plazmidy mogą mieć formę liniową bądź kolistą o wielkości w zakresie od 5 do ponad 200 kbp. Na przykład, wywołująca boreliozę (ang. Lyme disease) *Borrelia burgdorferi* zawiera genom składający się z liniowego chromosomu o długości 910 kbp oraz z 21 plazmidów, z których 12 to plazmidy liniowe, a 9 kolisty. Tak duża zawartość liniowych cząsteczek DNA zwiększa potencjał rekombinacyjny bakterii, a co za tym idzie genetyczną różnorodność wśród opisywanych patogenów. W dalszej części wyjaśnione zostanie, w jaki sposób bakterie „wykorzystują” tę możliwość genetycznej zmienności.

Wszystkie liniowe plazmidy u *Borrelia*, a także chromosom *B. burgdorferi* charakteryzują się obecnością końców cząsteczki (telomerów) o specyficznej budowie w postaci kowalencyjnie zamkniętych struktur typu szpilki do włosów. Najwięcej badań przeprowadzono na modelu plazmidu liniowego o długości 16 kbp (p116) [27]. Na każdym z końców plazmidu dwie nici DNA łączą się w perfekcyjnie palindromiczną, bogatą w pary AT strukturę szpilki do włosów. Lewy i prawy telomer tego plazmidu stanowi odwrócona sekwencja o długości 19 par nukleotydów z których 16 jest identycznych w obu telomerach Z kolei telomery identyczne do jednego z telomerów plazmidu 16 kbp obecne są w liniowym plazmidzie o wielkości 46 kbp. Wspomniany powyżej profago/plazmid N15 posiada palindromiczne, terminalne struktury szpilek do włosów na obu końcach cząsteczki, których pętle utworzone są przez co najmniej 4 niesparowane nukleotydy, a TIR ma długość 28 pz [44].

Plazmidy o podobnej budowie telomerów zidentyfikowano także w komórkach eukariotycznych, np.: w mitochondriach drożdży *Pichia* i patogennego dla roślin grzyba *Rhizoctonia solani*; budowę taką mają też genomy zwierzęcych pokswirusów, wirusa ASFV – wirusa afrykańskiej gorączki świń (ang. African swine fever virus). Co ciekawe, w wielu telomerach tych różnych elementów genetycznych znaleziono wspólny motyw o długości 6 par zasad [27].

3.2. Plazmidy liniowe o telomerach połączonych z białkami terminalnymi

Plazmidy, których końce cząsteczki DNA połączone są z białkami terminalnymi stanowią większą liczebnie grupę wśród plazmidów liniowych. Występują one przede wszystkim u przedstawicieli rzędu *Actinomycetales* (rodzaj *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*). Wielkość plazmidów liniowych tej grupy

jest znacznie zróżnicowana, np. u *Streptomyces* wynosi od 12 kpz do kilkuset kpz, (pKSL ze *S. lasaliensis* ma wielkość 520 kpz) [54]. Plazmidy te charakteryzują się oczywiście obecnością odwróconych terminalnych powtórzeń (TIR), lecz wyróżniająca je cechą jest obecność na obu końcach cząsteczki białek terminalnych (TP) połączonych kowalencyjnie z końcem 5' nici DNA [29]. Długość terminalnych powtórzeń jest bardzo zróżnicowana i wynosi od kilkudziesięciu do kilkuset par zasad, np 44 pz w plazmidzie pSLP2 (50 kpz) ze *S. lividans* do 9500 par zasad w plazmidzie pPZG101 (387 kpz) ze *S. rimosus*; którego liniowy chromosom ma długość 8 000 kpz i niesie TIR o długości 550 kpz [50]. Jednak najdłuższe znane terminalne odwrócone powtórzenia to TIRy o długości 1 Mb zidentyfikowane w chromosomie *S. coelicolor* A3(2) – 9,7 Mb [81]. Nie jest obserwowana korelacja między długością TIR a wielkością plazmidu. Na przykład, plazmid pCLP (25 kpz) z *Mycobacterium celatum* ma TIRy o długości 45 par zasad, a mniejsze od niego plazmidy pSLA2 (17 kpz) z *S. rochei* i pSCL1 (12 kpz) z *S. clavuligerus* mają TIR o długości odpowiednio 614 i 900 par zasad [54]. Zróżnicowaniu długości TIR-ów towarzyszy wysoki poziom polimorfizmu ich sekwencji, nawet w blisko spokrewnionych gatunkach. Często homologia sekwencji TIR liniowych replikonów w pokrewnych gatunkach *Streptomyces* dotyczy tylko niewielkich końcowych fragmentów, z czego wynika brak ich krzyżowej hybrydyzacji [17]. Czasem, mamy ponadto do czynienia z tzw. przerywanymi regionami homologii odwróconych sekwencji lokujących się w sąsiedztwie „głównych” terminalnych powtórzeń – tak jest na przykład we wspomnianym wyżej plazmidzie pSLA2, który oprócz „klasycznych” 614 nukleotydowych terminalnych odwróconych powtórzeń, ma w ich sąsiedztwie 11 odwróconych powtórzeń o długości 5 do 17 p.z. przerywanych krótkimi regionami (nawet tylko 3 pary zasad) niehomologicznymi [54].

Podczas gdy telomery liniowych plazmidów były intensywnie badane, prace dotyczące molekularnej charakterystyki **białek terminalnych** liniowych plazmidów bakteryjnych zaczęły pojawiać się dopiero w ostatnim pięcioleciu. Obecność TP kowalencyjnie związanych z telomerami była stwierdzona oczywiście dużo wcześniej [29], przy zastosowaniu różnego typu technik eksperymentalnych, między innymi na podstawie opóźnienia (lub wręcz uniemożliwienia) migracji w żelu agarozowym podczas elektroforezy tychże cząsteczek, o ile nie zastosowano wcześniejszego ich traktowania czynnikami proteolitycznymi lub łagodnej denaturacji alkalicznej, niewrażliwości na trawienie egzonukleazami oraz zdolności wiązania się z perełkami szklanymi (ang. glass beads binding) w warunkach charakterystycznych dla kompleksów DNA-białko [72, 77, 86]. To „nowe” zainteresowanie się białkami

terminalnymi liniowych replikonów (chromosomów i plazmidów) promieniowców nastąpiło po wykazaniu, iż mimo ogólnego podobieństwa telomerów tej grupy liniowych replikonów do telomerów adenowirusów i niektórych bakteriofagów (np. Φ 29 *Bacillus subtilis*), ich funkcja musi być odmienna, gdyż w odróżnieniu od wymienionych genomów wirusowych replikacja ich cząsteczki zaczyna się od centralnie, a nie terminalnie usytuowanego punktu początkowego [10] (szczegóły w rozdziale o replikacji). Seria prac z laboratorium C o h e n a oraz Y a n g a [1, 2, 28, 86] dostarczyły wielu nowych, ciekawych informacji o TP z liniowych replikonów w rodzaju *Streptomyces*. Badacze ci zidentyfikowali szereg genów (*tpg* – od ang. terminal proteins genes) kodujących białka terminalne w chromosomie *S. coelicolor* (*tpgC*), chromosomie i plazmidach (100 kpz i 206 kpz) *S. rochei* (*tpgR1*, *tpgR2* i *tpgR3*), chromosomie *S. lividans* (*tpgL*) i plazmidzie pSLA22 *S. lividans*, sklonowali je i oznaczyli sekwencje nukleotydowe, a dla niektórych także sekwencje aminokwasowe metodą spektrometrii masowej. Stwierdzono, że badane białka terminalne (w pracy Y a n g a i wsp. z 2002 r. [86] porównywano 7 homologów) liniowych genomów ze *Streptomyces* stanowią grupę odróżniającą się od białek bakteriofagowych (np. Φ 29, PRD1, Nf), adenowirusowych oraz pochodzących z plazmidów eukariotycznych wielkością i cechami sekwencji aminokwasowej. Są one najmniejsze (około 185 aminokwasów), podczas gdy największe, adenowirusowe TP liczą nawet ponad 600 aminokwasów. Uważa się, że jedna z domen o strukturze β -kartki bierze udział w agregacji białek Tp i/lub wiązaniu do błony komórkowej (co tłumaczyłoby utrudnienia ich migracji w żelu). Białka TP zawierają też domenę z motywem helisa-skret-helisa charakterystycznym dla białek wiążących DNA. Domena ta wykazuje 54% podobieństwa i 27% identyczności z odwrotną transkryptazą wirusa HIV [86] Różne grupy białek terminalnych nie wykazują też homologii sekwencji, a ponadto reszta aminokwasowa, poprzez którą łączą się wiązaniem fosfodwuestrowym z DNA to zawsze seryna, co tłumaczy charakterystyczną labilność wiązania w lekko alkalicznych warunkach. Cytowane badania potwierdziły też, że białko jest związane z 5'końcem nici DNA, co tłumaczy podatność cząsteczki na trawienie 3' egzonukleazami, podczas gdy chroniony białkiem koniec 5' jest niepodatny na działanie 5' egzonukleaz. Funkcje białek terminalnych będą omówione w rozdziale o replikacji – w każdym razie białka terminalne plazmidów promieniowców nie uczestniczą w procesie inicjacji replikacji w centralnie ulokowanym punkcie *oriV*, a inicjują jedynie syntezę potrzebną do wypełnienia „niedoreplikowanych” końców cząsteczki. Uznano je więc za nową klasę białek inicjacji replikacji (ang. priming proteins). [1, 86]. W komórkach *Streptomyces* stwierdzono występowanie

pseudo-kolistych form plazmidów liniowych, które, jak postuluje S a k a g u c h i [66] mogą odgrywać rolę w replikacji, integracji i wycinaniu pewnych inwertronów. W powstawaniu tych form, zwanych formą rakiety tenisowej (ang. racket-frame form), uczestniczą także białka terminalne „wspomagane” przez grupę dodatkowych białek zestawiających (ang. juxtaposing proteins) łączących się z drugorzędowymi strukturami w obrębie TIR, a następnie oddziałującymi między sobą w rejonie trzonka rakiety zestawiając 2 dwuniciowe odcinki DNA [66, 86].

Opisywany typ bakteryjnych liniowych plazmidów wraz z innymi liniowymi replikonami o podobnie zbudowanych telomerach (w tym liniowe plazmidy eukariotyczne, genomy adenowirusów i niektórych bakteriofagów; np. Φ 29 z *Bacillus subtilis*, HB-3 ze *Streptococcus pneumoniae*, czy PRD1 z *E. coli* [20, 74] oraz wiele pro- i eukariotycznych elementów transpozycyjnych) zaklasyfikowano do grupy elementów genetycznych, które S a k a g u c h i określił w roku 1990 terminem **inwertrony** [66]. Podobieństwo struktury nie obejmuje obecności terminalnych białek w elementach transpozycyjnych, których dotychczas nie zidentyfikowano w formie wolnej (czyli niezintegrowanej z jakimś komórkowym replikonem). Poza podobnym schematem struktury inwertrony wykazują istotne podobieństwa funkcjonalne, w tym zdolność łatwego ulegania rearanżacjom genetycznym.

4. Replikacja plazmidów liniowych

Podstawowym problemem pojawiającym się przy replikacji genomów liniowych jest skracanie końców 5' podczas procesu prowadzonego przez powszechnie występujące polimerazy DNA. Organizmy eukariotyczne zapobiegają temu wydłużając końce DNA za pomocą telomerazy, dobudowującej wiele kopii identycznych sekwencji DNA na końcu liniowego genomu. Komórki prokariotyczne tego problemu zwykle nie mają, gdyż ich DNA jest najczęściej cząsteczką kolistą. Podobieństwa między rejonami replikacyjnymi plazmidów liniowych do tych z replikonów kolistych nasunęło przypuszczenie, że liniowe cząsteczki mogą się replikować w formie cyrkularnej, i tak się dzieje z plazmidami liniowymi (obu typów) sztucznie pozbawionymi telomerów. W plazmidach z *B. burgdorferi* zarówno plazmidy liniowe jak i kolisty niosą zestawy genów należących do pięciu tzw. rodzin paralogicznych genów (ang. paralogous gen families, PGF), które związane są z replikacją i stabilnym utrzymywaniem plazmidu w komórce [64]. PGF obecne są we wszystkich plazmidach *B. burgdorferi* i są zwykle zlokalizowane w centralnej części plazmidu. Wykazano, że rejon PGF zdolne są do inicjowania replikacji niezależnie od formy plazmidu.

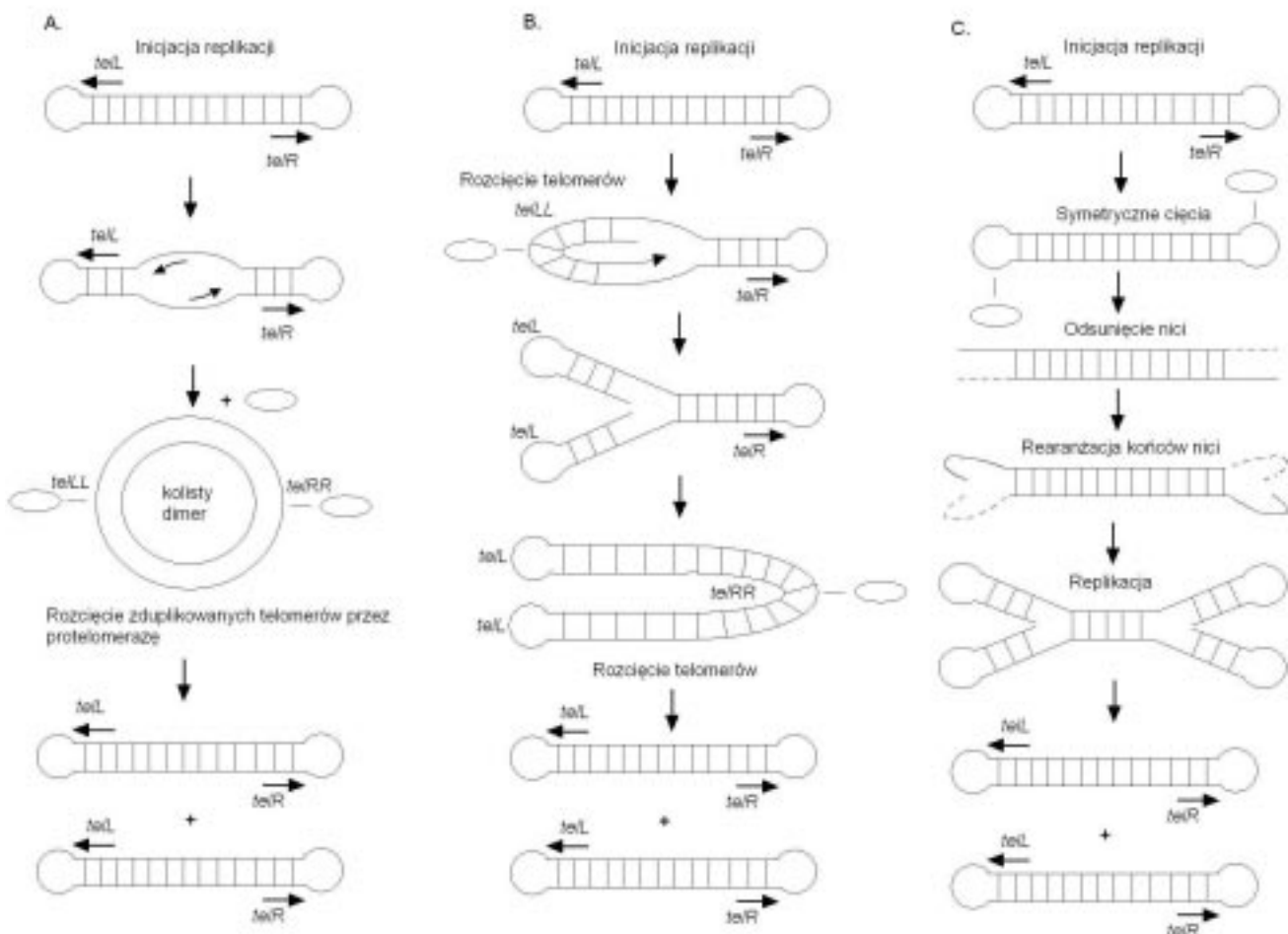
4.1. Replikacja plazmidów zakończonych strukturą szpilki do włosów

Jako model podczas opisywania replikacji liniowych plazmidów prokariotycznych o kowalencyjnie zamkniętych końcach służy zazwyczaj mechanizm replikacji profaga/plazmidu N15 z *E. coli* [43]. Genom faga N15 nie integruje w chromosom bakteryjny, ale podczas stanu lizogenii utrzymuje się w komórce w postaci liniowej cząsteczki DNA z kowalencyjnie zamkniętymi telomerami typu szpilki do włosów imitującej plazmid. Forma ta powstaje, gdy podczas infekcji komórki bakteryjnej genom faga N15 ulega najpierw cyrkularyzacji w wyniku ligacji lepkich końców *cosL* i *cosR* a następnie przecięciu tej kolistej formy w miejscu *telL/R*. Otrzymane w ten sposób wolne końce zostają kowalencyjnie zamknięte, tworząc liniową cząsteczkę DNA (profaga/plazmidu) o końcach typu szpilki do włosów. Reakcję przecięcia i zamykania końców katalizuje produkt genu *telN*, lekko kwasowe białko **TelN** o masie 72,2 kDa, którego celem działania białka jest sekwencja *telR/L* o długości 56 pz [61]. Gen *telN* zlokalizowany jest blisko sekwencji rozpoznawanej przez swój produkt, co prawdopodobnie zapobiegać ma ich rozdzieleniu podczas rekombinacji. Centralny palindrom sekwencji *telR/L* nosi nazwę *telO* i ma długość 22 pz [14]. Otaczających go sekwencji, odwróconych powtórzeń GATCCA i sekwencji *tos* (*tosL1/2/3-tosR1/2/3*) rejon *telO* oddzielony jest przez 3 pz z każdej strony. TelN przecina zreplikowane rejonu telomerowe kolistych dimerów i katalizuje tworzenie wiązań kowalencyjnych między końcami liniowych nici DNA. Zarówno w tym przypadku, jak i u plazmidów z *Borrelia*, odtwarzanie struktury liniowej zależy od sekwencji nukleotydowej telomerów plazmidowych. Sekwencje te są homologiczne u wspomnianych plazmidów i w chromosomach liniowych z *Borrelia*, identyczny fragment heksanukleotydowy, TATAAT, występuje również przy końcach cząsteczek DNA wirusa ASFV i wirusa ospy, które także posiadają telomery zamknięte kowalencyjnie (dla wyjaśnienia: proces rozcinania telomerów, przecinania i ponownego łączenia DNA z wytworzeniem końców typu szpilki do włosów zachodzi, poza profagiem/plazmidem N15 i plazmidami z *Borrelia*, także u pokswirusów). Białko TelN, a także homologiczne białko ResT, produkt genu oznaczonego symbolem BBB03, pochodzącego z kolistego plazmidu *B. burgdorferi* o analogicznej funkcji rozcinającej dwuniciowy DNA w miejscu *telL/R* i zamykającej wolne końce, zalicza się do grupy białek zwanych **protelomerazami** (resolwazami telomerów). Do protelomeraz należy też produkt genu *agrC4584* z *Agrobacterium tumefaciens*, a także białko kodowane przez DNA faga PY54 i przez DNA profaga Φ KO2 z *K. oxytoca* [7]. Białka z tej grupy działają podobnie: wiążą się specyficznie z rejonem *telL/R* (*telO*)

będącego częścią dłuższego rejonu *tosL/R* 3, przecinają nici i łączą ponownie komplementarne końce. Protelomerazy potrafią przeprowadzać tę reakcję także w obecności samego rejonu *telO* (choć z niską wydajnością), i nie wymagają obecności ani jonów dwuwartościowych, ani dodatkowych białek, ani związków wysokoenergetycznych. Reakcja przeprowadzana przez protelomerazy zachodzi równie dobrze w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*.

Dla wyjaśnienia przebiegu replikacji zwykle proponowane są trzy podstawowe mechanizmy, a wykorzystywanie określonego sposobu replikacji zależy głównie od lokalizacji miejsca inicjacji replikacji. W większości przypadków replikacja przebiega dwukierunkowo. I tak np. inicjacja replikacji genomu N15 zaczyna się od miejsca znajdującego się w obrębie genu *repA* (odpowiednika białek inicjacyjnych plazmidów wykorzystujących mechanizm theta) zlokalizowanego w wewnętrznym rejonie genomu. Replikacja DNA N15 biegnie wokół telomerów i kończy się formowaniem

kolistych dimerów (ang. head to head dimer), po czym następuje rozcięcie telomerów przy udziale protelomerazy [14, 45, 59, 65]. Brak protelomerazy powoduje nagromadzenie dimerów – intermedatów. Poza białkiem RepA w inicjacji replikacji N15 bierze udział komórkowe białko DnaG – prymaza. Liniowe plazmidy z bakterii z rodzaju *Borrelia* rozpoczynają proces replikacji także od wewnętrznej części cząsteczki DNA, podobnie dzieje się to w przypadku liniowego chromosomu *Borrelia*. Schemat replikacji jest zbliżony do modelu N15 i zawiera etap przecinania i ponownego łączenia zduplikowanych telomerów. Nieco inny mechanizm odpowiada za replikację plazmidu pG591 (plazmid podobny do profaga plazmidu N15), u którego nie obserwuje się powstawania kolistych dimerów, ale Y-kształtne cząsteczki. Asymetryczna lokalizacja miejsca inicjacji replikacji (5 kbp od sekwencji *telL* versus 8 kbp od sekwencji *telR*) lub/i różne tempo przesuwania się widełek replikacyjnych w przeciwnych kierunkach powoduje, że jeden z telomerów zostaje zreplikowany



Rys. 2. Model replikacji profaga N15 (A) i inne podstawowe mechanizmy replikacji liniowych cząsteczek DNA o kowalencyjnie zamkniętych końcach (B, C).

- A – cięcie przez protelomerazę następuje po zakończeniu replikacji – powstaje kolisty dimer „head-to-head” (N15).
 B – protelomeraza przecina DNA zanim replikacja dobiegnie końca, co skutkuje powstaniem Y – podobnych intermedatów (pG591).
 C – schemat właściwy pokswirusom *telL*, *telR* – prawy i lewy koniec telomeru elipsa – protelomeraza.

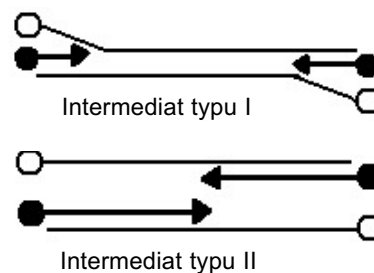
Rysunek opracowano na podstawie schematów zawartych w pracach Casjens [6], Ravin [59] i Stewart i wsp. [70].

i rozcięty wcześniej niż drugi z nich. Toteż po zreplikowaniu lewego telomeru następuje przecięcie tego fragmentu przez protelomerazę, dzięki czemu tworzą się Y-kształtne cząsteczki. Pełna replikacja cząsteczki DNA i rozcięcie jej od strony prawego telomeru sprawia, że powstają dwie liniowe cząsteczki DNA.

Schemat replikacji właściwy charakterystyczny dla N15 i liniowych DNA *Borrelia* różni się od replikonów o podobnej budowie telomerów występujących w komórkach eukariotycznych (pokswirusów, wirusa ASFV i wirusów z *Chlorella*). U pokswirusów miejsce startu znajduje się w proksymalnym rejonie telomeru, gdzie replikacja rozpoczyna się od przecięcia nici w tym regionie i rearanżacji struktury szpilki do włosów. Po zakończeniu replikacji przebiegającej według modelu odsuwanej nici powstają konkatemery, których telomery zostają wkrótce rozdzielone tworząc monomeryczne struktury o kowalencyjnie zamkniętych końcach. W genomach pokswirusów za funkcjonalny odpowiednik protelomerazy może być uważane białko K4, które jest odpowiedzialne za przecinanie wirusowych telomerów podczas inicjacji replikacji oraz rozdzielanie konkatemerów [15].

4.2. Replikacja plazmidów niosących TP w porównaniu do innych inwertronów

Replikacja plazmidów o budowie typu inwertronu różni się zasadniczo od wcześniej opisywanej replikacji plazmidów o kowalencyjnie zamkniętych końcach. Cechą wyróżniającą plazmidy – inwertrony są białka terminalne, przyłączone, jak to wcześniej opisano, do końców cząsteczki DNA. Odgrywają one ważną rolę podczas replikacji plazmidu, lecz w różnych inwertronach pełnią różne funkcje. Jeden z mechanizmów inicjacji replikacji inwertronów poznano dokładnie na przykładzie replikacji genomu bakteriofaga $\Phi 29$ z *Bacillus subtilis* [46, 55, 67, 68]. Charakterystyczny jest on także dla kilku innych fagów, np. Cp-1 specyficznego wobec *Streptococcus pneumoniae* oraz PRD1 atakującego *E. coli*, ale także dla adenowirusów. Jest to tzw. replikacja inicjowana przez białko (ang. protein-primed replication) [67]. Inicjacja replikacji polega na rozpoznaniu miejsca *ori* – końców DNA połączonych z TP – przez heterodimer TP-polimeraza DNA. W postaci kompleksu z fagową polimerazą DNA (produkt genu 2 u faga $\Phi 29$), białko terminalne staje się miejscem startu syntezy DNA. Polimeraza DNA katalizuje tworzenie fosfodiesterowego wiązania pomiędzy grupą hydroksylową reszty serynowej nr 232 białka terminalnego (TP) a deoksy-adenozynomonofosforanem (dAMP). Reakcja ta wymaga utworzenia stabilnego heterodimerycznego kompleksu między TP a polimerazą DNA faga $\Phi 29$. Pierwszy nukleotyd związany z TP staje się 5'-końcowym nukleotydem nowopowsta-



Rys. 3. Formy pośrednie powstające podczas replikacji inwertronu. Białe kółka oznaczają TP przyłączone do nici rodzicielskiej, czarne kółka – TP służące jako starter.

jącej nici. Chociaż nukleotyd jest początkowo przyłączony do TP w pozycji komplementarnej do drugiego nukleotydu matrycy, kompleks ślizga się wstecz, do pozycji komplementarnej z pierwszym nukleotydem. Zjawisko to, możliwe dzięki obecności na końcach plazmidowego DNA ciągu trzech tymin wchodzących w skład sekwencji 5'-TTTCAT-3', pozwala na odzyskanie skrajnego nukleotydu 3' matrycy.

Polimeraza DNA pozostaje w kompleksie z TP do czasu, aż nowa nić DNA ma wystarczającą długość, by mogła służyć jako starter, tj. około 6–9 nukleotydów. Wtedy kompleks zmienia swą konformację i TP odłącza się od polimerazy. Natomiast na odsuniętej przez nowopowstały łańcuch rodzicielskiej nici DNA zachodzi dalsza replikacja. Aby nastąpiło prawidłowe powielenie genomu fagowego inicjacja replikacji musi zaczynać się na obu końcach cząsteczki DNA. Brak białka TP (startera) na jednym końcu nie pozwala na powstanie potomnych dwuniciowych cząsteczek DNA.

Na podstawie analogii strukturalnej genomu faga $\Phi 29$ i liniowych plazmidów *Streptomyces* przez dłuższy czas sadzono, że replikują się one w taki sposób jak $\Phi 29$. Jednak stwierdzenie, że inicjacja replikacji u plazmidów liniowych ze *Streptomyces* rozpoczyna się w centralnej części cząsteczki DNA i biegnie w kierunku jej końców pokazało, że funkcjonuje u nich inny mechanizm replikacji. Dla plazmidu pSLA2 (17 kpz) ze *S. rochei* model replikacji zaproponowała grupa C o h e n a [10, 11]. Wewnętrzny rejon *ori*, sekwencja zawierająca serię iteronów (prostych powtórzeń, służących wiązaniu białka inicjacji replikacji) ulokowany jest w obrębie genu kodującego białko Rep. Replikacja przebiega dwukierunkowo – ku obu telomerom, a produktem tego procesu cząsteczka o wystających (ang. overhang) końcach 3', gdyż przebiegająca z udziałem fragmentów Okazaki synteza nici opóźnionej nie osiąga końców cząsteczki. Pośrednią formą replikacyjną jest tu więc dwuniciowa cząsteczka DNA o końcach 5' skróconych (ang. recessed) o około 280 nukleotydów w stosunku do końców 3'. I to właśnie uzupełniająca synteza końców 5' jest zależna od białek terminalnych i sekwencji TIR. Jednociowy koniec 3' nici DNA tworzy zagięcie, co jest możliwe dzięki sekwencji

palindromowych obecnych TIR. Powoduje to powstanie na końcach cząsteczki dupleksu DNA, który jest rozpoznawany przez białko terminalne Tp (Tpg). W procesie tym bierze także udział białko Tap (80 kDa), nowy typ białka wiążącego się z telomerami (ang. telomere-associated protein) na wystających końcach 3'. Tap oddziałuje z białkiem Tpg (białkiem terminalnym) i „rekrutuje” go do specyficznej sekwencji w obrębie wystających 3'-końców telomeru w pośrednich formach replikacyjnych. Kompleks białek terminalnych służy jako starter do uzupełniającej syntezy cofniętych końców 5'. Inicjację replikacji z wewnętrznego rejonu *ori* wykazano także dla innych plazmidów, np. pCLP z *Mycobacterium celatum* [52]. analogiczny mechanizm replikacji funkcjonuje także w chromosomach *Streptomyces*, które również są liniowe, zawierają konserwowane regiony odwróconych powtórzeń TIR oraz białka terminalne. Utrata białka Tap lub Tpg prowadzi do delecji telomerów i powoduje cyrkularyzację liniowych replikonów u *Streptomyces*. Wykorzystując odpowiednie mutanty wykazano, że plazmid pSLA2 jest utrzymywany w formie liniowej tylko w obecności funkcjonalnego genu *tpg*, zaś przy braku produktu tego genu w komórce jego cząsteczka ulega cyrkularyzacji [1, 2].

U *S. lividans* w plazmidzie pSLA2, poza *tpg* wykryto dodatkowy gen niezbędny do utrzymywania liniowej formy cząsteczek, nazwany *rhrA*. Rejon ten odpowiada za regulację procesu przechodzenia formy liniowej w kolistą poprzez interakcje z *rorA*, odpowiadającym za stabilność formy kolistej. Wzajemne działanie tych dwóch rejonów stanowi plazmidowy system regulacyjny u *Streptomyces* [57].

Liczne plazmidy liniowe (pHZ1-pHZ6) wykryto w gatunku *S. hygrosopicus*, wśród nich jest plazmid pHZ6 (70 kpz), którego system replikacyjny jest naturalnie temperaturowrażliwy. Normalnie replikuje się w 28°C, podczas gdy w 37°C jest on niestabilny i jest eliminowany z komórek. [51].

5. Mechanizmy stabilizujące

Mechanizm aktywnego rozdziału plazmidów do komórek potomnych (zwanego czasem partycją, od ang. partition) jest u plazmidów liniowych podobny do mechanizmów funkcjonujących u plazmidów kolistych. Zaangażowane w ten proces są dwa typy białek, A i B (np. ParA i ParB lub SopA i SopB), oddziałujące z obecną w stabilizowanym replikonie **sekwencją centromeropodobną**, co w efekcie prowadzi do kontrolowanego przemieszczenia zreplikowanych cząsteczek DNA z centrum komórki macierzystej w miejsca odpowiadające przyszłym centrom komórek potomnych. Przebieg procesu opisany jest w pracy przeglądowej Bartosika [3].

Dla elementów o liniowej strukturze najdokładniej opisany został system partycji profaga/plazmidu N15 [23]. Składa się on z operonu *sopA/sopB* oraz czterech sekwencji centromerowych *sopC*, znajdujących się na przestrzeni 13 kpz genomu plazmidowego, daleko od rejonu operonu *sop*. Białka SopA/B N15 są zdolne do stabilizacji zarówno plazmidów liniowych jak i kolistych pod warunkiem posiadania przez nie chociaż jednej sekwencji *parS*. Operon *sop* profaga/plazmidu N15 wykazuje duże podobieństwo do odpowiadającego mu operonu z plazmidu F [60], na tyle, że możliwa jest komplementacja między systemami *sop* z tych dwu różnych elementów genetycznych.

Promotor regionu *sop* faga N15 (*Psop*) zawiera sekwencję wiążącą bakteryjne białko IHF oraz pięć kopii sekwencji CTTTGC, zachodzących na rejony -35 i -10. Transkrypcja operonu *sop* jest regulowana przez białko Sop: białko SopA jest represorem operonu; represja ta wspomagana jest przez białko SopB, które nie posiada tej aktywności przy braku białka SopA. Mechanizm regulacyjny zapewnia kontrolę ilości białek SopA i SopB, tak aby występowały w stężeniu odpowiednim dla przeprowadzenia stabilnej segregacji profaga/plazmidu N15 [62].

Geny odpowiedzialne za stabilność plazmidów wykryto również w plazmidzie pCLP (23 kpz) z *M. celatum* (*Actinomycetales*) [38]. Poznane zostały funkcje kilku ORFów z pCLP, spośród których ORF2 i ORF3 kodują produkty o 80% poziomie identyczności z białkami PemI i PemK plazmidu R100 z *E. coli*. System *pem* należy do mechanizmów „trucizna-antidotum”. Posługuje się on białkiem – trucizną PemK oraz białkiem regulacyjnym PemI w celu eliminacji komórek bezplazmidowych z populacji jak to szczegółowo opisano w pracach [3, 87, 88].

Sprawne mechanizmy aktywnego rozdziału szczególnie ważne są w sytuacji, gdy w jednej komórce występuje wiele różnych plazmidów, jak na przykład u *B. burgdorferi*, która stabilnie utrzymuje ponad 20 niezależnych replikonów. W plazmidach z *B. burgdorferi* rejon inicjacji replikacji (*ori*) pokrywa się z lokalizacją genów należących do wspomnianych wcześniej pięciu rodzin paralogicznych genów PGF. Postuluje się, że rodziny białek PGF odpowiadają za stabilne utrzymywanie plazmidów w komórce, na co wskazuje podobieństwo ich sekwencji do białka ParA z plazmidu/profaga P1 *E. coli* [89]. Podobieństwo białka PF (od: paralogous families) 32 do białka ParA dotyczy występowania w obu typach białek charakterystycznego motywu ATP-azy typu Walkera. W plazmidach z *Borrelia* znaleziono pięć białek PF zaangażowanych w mechanizm aktywnego rozdziału. W każdym plazmidzie z *Borrelia* występuje co najmniej jedno z białek PF [9]. PF 49 uważa się za odpowiednik białka ParB [21]. Konserwatyzm i obecność białek PF zarówno na koli-

stych, jak i na liniowych plazmidach wskazuje na to, że oba rodzaje plazmidów, a także fagi lizogenizujące w formie profago/plazmidu (np. N15 i P1) wykorzystują podobne mechanizmy aktywnego rozdziału [69].

6. Geny zlokalizowane na plazmidach liniowych nie związane z funkcjami „maintenance”

Poza genami niezbędnymi do funkcjonowania plazmidu jako samodzielnego replikonu, zajmującymi z reguły, podobnie jak u plazmidów kolistych, nie więcej niż ~3 kpz (o czym świadczy przeciętna wielkość minimalnego replikonu), plazmid zwykle niesie szereg dodatkowych genów. Ekspresja większości z nich nadaje gospodarzowi plazmidu różnorodne cechy fenotypowe, których posiadanie zwykle jest korzystne dla bakterii, dając jej przewagę selekcyjną w środowisku. Natomiast z punktu widzenia człowieka pewne z plazmidowo kodowanych cech mogą być dla niego niekorzystne (np. oporność na antybiotyki czy wirulencja bakterii), podczas gdy inne potrafi z pożytkiem dla siebie wykorzystać (np. zdolność do biodegradacji toksycznych związków w glebie czy wodzie). Ponieważ, ogólnie mówiąc, typy genów składających się na to dodatkowe „wyposażenie” plazmidu (ang. load) nie odbiegają znacząco od genów zidentyfikowanych na plazmidach kolistych, a problem ich różnorodności był ostatnio przedstawiany w kilku artykułach [19, 78, 82, 84], w rozdziale tym zostanie zwrócona uwaga jedynie na niektóre grupy genów „plazmidowych” wpływających na fenotyp komórki bakteryjnej, a także na pseudogeny, w tej grupie plazmidów dość liczne.

6.1. Geny identyfikowane na replikonach liniowych z zakończeniami typu szpilki do włosów

Zaliczany do tej grupy liniowy genom profago/plazmidu N15, którego pełna sekwencja nukleotydowa została określona, niesie tylko geny wymagane do utrzymania genomu w stanie profaga lub do przeprowadzenia cyklu litycznego oraz geny regulujące tranzycję między tymi formami rozwoju, nie zawiera dodatkowych genów wpływających na fenotyp gospodarza [62].

Bakterię szczególnie ciekawą pod kątem typów genów o plazmidowej lokalizacji jest wspomniany wyżej gatunek *B. burgdorferi*, zawiera on bowiem najwyższą ze wszystkich opisanych bakterii ilość informacji genetycznej zawartej na 21 plazmidach (co stanowi ok. 40% całkowitej informacji genetycznej tej bakterii), wśród których aż 12 to plazmidy liniowe. Ponieważ gatunek ten prowadzi obligatoryjnie pasożytniczy tryb życia, w jego chromosomie (910 kpz) kodowana jest informacja dotycząca enzymów tylko minimalnego metabolizmu [9]. Wiele niezbędnych do życia komórki zwią-

ków bakterii czerpie ze swojego żywiciela, korzystając z m.in. z nukleotydów, aminokwasów, kwasów tłuszczowych, kofaktorów enzymów organizmu zainfekowanego. *B. burgdorferi* to pasożyt przechodzący cykl życiowy w dwóch gospodarzach – myszy *Peromyscus leucopus* i kleszczu *Ixodes scapularis*. Kleszcze, żerując na myszy, przenoszą bakterie na kolejnych żywicieli podczas następnych żerowań. Serią badań nad *B. burgdorferi* wykazano, że utrata określonych plazmidów koreluje ze spadkiem lub zanikiem patogenności tej bakterii wobec myszy, nie wpływając na zdolności wzrostu komórek bezplazmidowych [37]. Część spośród 21 plazmidów niesionych przez *B. burgdorferi* zawiera geny kodujące cechy niezbędne do infekcji myszy [75]. Wykryto jak dotychczas 6 takich plazmidów, wśród których trzy są plazmidami liniowymi (lp25, lp28-1, lp54). Plazmidy lp 25 i lp54 wymagane są też do zainfekowania organizmu kleszcza [75, 70]. Na plazmidach liniowych znajdują się geny odpowiadające za transport do komórki składników odżywczych (transportery odpowiadające z transport cukrów i oligopeptydów, np. transporter ABC), geny enzymów szlaków metabolicznych: nikotynamidaza (odpowiedzialna za syntezę NAD i niezbędna do przeżycia bakterii w mysim gospodarzu), deaminaza adeniny, geny kodujące enzymy restrykcji – modyfikacji, a także gen kodujący helikazę DNA. Inne geny kodują adhezyny niezbędne do zainfekowania kleszcza (operon *ospA* i *ospB*), inne – adhezyny do kolonizacji ssaka (operon *dbpA/dbpB*). Białko CRASP-1 (ang. complement regulator – acquiring surface protein 1), kodowane na plazmidzie lp54, jest głównym czynnikiem obrony bakterii przed aktywnością immunologiczną komórek układu dopełniacza, wiążąc białka FH i FHL-1 gospodarza (ang. factor H i factor H-like protein 1), czynniki regulatorowe układu dopełniacza, obecne w surowicy [35]. Geny głównych białek powierzchniowych *B. burgdorferi*, nazwanych *OspA* i *OspB* są zlokalizowane na plazmidzie lp54, a gen *ospD* na plazmidzie lp38. Różnorodność prezentowanych białek powierzchniowych, uzyskiwana dzięki „przełączaniu” genów sprawia, że bakteria ma mniejsze szanse na rozpoznanie ze strony komórek pamięci immunologicznej, posługujących się receptorami działającymi na wcześniej spotykane i nieszkodliwiane antygeny. W plazmidach z *Borrelia* geny odpowiedzialne za zmienność antygenową stanowią wielkie obszary – kasety genowe, przełączane z „cichych” w ulegające ekspresji, prawdopodobnie za pomocą mechanizmu konwersji genów. Przykładem jest rodzina genów *vmp* z *B. hermsii*. Rekombinacja między genami *vmp* zlokalizowanych na różnych plazmidach powoduje wspomnianą zmienność antygenową (ang. antigenic variation) [56, 63]. Gatunki odpowiedzialne za wywołanie gorączki powrotnej posiadają niezwykle wydajny system zmienności antygenowej – ich liniowe plazmidy,

o wielkości do 44 kpz, niemal w całości wykorzystane są na „przechowywanie” genów kodujących różnorodne białka powierzchniowe [76].

Warto dodać, że geny niesione przez opisywane plazmidy wykazują niską homologię (poniżej 10%) z genami spoza rodzaju *Borrelia*, tzn. tylko 10% genów kodowanych plazmidowo ma swoje odpowiedniki poza tym rodzajem [9], podczas gdy chromosomowo kodowane geny znajdują swoje odpowiedniki w 59% [16]. To może oznaczać, że kodują one specyficzne funkcje spotykane tylko w obrębie tego rodzaju. Ciekawą cechą informacji genetycznej zapisanej na plazmidach liniowych z *Borrelia* jest to, że zawierają one dużą ilość pseudogenów (otwartych ramek odczytu, które straciły funkcję z powodu mutacji i prawdopodobnie nie są transkrybowane), akumulujących mutacje takie jak np. zduplikowane regiony DNA. Wg publikacji S. C a s j e n s a i wsp. z 2000 r. [9], plazmidy z *B. burgdorferi* zawierają 167 pseudogenów, podczas gdy w chromosomie znajduje się tylko jeden pseudogen. Do przypuszczalnego znaczenia tych obserwacji powrócimy przy omawianiu ewolucji plazmidów liniowych.

6.2. Cechy kodowane przez geny plazmidów z przyłączonymi TP

Z obecnością plazmidów liniowych tego typu, zwłaszcza u przedstawicieli rzędu *Actinomycetales*, często skorelowana jest zdolność do degradacji ksenobiotyków. Dla przykładu, rodzaj *Rhodococcus* plazmidom liniowym zawdzięcza zdolność do wzrostu w obecności substancji takich jak chlorek winylu, fenol, insektycydy, akrylaminy, aniliny, fluorowcopochodne alkanów, PCB (polichlorobenzen). Jako przykład może posłużyć *R. opacus* zawierająca plazmid p1CP (740 kpz), niosący geny *macA*, *clc*, *clc2* kodujące enzymy degradacji związków aromatycznych i ich chloropochodnych, co pozwala tej bakterii na wzrost przy wykorzystaniu tych związków jako jedyne źródła węgla [34] oraz *R. erythropolis*, niosący plazmid pBD2, warunkujący zdolność do utylizowania izopropylbenzenu jako jedyne źródła węgla i energii. Plazmid pRHL3, jeden z trzech plazmidów (o wielkości od 330 do 1100 kpz) występujących w szczepie *Rhodococcus* sp. RHA1, niesie około 300 genów, z których 21% wydaje się odpowiadać za funkcje kataboliczne. Zorganizowane są one w trzy zgrupowania związane z katabolizmem – jedno z nich zawiera geny związane z degradacją limonenu (terpenu) – bakteria jest w stanie rosnąć na tym związku jako jedynym źródle węgla. Plazmid niesie również trzy geny kodujące cytochrom P450 (CYP – geny), co jest częste wśród bakterii z rzędu *Actinomycetales*. Plazmid RHL3 zawiera cztery „wyspy genomowe” (ang. genomic islands), prawdopodobnie uzyskane w wyniku transferu hory-

zontalnego, elementy insercyjne, 19 genów transpozaży. Jedną z wysp genomowych koduje mechanizm oporności na metale ciężkie [80]. Z kolei plazmid pHG201 nadaje swoim gospodarzom *Rhodococcus* sp. MR11 i MR22 oraz *R. opacus* zdolność do autotroficznego wzrostu na wodrze jako jedynym źródle energii. Cecha ta przenoszona jest wraz z plazmidem. W *R. fascians*, patogenie roślinnym wywołującym narośla (miejscowe proliferacje tkanki) na liściach głównie roślin dwuliściennych, geny *fas*, *att*, *hyp* determinujące patogenność niesie plazmid pFiD188 [12]. Utrata plazmidu wiąże się z utratą patogenności tej bakterii. Wiele z plazmidów występujących w rodzaju *Streptomyces* niesie geny odpowiedzialne za produkcję antybiotyków [33]. Jako że plazmidy te zazwyczaj są zdolne do koniugacji, cechy przez nie determinowane przenoszą się łatwo w obrębie gatunku.

7. Pochodzenie i ewolucja bakteryjnych plazmidów liniowych

Trudno jest poszukiwać wspólnego przodka wszystkich plazmidów, gdyż zbyt różnią się one funkcjonalnie i strukturalnie. Hipoteza na temat powstania plazmidów na drodze wyodrębnienia fragmentu DNA z istniejącego już replikonu (np. chromosomu) dotyczy raczej plazmidów kolistych. Prawdopodobną drogą powstania plazmidów liniowych jest raczej ich ewolucja z bakteriofagów lub innych wirusów. Wśród przemian zachodzących na drodze przekształcania wirusa w plazmid ważnym etapem mogła być utrata (mutacja) genów cyklu litycznego zatrzymująca go w stanie lizogenii w zainfekowanej komórce lub genów białkowych osłon wirusa, co uniemożliwiło dojrzewanie cząstki wirusowej. Takie defektywne wirusy mogłyby pozostać w komórce jako plazmid. Dopuszcza się też możliwość powstania liniowych replikonów w wyniku rekombinacji plazmidów kolistych z genomami fagowymi. Dla stabilniejszego utrzymywania się w komórce pierwotnie kryptyczne plazmidy mogły pozyskać od innych replikonów takie moduły funkcjonalne, których obecność nadawała gospodarzowi przewagę selekcyjną. Na strukturę i funkcję obecnie identyfikowanych plazmidów wpłynęło więc wiele zdarzeń rekombinacyjnych (w tym transpozycyjnych), mutacji oraz możliwość horyzontalnego transferu genów. Podstawową cechą liniowych replikonów jest ich niestabilność – amplifikacje i delecje powodują czasem utratę telomerów, co przywraca im strukturę kolistą [79]. Zjawisko to zachodzi dwukierunkowo – integracja elementu genetycznego zawierającego telomery i gen resolwazy telomerów do plazmidu lub chromosomu kolistego powoduje powstanie formy liniowej, zaś utrata telomerów powoduje powrót do formy kolistej. Te dynamiczne przemiany

strukturalne określa się jako **konwersję między formą cyrkularną a liniową**.

7.1. Ewolucja i rearanżacje plazmidów typu inwertronu

Dla plazmidów liniowych o budowie inwertronu z wysokim prawdopodobieństwem zaproponować można pochodzenie odwirusowe. Na poparcie tej tezy przedstawia się dowód w postaci podobieństw struktury fagów i plazmidów *Streptomyces*, np. plazmidy pSLA2 i pSCL1 cechuje podobieństwo do bakteriofagów *Enterobacteriaceae* i *Bacillus* w obrębie rejonu inicjacji replikacji [11].

Inną ciekawą cechą jest zdolność plazmidów z *Actinomycetales* do transferu koniugacyjnego – i to nie tylko w obrębie jednego gatunku bakterii, jako że możliwe jest parowanie pomiędzy np. różnymi gatunkami *Streptomyces*. Barię gatunkową przekraczać może np. plazmid SLP2, który może być przenoszony między *S. lividans* (naturalny gospodarz dla pSLP2), *S. coelicolor* i *S. parvulus*. Dalsze badania nad pSLP2 (50 kb) wykazały, że jest to złożony replikon, którego prawy końcowy fragment o długości 15,4 kb jest identyczny z fragmentem chromosomu gospodarza, i tak jak on zawiera w sobie transpozon Tn4811 (z dodatkową sekwencją insercyjną w plazmidzie pSLP2). W pobliżu lewego telomeru znajdują się z kolei dwie sekwencje pseudotelomerowe, co wraz z wynikami dodatkowych badań sugeruje, iż pSLP2 wyewoluował poprzez wymianę genetyczną z udziałem co najmniej trzech innych replikonów [31]. Inny plazmid – SCP1 (356 kb) ze *S. coelicolor* – także wyewoluował z udziałem wielu zjawisk rekombinacyjnych. Plazmid ten zawiera geny podobne do genów chromosomalnych gospodarza (odpowiadające za biosyntezę antybiotyków, kodujące specyficzne białka regulacyjne promieniowców, system przekazyujący sygnały i białka sekrecyjne). Plazmid SCP1 posiada także dwa zestawy genów partycji, i wiele innych dowodów wskazujących na zajście zdarzeń rekombinacyjnych z innymi replikonami [4].

Wiele z ostatnich badań odkrywa dowody na wymiany genetyczne między plazmidami a chromosomem gospodarza. W *S. rimosus* zaobserwowano zachodzenie rekombinacji między plazmidem PZG101 a chromosomem prowadzącą do wymiany ich końców [49]. W szczepie 2106 *S. coelicolor* A3(2) wykryto rearanżację genetyczną wskazującą na utworzenie struktury hybrydowej pomiędzy plazmidem SCP1 a liniowym chromosomem, która spowodowała powstanie plazmidu SCP1'-cysD (1,85 Mbp). Stwierdzono, że SCP1'-cysD nie może być usunięty ze szczepu 2106, toteż replikon ten wydaje się być drugim chromosomem [85].

Dowody na rearanżacje genetyczne oraz transfer horyzontalny między odległymi taksonami odnaleźć można także wśród plazmidów występujących w *Rho-*

dococcus. Plazmid pBD2 (210 kbp) z *R. erythropolis* niesie geny enzymów katabolicznych (dioksygenaz pochodnych benzenu i katecholu), które odznaczają się wysoką homologią do analogicznych enzymów z bakterii gramujemnych [13]. Otoczenie genów katabolizmu przez sekwencje transpozonowe sugeruje, że geny te zostały nabyte poprzez zdarzenia transpozycyjne, a rozpowszechnione wśród rodzaju *Rhodococcus* zostały drogą transferu horyzontalnego.

Kolejnym dowodem na rolę transferu horyzontalnego pomiędzy różnymi gatunkami bakterii w trakcie ich przemian ewolucyjnych jest istnienie podobnych loci na plazmidzie pCLP (23 kbp) z *M. celatum* i na chromosomie *M. tuberculosis*. Szczegółowa analiza genetyczna plazmidu pCLP wykazała istnienie homologii sekwencji z takimi gatunkami, jak wspomniana *M. tuberculosis*, *M. morganii*, *E. coli*, *Pseudomonas alcaligenes*, *M. fortuitum*, oraz z plazmidami kolistymi [38].

7.2. Pochodzenie i zmiany genetyczne plazmidów o zakończeniach typu „szpilki do włosów”

Zagadnienie pochodzenia plazmidów liniowych u bakterii z rodzaju *Borrelia*, czyli plazmidów o strukturze „szpilki do włosów” prezentuje się podobnie jak w przypadku inwertronów, tzn. wskazuje na udział wirusów w toku ich ewolucji. Postuluje się, że telomery plazmidów z *Borrelia* zostały uzyskane z wirusa ASFV na drodze transferu horyzontalnego [27]. Wskazuje na to podobieństwo budowy i sekwencji telomerów obu typów replikonów oraz to, że i *Borrelia*, i ASFV są przenoszone przez tego samego gospodarza (afrykański kleszcz *Ornithodoros moubata*), co mogło umożliwić genetyczny kontakt między DNA bakterii a DNA wirusa. Także inne bakteriofagi wykazują homologię sekwencji ich odcinków telomerowych z telomerami liniowych cząsteczek DNA z *Borrelia*, np. bakteriofag N15, PY54 czy Φ KO2, co sugeruje odwirusowe pochodzenie liniowego DNA w bakterii. Plazmidy z *Borrelia* zawierają geny posiadające swe homologię w chromosomach innych bakterii [6]. Niektóre geny znajdują swe paralogi na plazmidach kolistych i liniowych, także na chromosomie *Borrelia*.

Podobnie jak w przypadku liniowych cząsteczek DNA u *Streptomyces*, regiony telomerów *B. burgdorferi* odznaczają się wysokim potencjałem rekombinacyjnym, co powoduje wzmogoną różnorodność genetyczną w tych rejonach [8, 79]. Wymiana odcinków telomerowych zachodzić może między chromosomem a plazmidem, co zaobserwowano u wielu naturalnych izolatów *B. burgdorferi*. Prawe ramię chromosomu u tych bakterii jest dłuższe o 7–9 kbp niż w „normalnym” chromosomie. Spowodowane jest to niehomologiczną rekombinacją, która doprowadziła do wymiany prawego telomeru chromosomu na duży fragment

liniowego plazmidu lp21. Autorzy badań [30] twierdzą, że musiały zajść co najmniej dwie rundy addycji materiału genetycznego plazmidu do chromosomu. Jest to kolejna rearanżacja powodująca, że materiał genetyczny plazmidu staje się częścią chromosomu.

Kolejnym czynnikiem zwiększającym potencjał rekombinacyjny *B. burgdorferi* jest istnienie na różnych plazmidach wielu homologicznych alleli należących do rodzin paralogicznych genów. Stanowią one miejsca rekombinacji między plazmidami. Zdarzenia rekombinacyjne między homologicznymi sekwencjami na różnych plazmidach wpływają na różnorodność powstających białek, organizację i ewolucję genomu oraz na interakcje gospodarz – patogen. Różnorodność genetyczna plazmidów może posłużyć ich bakteryjnym gospodarzom w celu przejawiania większej zmienności fenotypowej i zarazem większych możliwości szybkich adaptacji do środowiska [64]. Stwierdzenie, że *B. burgdorferi* znajduje się aktualnie w stanie gwałtownych zmian ewolucyjnych w celu przystosowania się do nowych środowisk poparte być może faktem, że plazmidy z tego gatunku bakterii zawierają bardzo dużo pseudogenów i akumulują mutacje. Celem tego mogą być zmiany funkcji lub wyłączanie genów na plazmidach *B. burgdorferi*.

Dlaczego bakterie utrzymują liniowe replikony? Pytanie to nie zostało do końca wyjaśnione. Być może powodem jest brak możliwości multimeryzacji liniowych replikonów. Co za tym idzie, plazmidy liniowe nie posiadają systemów rozdzielania form multimericznych, toteż jeśli dojdzie do ich cyrkularyzacji, nie będą w nowej formie stabilnie dziedziczone. Stąd może plazmidy, które pierwotnie powstały w formie liniowej nie są utrzymywane po zmianie struktury na kolistą. Na pewno ich cechą charakterystyczną jest plastyczność genomowa, zwłaszcza na końcach cząstek ich DNA, co może być zaletą podczas przystosowywania się do nowych warunków. Liniowa budowa ułatwia rearanżacje, rekombinacje z kolistym i chromosomalnym DNA, integracje plazmidów do chromosomu, co zwiększa genetyczną różnorodność i jest głównym mechanizmem ewolucji.

8. Podsumowanie

Istnieją dwa podstawowe typy plazmidów liniowych – plazmidy z przyłączonymi do końców 5' białkami oraz plazmidy o kowalencyjnie zamkniętych końcach. Te ostatnie powszechne są w patogennych krętkach z rodzaju *Borrelia*, u których są przydatnym elementem genetycznym umożliwiającym uchronienie się bakterii przed mechanizmem obronnym gospodarza. Plazmidy posiadające na końcach białka terminalne często warunkują fenotyp przydatny gospodarzowi, jak

np. produkcja antybiotyków, degradacja ksenobiotyków, oporność na metale ciężkie.

W pracy zaprezentowane zostały m. in.: budowa, przebieg replikacji i mechanizmy aktywnego rozdziału do komórek potomnych warunkujące stabilność, a także ich pochodzenie i ewolucja z uwzględnieniem roli genetycznych rearanżacji.

Piśmiennictwo

1. Bao K., Cohen S.N.: Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in *Streptomyces*. *Genes Dev.* **15**, 1518–1527 (2001)
2. Bao K., Cohen S.N.: Recruitment of terminal protein to the ends of *Streptomyces* linear plasmids and chromosomes by a novel telomere-binding protein essential for linear DNA replication. *Genes Dev.* **17**, 774–785 (2003)
3. Bartosik D.: Stabilne dziedziczenie plazmidów. *Post. Biochem.* **47**, 138–145 (2001)
4. Bentley S.D., Brown S., Murphy L.D., Harris D.E., Quail M.A., Parkhill J., Barrel B.G., McCormick J.R., Santamaria R.I., Losick R., Yamasaki M., Kinashi H., Chen C.W., Chandra G., Jakimowicz D., Kieser H.M., Kieser T., Chater K.F.: SCP1, a 356,023 bp linear plasmid adapted to the ecology and developmental biology of its host, *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Mol. Microbiol.* **51**, 1615–1628 (2004)
5. Birnboim H.C., Doly J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513–1523 (1979)
6. Casjens S.: Evolution of the linear DNA replicons of the *Borrelia* spirochetes. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 529–534 (1999)
7. Casjens S.R., Gilcrease E.B., Huang W.M., Bunny K.L., Pedulla M.L., Ford M.E., Houtz J.M., Hatfull G.F., Hendrix R.W.: The pKO2 linear plasmid prophage of *Klebsiella oxytoca*. *J. Bacteriol.* **186**, 1818–1832 (2004)
8. Casjens S., Murphy M., DeLange M., Sampson L., van Vugt R., Huang W. M.: Telomeres of the linear chromosomes of Lyme disease spirochetes: nucleotide sequence and possible exchange with linear plasmid telomeres. *Mol. Microbiol.* **26**, 581–596 (1997)
9. Casjens S., Palmer N., van Vugt R., Huang W.M., Stevenson B., Rosa P., Lathigra R., Sutton G., Peterson J., Dodson R.J., Haft D., Hickey E., Gwinn M., White O., Fraser C.M.: A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* **35**, 490–516 (2000)
10. Chang P., Cohen S.N.: Bidirectional replication from an internal origin in a linear *Streptomyces* plasmid. *Science*, **265**, 952–954 (1994)
11. Chang P., Kim E., Cohen S.N.: *Streptomyces* linear plasmids that contain a phage-like, centrally located, replication origin. *Mol. Microbiol.* **22**, 789–800 (1996)
12. Crespi M., Vereecke D., Temmerman W., van-Montagu M., Desomer J.: The *fas* operon of *Rhodococcus fascians* encodes new genes required for efficient fasciation of host plants. *J. Bacteriol.* **176**, 2492–2501 (1994)
13. Dabrock B., Kessler M., Averhoff B., Gottschalk G.: Identification and characterization of a transmissible linear plasmid from *Rhodococcus erythropolis* BD2 that encodes isopropylbenzene and trichloroethene catabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 853–860 (1994)

14. Deneke J., Ziegelin G., Lurz R., Lanka E.: The protelomerase of temperate *Escherichia coli* phage N15 has cleaving-joining activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 7721–7726 (2000)
15. DeMasi J., Du S., Lennon D., Traktman P.: Vaccinia virus telomeres: interaction with the viral I1, I6 and K4 proteins. *J. Virol.* **75**, 10090–10105 (2001)
16. Fraser C.M., Casjens S., Huang W.M., Sutton G.G., Clayton R., Lathigra R., White O., Kethum K.A., Dodson R., Hickey E., Gwinn M., Dougherty B., Tomb J.F., Fleischmann R.D., Richardson D., Peterson A.R., Kerlavage A.R., Quackenbush J., Salzberg S., Hanson M., van Vugt R., Palmer N., Adams M.D., Gocayne J., Weidmann J., Utterback T., Watthey L., McDonald L., Artiach P., Bowman C., Garland S., Fujii M.D., Cotton M.D., Horst K., Roberts K., Hatch B., Smith H.O., Venter J.C.: Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, **390**, 580–586 (1997)
17. Fisher G., Wennner T., Decaris B., Leblond P.: Chromosomal arm replacement generates a high level of intraspecific polymorphism in the terminal inverted repeats of the linear chromosomal DNA of *Streptomyces ambofaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 14296–14301 (1998)
18. Fukuhara H.: Linear plasmids of yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* **131**, 1–9 (1995)
19. Funnell B.E., Phillips G.J. (red.): Plasmid Biology. ASM Press, Washington, DC 2004
20. Garcia P., Martin A.C., Lopez R.: Bacteriophages of *Streptococcus pneumoniae*; a molecular approach. *Microb. Drug Resist.* **3**, 165–76 (1997)
21. Gerdes K., Moller-Jensen J., Jensen R.B.: Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. *Mol. Microbiol.* **37**, 455–466 (2000)
22. Griffith A.J.F. Natural plasmids of filamentous fungi. *Microbiol. Rev.* **59**, 673–685 (1995)
23. Grigoriev P.S., Lobočka M.B.: Determinants of segregational stability of the linear plasmid-prophage N15 of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **42**, 355–68 (2001)
24. Hayakawa T., Tanaka T., Sakaguchi K., Otake N., Yonchara H.: A linear plasmid-like DNA in *Streptomyces* sp., producing lankacidin group antibiotics. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **25**, 355–368 (1979)
25. Helinski D.: Introduction to plasmids: a selective view of their history (w) Plasmid biology, red. B.E Funnell, G.J. Phillips, ASM Press, Washington DC, 2003, s. 1.
26. Hertwig S., Klein I., Lanka E., Appel B.: PY54, a linear plasmid prophage of *Yersinia enterocolitica* with covalently closed ends. *Mol. Microbiol.* **48**, 989–1003 (2003).
27. Hinnebusch J., Barbour A.G.: Linear plasmids of *Borrelia burgdorferi* have a telomeric structure and sequence similar to those of a eukaryotic virus. *J. Bacteriol.* **173**, 7233–7239 (1991)
28. Hiratsu K., Mochizuki S., Kinashi H.: Cloning and analysis of the replication origin and the telomeres of the large linear plasmid pSLA2-L in *Streptomyces rochei*. *Mol. Gen. Genet.* **263**, 1015–1021 (2000)
29. Hirochika H., Sakaguchi K.: Analysis of linear plasmids isolated from *Streptomyces*: association of protein with the ends of the plasmid DNA. *Plasmid*, **7**, 59–65 (1982)
30. Huang W.M., Robertson M., Aron J., Casjens S.: Telomere exchange between linear replicons of *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* **186**, 4134–4141 (2004)
31. Huang C.H., Chen C.Y., Tsai H.H., Chen C., Lin Y.S., Chen C.W.: Linear plasmid SLP2 of *Streptomyces lividans* is a composite replicon. *Mol. Microbiol.* **47**, 1563–76 (2003)
32. Hudson B., Vinograd J.: Catenated circular DNA molecules in HeLa cell mitochondria. *Nature*, **216**, 647–652 (1967)
33. Kinashi H., Shimaji M., Sakai A.: Giant linear plasmid in *Streptomyces* which code for antibiotic biosynthesis genes. *Nature*, **328**, 454–456 (1987)
34. König C., Eulberg D., Groning J., Lakner S., Seibert V., Kaschabek S.R., Schlomann M.: A linear megaplasmid, p1CP, carrying the genes for chlorocatechol catabolism of *Rhodococcus opacus* 1CP. *Microbiology*, **150**, 3075–3087 (2004)
35. Kraiczky P., Hellwage J., Skerka C., Becker H., Kirschfink M.M., Simon M.M., Brade V., Zipfel P.F., Wallich R.: Complement resistance of *Borrelia burgdorferi* correlates with the expression of BbCRASP-1, a novel linear plasmid-encoded surface protein that interacts with human factor H and FHL-1 and is unrelated to Erp proteins. *J. Biol. Chem.* **279**, 2421–2429 (2004)
36. Krum J.G., Ensign S.A.: Evidence that a linear megaplasmid encodes enzymes of aliphatic alkene and epoxide metabolism and coenzyme M (2-mercaptoethanesulfonate) biosynthesis in *Xanthobacter* strain Py2. *J. Bacteriol.* **183**, 2172–2177 (2001)
37. Labandeira-Rey M., Skare, J.T.: Decreased infectivity in *Borrelia burgdorferi* strain B31 is associated with loss of linear plasmid 25 or 28–1. *Infect. Immun.* **69**, 446–455 (2001)
38. Le Dantec C., Winter N., Gicquel B., Vincent V., Picardeau M.: Genomic sequence and transcriptional analysis of a 23-kilobase mycobacterial linear plasmid: evidence for horizontal transfer and identification of plasmid maintenance systems. *J. Bacteriol.* **183**, 2157–2164 (2001)
39. Lederberg J.: Plasmid (1952–1997). Personal perspective. *Plasmid*, **39**, 1–9 (1998)
40. Leśniewicz K.: The eukariotic plasmids. *Post. Mikrobiol.* **45**, 293–303 (1999)
41. Li L., Lim C.K.: A novel large plasmid carrying beta-lactam resistance genes isolated from a *Klebsiella pneumoniae* strain. *J. Appl. Microbiol.* **88**, 1038–1048 (2000).
42. Luo Y., Lesinger T., Wasserfallen A.: Comparative sequence analysis of plasmids pME2001 and pME2200 of *Methanothermobacter marburgiensis* strain Marburg and ZH3. *Plasmid*, **45**, 18–30 (2001)
43. Lobočka M.B., Svarchevsky A.N., Rybchin V.N., Yarmolinsky M.B.: Characterization of the primary immunity region of the *Escherichia coli* linear plasmid prophage N15. *J. Bacteriol.* **178**, 2902–10 (1996)
44. Malinin A. Iu., Vostrov A.A., Rybchin V.N., Svarchevskii A.N.: Structure of ends of linear plasmid N15. *Mol. Genet.* **5–6**, 19–22 (1992)
45. Mardanov A.V., Strakhova T.S., Ravin N.V.: RepA protein of the bacteriophage N15 exhibits activity of DNA helicase. *Dokl. Biochem. Biophys.* **397**, 217–9 (2004)
46. Meijer W., Horcajadas J., Salas M.: Phi29 family of phages. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 261–287 (2001)
47. Meinhardt F., Schaffrath R., Larsen M.: Microbial linear plasmids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**, 329–336 (1997)
48. Metcalf W.W., Zhang J.K., Apolinario E., Sowers K.R., Wolfe R.S.: A genetic system for *Archaea* of the genus *Methanosarcina*: liposome-mediated transformation and construction of shuttle vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2626–2632 (1997)
49. Pandza S., Biukovic G., Paravic A., Dadbin A., Cullum J., Hranueli D.: Recombination between the linear plasmid pPZG101 and the linear chromosome of *Streptomyces rimosus* can lead to exchange of ends. *Mol. Microbiol.* **28**, 1165–76 (1998)
50. Pandza K., Pfalzer G., Cullum J., Hranueli S.: Physical mapping shows the unstable oxytetracycline gene cluster of *Streptomyces rimosus* lies close to one end of the linear chromosome. *Microbiology*, **143**, 1493–1501 (1997).

51. Pang X., Sun Y., Liu J., Zhou X., Deng Z.: A linear plasmid temperature-sensitive for replication in *Streptomyces hygrosopicus* 10–22. *FEMS Microbiol. Lett.* **208**, 25–28 (2002)
52. Picardeau M., Le Dantec C., Vincent V.: Analysis of the internal replication region of a mycobacterial linear plasmid. *Microbiology*, **146**, 305–313 (2000)
53. Picardeau M., Vincent V.: Characterization of large linear plasmids in mycobacteria. *J. Bacteriol.* **179**, 95–102 (1997)
54. Picardeau M., Vincent V.: Mycobacterial linear plasmids have an invertron-like structure related to other replicons in actinomycetes. *Microbiology*, **144**, 1981–1988 (1998).
55. Piekarowicz A.: Podstawy wirusologii molekularnej. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2004
56. Plasterk R.H.A., Simon M.I., Barbour A.G.: Transposition of structural genes to an expression sequence on a linear plasmid causes antigenic variation in the bacterium *Borrelia hermsii*. *Nature*, **318**, 257–263 (1985)
57. Qin Z., Shen M., Cohen S.N.: Identification and characterization of a pSLA2 plasmid locus required for linear DNA replication and circular plasmid stable inheritance in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* **185**, 6575–6582 (2003)
58. Radloff R., Bauer W., Vinograd J. A day-buoyant-density method for the detection and isolation of closed duplex DNA: the closed circular DNA in HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **57**, 1514–1521 (1967)
59. Ravin N.V.: Mechanism of replication and telomere resolution of the linear plasmid prophage N15. *FEMS Microbiol. Lett.* **221**, 1–6 (2003)
60. Ravin N., Lane D.: Partition of the linear plasmid N15: interactions of N15 partition functions with the *sop* locus of the F plasmid. *J. Bacteriol.* **181**, 6898–6906 (1999)
61. Ravin N.V., Strakhova T.S., Kuprianov V.V.: The protelomerase of the phage-plasmid N15 is responsible for its maintenance in linear form. *J. Mol. Biol.* **312**, 899–906 (2001)
62. Ravin V., Ravin N., Casjens S., Ford M.E., Hatfull G.F., Hendrix R.W.: Genomic sequence and analysis of atypical bacteriophage N15. *J. Mol. Biol.* **299**, 53–73 (2000)
63. Restrepo B.I., Kitten T., Carter C.J., Infante D., Barbour A.G.: Subtelomeric expression regions of *Borrelia hermsii* linear plasmids are highly polymorphic. *Mol. Microbiol.* **6**, 3299–3311 (1992)
64. Roberts D.M., Carlyon J.A., Theisen M., Marconi R.T.: The *bdr* gene families of the Lyme disease and relapsing fever spirochetes: potential influence on biology, pathogenesis, and evolution. *Emerg. Infect. Dis.* **6**, 110–122 (2000)
65. Rybchin V.N., Svarchevsky A.N.: The plasmid prophage N15; a linear DNA with covalently closed ends. *Mol. Microbiol.* **33**, 895–903 (1999)
66. Sakaguchi K.: Invertrons, a class of structurally and functionally related genetic elements that includes linear DNA plasmids, transposable elements, and genomes of adeno-type viruses. *Microbiol. Rev.* **54**, 66–74 (1990)
67. Salas M.: Protein-priming of DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 39–71 (1991).
68. Salas M.: Mechanism of initiation of linear DNA replication in prokaryotes. *Genet. Eng.* **21**, 159–171 (1999)
69. Stewart P., Chaconas G., Rosa P.: Conservation of plasmid maintenance functions between linear and circular plasmids in *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* **185**, 3202–3209 (2003)
70. Stewart P.E., Byram R., Grimm D., Tilly K., Rosa P.A.: The plasmids of *Borrelia burgdorferi*: essential genetic elements of a pathogen. *Plasmid*, **53**, 1–13 (2005)
71. Stewart P., Rosa P.A., Tilly K.: Linear plasmids in bacteria: common origins, uncommon ends (w) Plasmid biology, red. B.E. Funnell, G.J. Phillips, ASM Press, Washington DC, 2003, s. 291.
72. Stoll A., Cullum J.: Improved method for the isolation and visualization of terminal protein-bound DNA fragment in actinomycetes. *Biotechniques*, **29**, 743–745 (2000)
73. Stoppel R.D., Meyer M., Schlegel H.G.: The nickel resistance determinant cloned from the enterobacterium *Klebsiella oxytoca*: conjugational transfer, expression, regulation and DNA homologies to various nickel-resistant bacteria. *Biometals*, **8**, 70–79 (1995)
74. Stromsten N.J., Bamford D.H., Bamford J.K.: *In vitro* packing of PRD1; a common mechanism for internal-membrane viruses. *J. Mol. Biol.* **348**, 617–629 (2005).
75. Strother K.O., de Silva A.: Role of *Borrelia burgdorferi* linear plasmid 25 in infection of *Ixodes scapularis* ticks. *J. Bacteriol.* **187**, 5776–81 (2005)
76. Tabuchi N., Mitani H., Sieno S., Fukunaga M.: The 44-kb linear plasmid molecule in the relapsing fever agent *Borrelia duttonii* strain Ly serve as a preservation of *vmp* genes. *Microbiol. Immunol.* **44**, 1071–1074 (2002)
77. Thomas C.A., Saigo K., Mcleod E., Ito J.: The separation of DNA segments attached to protein. *Anal. Biochem.* **93**, 158–166 (1979)
78. Top E.M., Moenne-Loccoz Y., Pembroke T., Thomas C.M.: Phenotypic traits conferred by plasmids (w) The horizontal gene pool. Bacterial plasmids and gene spread, s. 249–285, red. C.M. Thomas, Hardwood Academic Publ. 2000
79. Volff J.N., Altenbuchner J.: A new beginning with new ends: linearisation of circular chromosomes during bacterial evolution. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**, 143–150 (2000)
80. Warren R., Hsiao W.W., Kudo H., Myhre M., Dosanjh M., Petrescu A., Kobayashi H., Shimizu S., Miyauchi K., Masai E., Yang G., Stott J.M., Schein J.E., Shin H., Khattria J., Smailus D., Butterfield Y.S., Siddiqui A., Holt R., Marra M.A., Jones S.J., Mohn W.W., Brinkman F.S., Fukuda M., Davies J., Eltis L.D.: Functional characterization of a catabolic plasmid from polychlorinated-biphenyl-degrading *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *J. Bacteriol.* **186**, 7783–7795 (2004)
81. Weaver D., Karoonuthaisiri N., Tsai H.H., Huang C.H., Ho M.L., Gai S., Patel K.G., Huang J., Cohen S.N., Hopwood D.A., Chen C.W., Kao C.M.: Genome plasticity in *Streptomyces*: identification of 1 Mb TIRs in the *S. coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol. Microbiol.* **51**, 1535–1550 (2004)
82. Włodarczyk M.: Różnorodność cech fenotypowych kodowanych przez plazmidy. *Kosmos*, **51**, 241–254 (2002)
83. Włodarczyk M., Nowicka B.: Plazmidy liniowe – nowa forma pozachromosomowych elementów genetycznych. *Post. Mikrobiol.* **28**, 3–16 (1989)
84. Włodarczyk M., Rudzicz G.: Megaplazmidy – próba definicji, rozpowszechnienie i różnorodność kodowanych fenotypów. *Post. Mikrobiol.* **44**, 3–16 (2005)
85. Yamasaki M., Kinashi H.: Two chimeric chromosomes of *Streptomyces coelicolor* A3(2) generated by single crossover of the wild-type chromosome and linear plasmid SCP1. *J. Bacteriol.* **186**, 6553–6559 (2004)
86. Yang C.C., Huang C.H., Li C.Y., Tsay Y.G., Lee S.C., Chen C.W.: The terminal proteins of linear *Streptomyces* chromosomes and plasmids. A novel class of replication priming proteins. *Mol. Microbiol.* **43**, 297–305 (2002)
87. Zielenkiewicz U., Cegłowski P.: Mechanisms of plasmid stable maintenance with special focus on plasmid addiction systems. *Acta Biochem. Polon.* **48**, 1003–1023 (2001)
88. Zielenkiewicz U., Cegłowski P.: Mechanizmy stabilnego dziedziczenia plazmidów. *Kosmos*, **51**, 297–304 (2002)
89. Zückert W.R., Meyer J.: Circular and linear plasmids of Lyme disease spirochetes have extensive homology: characterization of a repeated DNA element. *J. Bacteriol.* **178**, 2287–2298 (1996)

Agnieszka Mrozik, Katarzyna Hupert-Kocurek, Sylwia Łabużek

Katedra Biochemii Uniwersytetu Śląskiego
ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, e-mail: amrozik@us.edu.pl

Wpłynęło w marcu 2005 r.

1. Wstęp. 2. Budowa lipaz i mechanizm lipolizy. 3. Klasyfikacja lipaz. 4. Mechanizmy regulacji syntezy lipaz. 5. Mechanizmy sekrecji i fałdowania lipaz. 6. Czynniki wpływające na syntezę lipaz. 7. Lipazy w biotechnologii. 8. Podsumowanie

Lipases of genera *Pseudomonas* and *Burkholderia* and their applications in biotechnology

1. Introduction. 2. Lipases structure and mechanism of lipolysis. 3. Lipases classification. 4. Regulation of lipase synthesis. 5. Mechanisms of secretion and lipase folding. 6. Factors affecting lipase synthesis. 7. Lipases in biotechnology. 8. Summary

Abstract: Lipases (triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) catalyze the hydrolysis and trans-esterification of triglycerides, enantioselective synthesis, and the hydrolysis of a variety of esters. According to their substrate specificity lipases are divided into three groups. The first group contains lipases showing no positional and no specificity to the chemical structure of fatty acid. Lipases of the second group hydrolyze only primary ester bonds while those of the third group exhibit a pronounced fatty acid preference. Lipases, in contrast to esterases, are activated only when absorbed to an oil-water interface and do not hydrolyze dissolved substrates in the bulk fluid. They are produced by many strains of bacteria, especially of the genus *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter* and *Staphylococcus*, and fungi, for example *Aspergillus terreus* and *Fusarium heterosporum*.

Microbial lipases have molecular weight of 19–60 kDa and are produced in the end of logarithmic phase of growth. All enzymes exhibit a characteristic folding pattern known as the α/β -hydrolyze fold. Their active-site is composed of the catalytic triad serine, histidine and an acid residue, Asp or Glu. Based on sequence of aminoacid, *Pseudomonas* and *Burkholderia* lipases were classified into three families. Lipases from families I and II show more similarities, whereas family III lipases are larger (50 kDa) and unrelated to the other lipases.

All known bacterial lipases are extracellular enzymes requiring their translocation through the inner and outer membranes. Lipases of *Pseudomonas* are secreted by two types of secretion pathways: ABC exporters and general secretary pathway (GSP). Efficient secretion of lipases is coupled to correct folding. This process involves specific foldase and unspecific Dsb-proteins.

Because of their wide-ranging significance, lipases remain a subject of intensive studies. Researches of lipases are focused particularly on structural characterization, elucidation of mechanism of action, kinetics, sequencing and cloning of lipase genes, folding and secretion. Lipases find promising applications in organic chemical processing, detergent production, synthesis of biosurfactants, the oleochemical industry, the dairy industry, the agrochemical activity, paper manufacture, nutrition, cosmetics and pharmaceutical processing.

Słowa kluczowe: lipazy, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, regulacja, wydzielanie

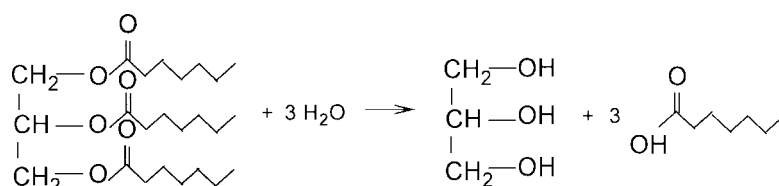
Key words: lipases, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, regulation, secretion

1. Wstęp

Lipazy (acylohydrolazy triacyloglicerolowe, EC 1.1.1.3.) należą do enzymów katalizujących reakcje hydrolizy i *trans*-estryfikacji triacylogliceroli, enancjoselektywną syntezę i hydrolizę różnych esterów. Zdolność do ich syntezy posiada wiele rodzajów bakterii, jak na przykład *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter* i *Staphylococcus* [9, 19, 35, 39]. W ciągu ostatnich lat klasyfikacja bakterii, szczególnie Gram-ujemnych, ulega zmianie w związku z zastosowaniem do identyfikacji nowoczesnych metod biologii molekularnej. Dotychczasowa systematyka bakterii oparta przede wszystkim na właściwościach fenotypowych została uzupełniona o nowe cechy genotypowe i filogenetycz-

ne. Wynikiem tego było zaklasyfikowanie wielu gatunków bakterii rodzaju *Pseudomonas* do nowo wyodrębnionego rodzaju *Burkholderia*. Podobnie wiele bakterii z rodzaju *Corynebacterium* należy obecnie do rodzaju *Propionibacterium* [4]. Zdolność syntezy lipaz posiadają także grzyby mikroskopowe *Aspergillus terreus*, *Fusarium heterosporum* i *Rhizomucor miehei* [1, 19, 40].

Lipazy bakteryjne są enzymami zewnątrzkomórkowymi o masie cząsteczkowej 19–60 kDa, wydzielonymi do podłoża hodowlanego w późnej fazie logarytmicznego wzrostu [25]. Na ich syntezę oraz sekrecję wpływa wiele czynników środowiskowych, takich jak: rodzaj źródła węgla i azotu, jony, obecność niemetalizowanych przez bakterie polisacharydów oraz temperatura i pH [24].



Rys. 1. Reakcja hydrolizy triacyloglicerolu katalizowana przez lipazę

Duże zainteresowanie lipazami bakteryjnymi wiąże się z ich rolą jako czynników wirulencji bakterii chorobotwórczych oraz ich biokatalizatorów wykorzystywanych w wielu procesach biotechnologicznych, na przykład przy produkcji papieru, detergentów, syntezach organicznych oraz w przemyśle spożywczym [25, 36, 48].

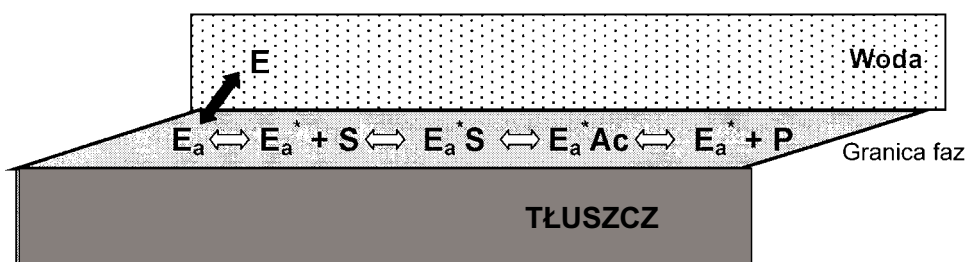
Badania ostatnich lat obejmują prace nad wyjaśnieniem mechanizmów regulujących syntezę lipaz w komórkach bakteryjnych, ich sekrecję oraz fałdowanie. Regulacja może dotyczyć etapu transkrypcji struktury, translacji białka enzymatycznego oraz jego sekrecji przez błony. Dokładne poznanie tych mechanizmów umożliwi zastosowanie udoskonalonych lipaz do otrzymywania wysokowartościowych związków przemysłowych i farmaceutycznych [3, 13, 20, 51].

2. Budowa lipaz i mechanizm lipolizy

Lipazy są rozpuszczalnymi w wodzie enzymami, katalizującymi reakcje hydrolizy triacylogliceroli i wolnych kwasów tłuszczowych. Schemat tej reakcji przedstawia rys. 1. Wszystkie znane lipazy bakteryjne, podobnie jak esterazy serynowe, tioesterazy czy bromoperoxydaza A2 należą do klasy hydrolaz o strukturze trzeciorzędowej α/β . Rdzeń lipaz tworzy 8 różnych łańcuchów β ($\beta 1 - \beta 8$) połączonych 6 fragmentami o strukturze α -helisy (A-F). W miejscu aktywnym enzymu znajdują się trzy aminokwasy: seryna, kwas asparaginowy lub glutaminowy i histydyna. U *P. aeruginosa* i *Burkholderia glumae* (*Pseudomonas glumae*) seryna znajduje się w pozycji 82 łańcucha peptydowego, kwas asparaginowy w pozycji 229, a histydyna

w pozycji 251 [23, 40]. Seryna z aktywną grupą $-OH$ zajmuje pozycję przy końcu C łańcucha polipeptydowego $\beta 5$ w obrębie wysoce konserwatywnego penta-peptydu o sekwencji aminokwasów GX SXG, tworzącego motyw „ β -zakręt- α ”. Hydroliza triacyloglicerolu rozpoczyna się nukleofilowym atakiem tlenu grupy $-OH$ seryny na karbonylowy atom węgla wiązania estrowego, co prowadzi do powstania produktu pośredniego. W reakcji tej obecna w centrum aktywnym histydyna zwiększa nukleofilowość grupy hydroksylowej seryny. Jej pierścień imidazolowy przejmuje ładunek dodatni, stabilizowany ujemnym ładunkiem pochodzącym z grupy karboksylowej kwasu asparaginowego lub glutaminowego. Produkt pośredni stabilizują dwa wiązania wodorowe utworzone z wiązaniami amidowymi aminokwasów centrum aktywnego. Następnie uwalniany jest alkohol, podczas gdy enzym tworzy nadal kompleks z resztą acylową kwasu tłuszczowego. Ostatecznie reszta acylowa jest uwalniana w wyniku nukleofilowego ataku jonu hydroksylowego, a enzym ulega regeneracji [24, 25].

Unikatową cechą lipaz jest zdolność katalizy międzyfazowej, czyli przeprowadzania reakcji w układach typu tłuszcz-woda. Ze względu na to, że taka reakcja nie zachodzi w roztworze homogenicznym, trudno opisać jej przebieg stosując równanie Michaelisa-Menten. Substraty lipolizy tworzą zazwyczaj mieszaninę będących w równowadze form monometrycznych, micellarnych i w postaci emulsji [51, 52, 57]. Schemat oddziaływania lipazy z substratem na granicy faz przedstawia rys. 2. Wyjątek wśród lipaz stanowią lipazy gatunków *B. glumae* i *P. aeruginosa*, które nie wymagają aktywacji międzyfazowej [7, 58]. Lipazy te hydrolizują acyloglicerole zarówno w postaci emulsji,



Rys. 2. Schemat oddziaływania lipazy z substratem na granicy faz woda-tłuszcz, gdzie E oznacza enzym, E_a – enzym zaobserwowany na granicy faz, E_a^* – enzym w postaci aktywnej, S – substrat, E_a^*S – kompleks enzym-substrat, E_a^*Ac – produkt przejściowy, P – produkt [24, 51]

działając jak typowe lipazy, jak i substraty monometryczne, rozpuszczone w wodzie, podobnie jak typowe esteryazy [24].

Na podstawie analizy krystalograficznej w budowie lipaz wykazano obecność hydrofobowego oligopeptydu o strukturze α -helikalnej, o charakterze „wieczka” osłaniającego miejsce aktywne enzymu [3, 24, 25]. W środowisku hydrofobowym oligopeptyd odchyła się odkrywając centrum katalityczne, które staje się dostępne dla substratu. Obecność oligopeptydu odpowiada za aktywację międzyfazową lipaz. Stwierdzono, że u bakterii *B. glumae* i *P. aeruginosa* oligopeptyd „wieczka” jest krótszy niż w większości bakteryjnych lipaz. Na przykład u *B. glumae* oligopeptyd ten buduje 21 aminokwasów od Tyr 129 do Leu 149 [7]. Krótszy oligopeptyd zmniejsza hydrofobową powierzchnię oddziaływania enzymu z hydrofobową fazą rozpuszczalnika, co prawdopodobnie tłumaczy brak aktywacji enzymów na granicy faz [7, 24, 58].

3. Klasyfikacja lipaz

Lipazy bakteryjne ze względu na powinowactwo do substratu podzielono na trzy grupy [24]. Do pierwszej należą lipazy niespecyficzne względem chemicznej struktury kwasów tłuszczowych syntetyzowane przez *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes* (*Corynebacterium viscosum*). Drugą stanowią enzymy, głównie bakterii rodzaju *Pseudomonas*, hydrolizujące tylko wiązania estrowe przy C1 i C3 glicerolu. Natomiast do trzeciej grupy należą enzymy charakteryzujące się wysoką specyficznością w stosunku do budowy kwasów tłuszczowych, na przykład lipaza B z *Geotrichum candidum* hydrolizująca wiązania estrowe między glicerolem a nienasyconymi kwasami tłuszczowymi z podwójnym wiązaniem między C9 i C10.

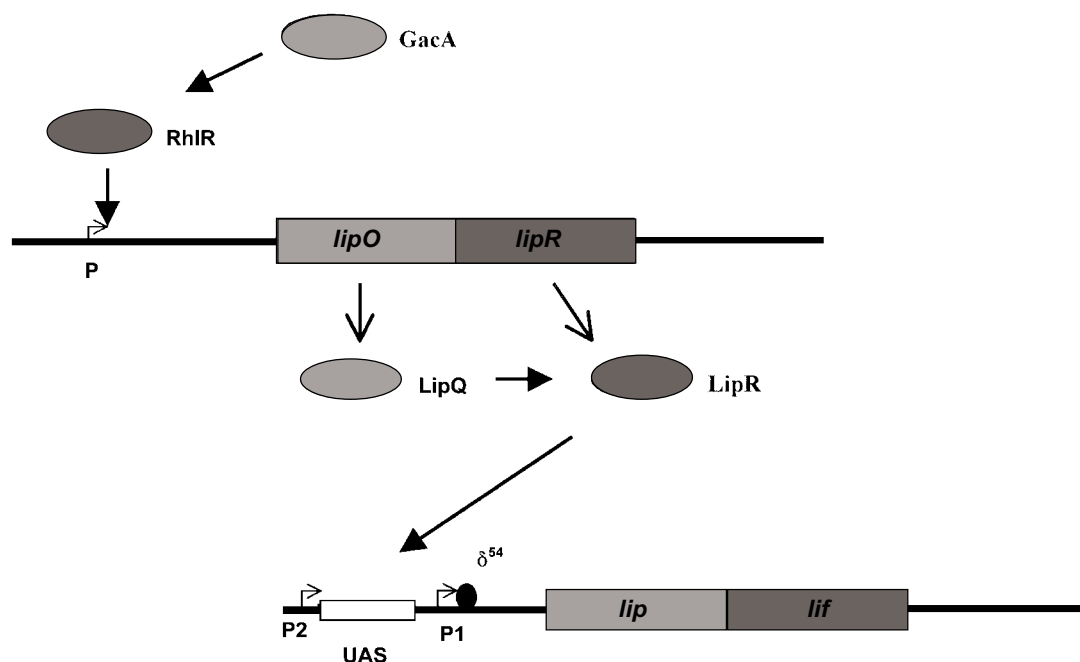
Ze względu na dużą różnorodność, lipazy bakterii rodzajów *Pseudomonas* i *Burkholderia* klasyfikuje się biorąc pod uwagę hemologię sekwencji aminokwasowych. Na tej podstawie wyodrębniono trzy rodziny lipaz (I–III) [15, 16, 24]. Do I należą lipazy bakterii *P. aeruginosa*, *P. alcaligenes*, *P. fragi* i *Pseudomonas* sp. 109. Składają się one z 285 aminokwasów, posiadają mniejszą masę cząsteczkową (M_r) wynoszącą ok. 30 000 i zawierają dwie cysteiny tworzące wiązanie disulfidowe. Enzymy te do sekrecji i prawidłowego pofałdowania wymagają produktu dodatkowego genu, znanego pod nazwą lipazo-specyficznej foldazy (Lif). Prototypem lipaz z tej grupy jest enzym pochodzący z dzikiego szczepu *P. aeruginosa* PAO1 [58]. Do rodziny II należą lipazy wykazujące 60% homologii aminokwasów w stosunku do lipaz rodziny I. Charakteryzują się masą cząsteczkową M_r ok. 33 000, składają się z 320 aminokwasów i zawierają jedno wiązanie

disulfidowe. Lipazy te również wymagają do osiągnięcia aktywnej enzymatycznie konformacji obecności dodatkowego białka Lif [16, 21]. Prototypem lipaz z tej rodziny są enzymy bakterii *Burkholderia cepacia* (*Pseudomonas cepacia*) i *B. glumae* [14, 27]. Ostatnio do tej rodziny zaklasyfikowano nową lipazę otrzymaną przez L i t t h a u e r a i wsp. [35] z bakterii *P. luteola*. Trzecią rodzinę stanowią lipazy bakterii *P. fluorescens*. Są one znacznie większe, gdyż zawierają 475 aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym i odznaczają się wyższą masą cząsteczkową wynoszącą ok. 50 000. Lipazy te w odróżnieniu od lipaz rodziny I i II nie posiadają typowych N-końcowych sekwencji sygnałowych, nie zawierają cysteiny i nie wymagają obecności białka Lif [24].

4. Mechanizmy regulacji syntezy lipaz

Najlepiej poznanym i opisanym operonem regulującym syntezę lipaz bakteryjnych jest operon *lip/lif* szczepu *P. aeruginosa* [45]. Operon ten tworzą dwa geny struktury, *lip* kodujący lipazę oraz *lif* kodujący specyficzną foldazę. Geny te znajdują się pod kontrolą białka regulatorowego LipR, pełniącego rolę aktywatora. Białko LipR jest częścią systemu regulacyjnego *lipQ/lipR*, znajdującego się pod dodatkową kontrolą białka regulatorowego GacA. Białko to aktywuje transkrypcję *RhIR*, które odpowiada za włączanie transkrypcji genów *lipQ/lipR*, Gen *LipQ* kodujący kinazę, białko regulatorowe odbierające sygnał ze środowiska lub sygnał związany z tworzeniem nieaktywnego enzymu, aktywuje białko LipR, które wpływa na ekspresję operonu *lip/lif*. Białko to przyłącza się sekwencji UAS (upstream activating sequence) poprzedzającej rozpoznawany przez czynnik σ^{54} promotor P1. Ostatnie badania wykazały obecność drugiego promotora (P2) znajdującego się około 330 pb „upstream” od promotora P1, jednakże jego rola nie jest jeszcze dokładnie wyjaśniona [45]. Schemat regulacji ekspresji operonu *lip/lif* u *P. aeruginosa* przedstawia rys. 3.

Synteza aktywnej lipazy wymaga jej prawidłowego składowania w przestrzeni periplazmatycznej oraz efektywnej sekrecji przez błonę zewnętrzną. W procesie tym uczestniczy wiele białek pomocniczych, między innymi specyficzna foldaza Lif i białka należące do systemu DsB (disulphide bond formation) [11, 55]. K h a t t a b i i wsp. [11] wskazują na istnienie nowego dodatkowego systemu, polegającego prawdopodobnie na monitorowaniu przez komórkę wydajności prawidłowego fałdowania i sekrecji lipazy. Zaburzenie stosunku prawidłowo sfałdowanej i aktywnej lipazy do nieprawidłowo sfałdowanej i nieaktywnej jej postaci stanowi sygnał dla komórki, umożliwiającą dostosowanie ekspresji genu do poziomu sekrecji poza komórkę.



Rys. 3. Schemat regulacji ekspresji operonu *lip/lif* u *Pseudomonas aeruginosa* [45]. Objasnienia w tekście

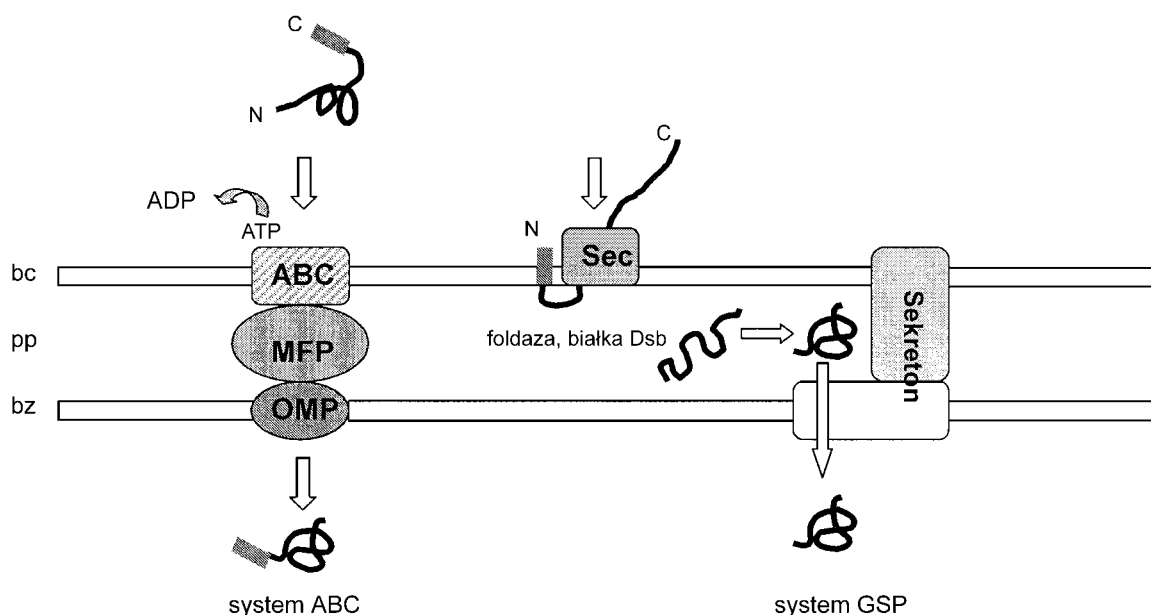
5. Mechanizmu sekrecji i fałdowania lipaz

U bakterii rodzaju *Pseudomonas* znane są dwa mechanizmy sekrecji lipaz poza komórkę: system transportu ABC (ATP binding cassette) i system transportu GSP (general secretory pathway) [36, 41, 45]. System ABC służy do transportu bakteryjnych lipaz pozbawionych N-końcowej sekwencji sygnałowej. W skład tego systemu wchodzi trzy rodzaje białek. ATPaza, białko MFP (membrane fusion protein) i OMP (outer membrane protein). ATPaza zlokalizowana jest w błonie komórkowej i nadaje systemowi transportu specyficzność substratową. Białko to posiada dużą N-końcową domenę o charakterze hydrofobowym, przechodzącą przez błonę oraz wysoce konserwatywną C-końcową domenę cytoplazmatyczną. Domena ta zawiera dwa miejsca wiązania ATP, znane pod nazwą kasety wiążącej ATP [32, 41]. Białko MFP jest zakotwiczone w błonie cytoplazmatycznej za pomocą dużej hydrofobowej domeny skierowanej do przestrzeni peryplazmatycznej, natomiast C-końcowa domena łączy się z białkiem OMP zlokalizowanym w błonie zewnętrznej. System ABC funkcjonuje jako kanał, przechodzący przez peryplazmę i umożliwia sekrecję białka bezpośrednio na zewnątrz komórki [5, 45]. System transportu ABC opisano u bakterii *P. fluorescens* i *P. brassicacearum* [8, 9, 26, 45].

Drugim mechanizmem sekrecji lipaz poza komórkę u bakterii rodzaju *Pseudomonas* jest transport znany jako system GSP, zachodzący z udziałem białkowego kompleksu – sekretonu [2, 12, 13]. Transport ten zachodzi w dwóch etapach. W pierwszym etapie lipaza

zostaje przetransportowana przez błonę cytoplazmatyczną z udziałem kompleksu białek Sec do przestrzeni peryplazmatycznej, co warunkuje obecność 26-amino-kwasowej N-końcowej sekwencji sygnałowej w enzymie. W etapie drugim lipaza pokonuje barierę w postaci błony zewnętrznej, w czym uczestniczy wielobiałkowy kompleks – sekreton. Białka tego kompleksu kodowane są przez 12 genów *xpc*, zorganizowanych w dwa operony [12, 54]. Produkty transkrypcji tych genów zlokalizowane są zarówno w błonie cytoplazmatycznej, jak i zewnętrznej. Jedno z tych białek XcpQ funkcjonuje jako integralne białko błony zewnętrznej, tworzy wielopodjednostkowy por w kształcie pierścienia o średnicy 95Å [6]. Taki rodzaj transportu lipazy występuje u gatunków *P. aeruginosa* i *P. alcaligenes* [2, 17]. Mechanizm transportu przy udziale błonowego sekretonu, jak również struktura i funkcje budujących go białek nie są jeszcze dokładnie poznane i stanowią przedmiot intensywnych badań. Mechanizmy sekrecji lipaz przy udziale systemu ABC i GSP u bakterii rodzaju *Pseudomonas* pokazano na rys. 4.

Podczas transportu lipazy ulegają sfałdowaniu w przestrzeni peryplazmatycznej. W procesie tym uczestniczą białka Lif, specyficzne foldazy kodowane przez gen *lif* operonu *lip/lif*. Rola foldaz jest trudna do badania, ponieważ proces fałdowania lipazy jest ściśle powiązany z jej sekrecją. Najlepiej poznano foldazy u gatunków *B. cepacia*, *B. glumae* i *P. aeruginosa* [11, 33, 45]. Foldazy tych bakterii są białkami peryplazmatycznymi zakotwiczonymi w błonie cytoplazmatycznej hydrofobową N-końcową domeną. Związanie enzymu z błoną komórkową nie wpływa na zdolności katali-



Rys. 4. Mechanizmy sekrecji lipaz przy udziale systemu ABC i GSP u bakterii rodzaju *Pseudomonas* [26, 41, 45], bc – błona cytoplazmatyczna, pp – przestrzeń periplazmatyczna, bz – błona zewnętrzna

tyczne enzymu, ale prawdopodobnie zapobiega jego wydzieleniu z komórki [44, 45, 50]. Poza specyficznymi foldazami w fałdowaniu lipaz biorą udział białka z grupy Dsb, katalizujące reakcję tworzenia wiązań disulfidowych. Na podstawie badań z użyciem szczepu *P. aeruginosa*, u którego 2 reszty cysteiny w lipazie zastąpiono seryną, stwierdzono niską aktywność wydzielanego enzymu. Wskazuje to, że obecność wiązań disulfidowych jest niezbędna do uzyskania aktywnego enzymu i jego sekrecji przez błonę zewnętrzną [11, 23].

6. Czynniki wpływające na syntezę lipaz

Z licznych prac wynika, że na syntezę oraz aktywność lipaz w komórkach bakteryjnych wpływa wiele czynników, takich jak: rodzaj i stężenie źródła węgla i azotu, jony, pH podłoża oraz temperatura. Lee i wsp. [31] wykazali, że alkaliczna lipaza (pH 8,5) produkowana przez szczep *P. fluorescens* S1K W1 charakteryzowała się najwyższą aktywnością 7395 U/mg), kiedy bakterie hodowano w pożywce ze zemulgowaną 0,1% oliwą jako jedynym źródłem węgla. Podobnie na wzrost aktywności lipazy szczepu *P. aeruginosa* KKA-5 wpływa obecność 2% oleju rycynowego. Enzym ten hydrolizował 90% dodanego do podłoża oleju rycynowego w zakresie pH 7–10, ale najwyższą aktywnością charakteryzował się w pH 8,5 [49]. Wykazano, że na syntezę lipaz wpływa także dodatek do hodowli różnych detergentów, takich jak: Triton X-100, Tween 80 i Spans [24, 34]. Na przykład synteza alkalicznej lipazy szczepu *P. pseudoalcaligenes* F-111 wzrastała 50-krotnie w podłożu zawierającym zarówno oliwę, jak i Tri-


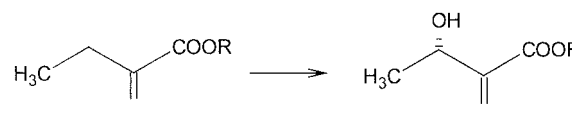
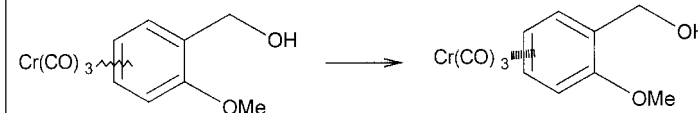
ton X-100 w porównaniu z podłożem bez dodatku detergentu [34]. Wiele badań wskazuje, że na stabilność lipaz wpływa rodzaj użytego źródła azotu. Termostabilna lipaza szczepu *Pseudomonas* sp. KW1-56 była najbardziej stabilna, gdy bakterie hodowano w podłożu zawierającym pepton (2%) i ekstrakt drożdżowy (0,1%). Wykazano, że po 24 godzinach inkubacji w temperaturze 60°C lipaza ta zachowywała 06% swej wyjściowej aktywności [22]. Podobnie większą stabilnością odznaczała się lipaza *P. aeruginosa* KKA-5, hodowanego w obecności polipeptonu (4%) i ekstraktu drożdżowego (0,05%) oraz alkaliczna lipaza *P. alcaligenes* F-111 produkowana w podłożu zawierającym mąkę sojową (1%) pepton (1,5%) i ekstrakt drożdżowy (0,5%) [34, 49].

Synteza i aktywność lipaz zależy również od obecności jonów w podłożu hodowlanym. Sharon i wsp. [49] obserwowali maksymalną produkcję lipazy przez szczep *P. pseudoalcaligenes* KKA-5 w obecności jonów Mg^{2+} . Usunięcie tych jonów z podłoża powodowało 50-krotny spadek produkcji lipazy, natomiast wzbogacenie podłoża w jony Ca^{2+} nie miało wpływu na syntezę lipazy. W odróżnieniu jony Ca^{2+} wpływały zarówno na syntezę jak i na aktywność lipazy szczepu *P. fluorescens* S1K W1. Związanie jonów Ca^{2+} powodowało zmianę struktury drugorzędowej białka, polegającej na zwiększeniu udziału z 33 do 55% struktur α i β w budowie enzymu. Zmiany konformacji lipazy prawdopodobnie prowadzą do uzyskania natywnej struktury enzymu [30].

Wykazano, że u bakterii na ostatni etap sekrecji lipaz ma wpływ obecność w podłożu niemetalizowanych polisacharydów, takich jak glikogen, hialuronian, czy jak u *P. aeruginosa* alginian. Przypuszcza się,

Tabela I

Przykłady reakcji tworzenia enancjomerów katalizowanych przez lipazy bakterii *Pseudomonas* [25]

Katalizowana reakcja	Wydajność reakcji	% ee*
	92%	87%
	41%	95%
	47%	97%

*%ee – procentowy udział jednego z enancjomerów w mieszaninie składającej się z dwóch enancjomerów, obliczony jako $ee = \%R - \%S$

że uwolnienie lipazy z błony zewnętrznej następuje na skutek jej bezpośredniego oddziaływania z cukrem. Taką możliwość może potwierdzać praktyczne wykorzystanie alginianu do izolacji i oczyszczania lipazy z hodowli *P. aeruginosa* [24].

7. Lipazy w biotechnologii

Lipazy bakteryjne są atrakcyjnym narzędziem dla biotechnologii z wielu powodów. Są stabilne w rozpuszczalnikach organicznych, nie wymagają kofaktorów, charakteryzują się niską specyficznością substratową i wykazują wysoką enancjoselektywność [25]. Lipazy bakterii *Pseudomonas* nie są tak powszechnie stosowane w różnych gałęziach przemysłu, jak na przykład lipazy izolowane z grzybów *Aspergillus* czy *Rhizomucor*, ale mimo tego mają znaczenie głównie przy produkcji detergentów oraz syntezie wielu związków organicznych. Jako dodatki do detergentów stosuje się najczęściej lipazy bakterii *P. mendocina* i *P. alcaligenes*, znane pod przemysłową nazwą Lumfast i Lipomax, produkowane od 1995 roku przez Genencor International [24]. Użyteczne w produkcji detergentów lipazy charakteryzują się niską specyficznością substratową, co umożliwia hydrolizę tłuszczów o różnym składzie, stabilnością w temperaturze 30–60°C i w pH 10–11, opornością na działanie surfaktantów, na przykład sulfonianów benzenu oraz enzymów z grupy proteaz [48]. Lipazy odpowiadające takim wymaganiom uzyskuje się obecnie stosując nowoczesne techniki rekombinacji DNA i inżynierii białek [47, 59].

Innym przykładem wykorzystania na skalę przemysłową lipaz bakterii rodzaju *Pseudomonas* jest asymetryczna synteza związków organicznych. Lipazy te posiadają zdolność katalizowania wielu różnych chemo-, regio i stereoselektywnych przemian i pochodzą głównie z gatunków *P. aeruginosa* i *P. fluorescens*. Wyróżnia się dwa główne typy enancjoselektywnej biotransformacji związków organicznych: przekształcanie substratów prochiralnych w chiralne oraz kinetyczne rozdzielanie mieszaniny racematów [18]. Do niedawna substratami biotransformacji były jedynie alkohole i estry kwasów karboksylowych, natomiast obecnie wykorzystuje się α - i β -hydroksykwasów, diestry, laktony, aminy, diaminy, aminoalkohole i pochodne α - i β -aminokwasów [29, 46]. Przykładem takiej biotransformacji może być synteza optycznie czynnych δ -laktonów i γ -aminoalkoholi w wyniku transestryfikacji δ -hydroksyestrów lub β -hydroksynitryli połączonej z racemizacją alkoholu katalizowaną przez ruten [42, 43]. Podobnie 2-fenoksy-1-propanol uzyskuje się w wyniku katalizowanej przez lipazę enancjoselektywnej transestryfikacji [37]. Otrzymane tą drogą czyste enancjomery mają podstawowe znaczenie w produkcji farmaceutyków i w przemyśle agrochemicznym [53, 60]. Przykłady otrzymywania czystych enancjomerów w reakcjach katalizowanych przez lipazy z bakterii *Pseudomonas* ilustruje Tabela I.

Lipazy bakterii *Pseudomonas* służą także do syntezy wielu ważnych estrów, na przykład alkoholu izoamylowego i krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, stosowanych jako dodatki do produktów żywnościowych. Lipazę katalizującą taką reakcję produkuje

szczep *Pseudomonas pseudomallei* 12Sm w obecności n-haksadekanu jako jedyne źródła węgla. Znalazła ona zastosowanie po immobilizacji na poliwinylowej membranie w syntezie octanu izoamylowego [28]. Lipazy stosuje się również w piekarnictwie, w procesach usuwania tłuszczów z mięsa i produktów rybnych oraz w mleczarstwie przy produkcji serów [29].

8. Podsumowanie

Lipazy bakterii rodzajów *Pseudomonas* i *Burkholderia*, w porównaniu z lipazami pochodzącymi z grzybów, stanowią nadal nie w pełni poznaną grupę enzymów i tylko niewiele z nich wykorzystywanych jest na skalę przemysłową. Konieczne są dalsze badania ich struktury chemicznej oraz genów kodujących białka odpowiedzialne za ich syntezę, fałdowanie i sekrecję. Atrakcyjne wydają się badania tych enzymów z użyciem technik rekombinacji DNA i inżynierii białek, co pozwoli w przyszłości na uzyskanie nowych zrekombinowanych lipaz o znaczeniu biotechnologicznym. Szczególnie ważne wydaje się ich wykorzystanie jako biokatalizatorów w reakcjach otrzymywania związków chiralnych i czystych enancjomerów do produkcji farmaceutyków i nowych materiałów biopolimerowych. Czynniki ograniczającymi ich dotychczasowe zastosowanie na skalę przemysłową są nie tylko niedostatecznie wciąż poznana budowa i właściwości, ale także stosunkowo wysokie koszty produkcji oraz brak ustalonego optymalnego zakresu specyficzności substratowej w procesach biotechnologicznych,

Piśmiennictwo

- Adamczak M., Bednarski W.: Enhanced activity of intracellular lipases from *Rhizomucor miehei* and *Yarrowia lipolytica* by immobilization on biomass support particles. *Proc. Biochem.* **39**, 1347–1361 (2004)
- Ball G., Chapon-Hervé W., Bleves S., Michel G., Bally M.: Assembly of XcpR in the cytoplasmic membrane is required for extracellular protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **181**, 382–388 (1999)
- Bendikiene V., Surinenaite B., Juodka B., Safarikova M.: Insights into catalytic action mechanism of *Pseudomonas mendocina* 3121-1 lipase. *Enz. Microbiol. Technol.* **34**, 572–577 (2004)
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore, 2001
- Binet R., Létoffé S., Ghigo J.M., Deleplaire P., Wandersman C.: Protein secretion by Gram-negative bacteria ABC exporters – a review. *Gene*, **192**, 7–11 (1997)
- Bitter W., Koster M., Latijnhouwers M., de Cock H., Tommassen J.: Formation of oligomeric rings by XcpQ and PilQ, which are involved in protein transport across the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **27**, 209–219 (1998)
- Bornscheuer U.T., Bessler C., Srinivas R., Krishna S.H.: Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends Biotechnol.* **20**, 433–437 (2002)
- Chabeaud P., de Groot A., Bitter W., Tommassen J., Heulin T., Achouk W.: Phase-variable expression of an operon encoding extracellular alkaline protease, a serine protease homolog and lipase in *Pseudomonas brassicacearum*. *J. Bacteriol.* **183**, 2117–2120 (2001)
- Doung F., Soscia C., Lazdunski A., Nurgier M.: The *Pseudomonas fluorescens* lipase has a C-terminal secretory signal and is secreted by a three-component bacterial ABC-exporter system. *Mol. Microbiol.* **11**, 1117–1126 (1994)
- El Khattabi M.E., van Gelder P., Bitter W., Tommassen J.: Role of the lipase-specific foldase of *Burkholderia glumae* as a steric chaperone. *J. Biol. Chem.* **275**, 26885–26891 (2000)
- El Khattabi M., van Gelder P., Bitter W., Tommassen J.: Role of the calcium ion and the disulfide bond in the *Burkholderia glumae* lipase. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* **22**, 329–338 (2003)
- Filloux A., Michel G., Bally M.: GSP-dependent protein secretion in Gram-negative bacteria: Xcp-system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**, 177–198 (1998)
- Filloux A.: The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochem. Biophys. Acta*, **1694**, 163–179 (2004)
- Frenken L.G.J., Egmond M.R., Batenburg A.M., Bos J.W., Visser C., Verrips C.T.: Cloning of the *Pseudomonas glumae* lipase gene and determination of the active site residues. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3787–3791 (1992)
- Frenken L.G.J.: *Pseudomonas glumae* lipase: characterization, biogenesis and protein engineering. Ph.D. Thesis. Rijksuniversiteit Utrecht, Utrecht, 1993
- Frenken L.G.J., Bos J.W., Visser C., Müller W., Tommassen J., Verrips C.T.: An accessory gene, *lipB*, required for the production of active *Pseudomonas glumae* lipase. *Mol. Microbiol.* **9**, 579–589 (1993)
- Gerritse G., Ure R., Bizoullier F., Quax W.: The phenotype enhancement method identifies the Xcp outer membrane secretion machinery from *Pseudomonas alcaligenes* as a bottleneck for lipase production. *J. Biotechnol.* **64**, 23–28 (1998)
- Ghanem A., Aboul-Enein H.Y.: Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. *Tetrahedron: Asymmetry*, **15**, 3331–3351 (2004)
- Gulati R., Saxena R.K., Gupta R., Yadav R.P., Davidson W.S.: Parametric optimization of *Aspergillus terreus* lipase production and its potential in ester synthesis. *Proc. Biochem.* **35**, 459–464 (1999)
- Han S.-J., Back J.H., Yoon M.Y., Shin P.K., Cheong C.S., Sung M.-H., Hong S.-P., Chung I.Y., Han Y.S.: Expression and characterization of a novel enantioselective lipase from *Acinetobacter species* SY-01. *Biochimie*, **85**, 501–510 (2003)
- Hobson A.H., Buckley C.M., Aamand J.L., Jørgensen S.T., Diderichsen B., McConnell A.: Activation of a bacterial lipase by its chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5682–5686 (1993)
- Izumi T., Nakamura K., Fukase T.: Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KW1-56. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 1253–1258 (1990)
- Jaeger K.E., Ransac S., Koch H.B., Ferrato F., Dijkstra B.W.: Topological characterization and modeling of the 3D structure of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* **332**, 143–149 (1993)
- Jaeger K.E., Ransac S., Dijkstra B.W., Colson Ch., van Heuvel M., Misset O.: Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**, 29–63 (1994)

25. Jaeger K.E., Reetz M.T.: Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* **16**, 396–403 (1998)
26. Jaeger K.E., Eggert T.: Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 390–397 (2002)
27. Jørgensen S.T., Skov K.W., Diderichsen B.: Cloning, sequence, and expression of a lipase gene from *Pseudomonas cepacia*: lipase production in heterologous hosts requires two *Pseudomonas genes*. *J. Bacteriol.* **173**, 559–567 (1991)
28. Kanwar L., Goswami P.: Isolation of a *Pseudomonas lipase* produced in pure hydrocarbon substrate and its application in the synthesis of isoamyl acetate using membrane-immobilised lipase. *Enz. Microbiol. Technol.* **31**, 727–735 (2002)
29. Kazlauskas R.J., Bornscheuer U.T.: Biotransformation with lipases (w) *Biotechnology*, red. Rehm H.J., Pihler G., Stadler A., Kelly P.J.W., WCH, New York, 1998, t. 8, s. 37–192
30. Kim K.R., Kwon D.Y., Yoon S.H., Kim W.Y., Kim K.H.: Purification, refolding, and characterization of recombinant *Pseudomonas fluorescens* lipase. *Protein Expression Purif.* **39**, 124–129 (2005)
31. Lee Y.P., Chung G.H., Rhee J.S.: Purification and characterization of *Pseudomonas fluorescens* S1K WI Lipase expressed in *Escherichia Coli*. *Biochem. Biophys. Acta*, **1169**, 156–164 (1993)
32. Létoffé S., Ghigo J.M., Wandersman C.: Secretion of the *Serratia marcescens* HasA protein by an ABC transporter. *J. Bacteriol.* **176**, 5372–5377 (1994)
33. Liebeton K., Zacharias A., Jaeger K.E.: Disulfide bond in *Pseudomonas aeruginosa* lipase stabilizes the structure but is not required for interaction with its foldase. *J. Bacteriol.* **283**, 597–603 (2001)
34. Lin S.F., Chiou C.M., Yeh C., Tsai Y.C.: Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1093–1095 (1996)
35. Litthauer D., Ginster A., van Eeden Skein E.: *Pseudomonas luteola* lipase: a new member of the 320-residue *Pseudomonas lipase* family. *Enz. Microbiol. Technol.* **30**, 209–215 (2002)
36. Ma Q, Zhai Y., Schneider J.C., Ramseier T.M., Saier M.H.: Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*. *Biochem. Biophys. Acta*, **1611**, 223–233 (2003)
37. Miyazawa T., Yukawa T., Chezi S., Yanagihara R., Yamada T.: Resolution of 2-phenoxy-1-propanols by *Pseudomonas species* lipase catalyzed highly enantioselective transesterification: influence of reaction conditions on the enantioselectivity toward primary alcohol. *Biotechnol. Lett.* **20**, 235–238 (1998)
38. Nagao T., Shimada Y., Sugihara A., Tominaga Y.: Increase in stability of *Fusarium heterosporum* lipase. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* **17**, 125–132 (2002)
39. Noble M.E.M., Cleasby A., Johnson L.N., Egmond M.R., Frenken L.G.J.: The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Lett.* **331**, 123–128 (1993)
40. Oh B.-C., Kim H.-K., Lee J.-K., Kang S.-C., Oh T.-K.: *Staphylococcus haemolyticus* lipase: biochemical properties, substrate specificity and gene cloning. *FEMS Microbiol. Lett.* **179**, 385–392 (1999)
41. Omori K., Idei A.: Gram-negative bacterial ATP-binding cassette protein exporter family and diverse secretory proteins. *J. Biosci. Bioeng.* **95**, 1–12 (2003)
42. Pàmies O., Bäckvall J.-E.: Efficient lipase-catalyzed kinetic resolution and dynamic kinetic resolution of β -hydroxy nitriles. A route useful precursors for γ -amino alcohols. *Adv. Synth. Catal.* **343**, 726–731 (2001)
43. Pàmies O., Bäckvall J.-E.: Enzymatic kinetic resolution and chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of δ -hydroxy esters. An efficient route to chiral δ -lactones. *J. Org. Chem.* **67**, 1261–1265 (2002)
44. Quyen D.T., Schmidt-Dannert C., Schmid R.D.: High-level formation of active *Pseudomonas cepacia* lipase after heterologous expression of the encoding gene and its modified chaperone in *Escherichia coli* and rapid in vitro refolding. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 787–794 (1999)
45. Rosenau F., Jaeger K.E.: Bacterial lipases from *Pseudomonas*: regulation of gene expression and mechanisms of secretion. *Biochimie*, **82**, 1023–1032 (2000)
46. Rubin B., Dennis E.A. (red.) Lipases: Part A (w) *Biotechnology*, Academic Press, New York, 1997, t. 286, s. 1–563
47. Schmidt-Dannert C.: Recombinant microbial lipases for biotechnological applications. *Biorg. Med. Chem.* **7**, 2123–2130 (1999)
48. Sharma R., Chisti Y., Banerjee U.C.: Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* **19**, 627–662 (2001)
49. Sharon C., Furugoh S., Yamakido T., Ogawa H., Kato Y.: Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 304–307 (1998)
50. Shibata H., Kato H., Oda J.: Molecular properties and activity of amino-terminal truncated forms of lipase activator protein. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 354–357 (1998)
51. Svendsen A.: Lipase protein engineering. *Biochem. Biophys. Acta*, **1543**, 223–238 (2000)
52. Svendsen A., Borch K., Barfoed M., Nielsen T.B., Gormsen E., Patkar S.A.: Biochemical properties of cloned lipases from *Pseudomonas* family. *Biochem. Biophys. Acta*, **1259**, 9–17 (1995)
53. Tanaka K., Yoshida K., Sasaki C., Osano Y.T.: Practical asymmetric synthesis of the herbicide (S)indanofan via Lipase-catalyzed kinetic resolution of a diol and stereo selective acid-catalyzed hydrolysis of a chiral epoxide. *J. Org. Chem.* **67**, 3131–3133 (2002)
54. Tommassen J., Filloux A., Bally M., Murgier M., Lazdunski A.: Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**, 73–90 (1992)
55. Urban A., Leipelt M., Eggert T., Jaeger K.E.: DsbA and AsbC affect extracellular enzyme formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **183**, 587–596 (2001)
56. Van Tilbeurgh H., Egloff M.P., Martinez V., Rugani N., Verger R., Cambillau C.: Interfacial activation of the lipase procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. *Nature*, **362**, 814–820 (1993)
57. Verger R.: Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol.* **15**, 32–38 (1997)
58. Wohlfarth S., Hoesche C., Strunk C., Winkler U.K.: Molecular genetics of the extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Grn. Microbiol.* **138**, 1325–1335 (1992)
59. Yang J., Koga Y., Nakano H., Yamene T.: Modifying the chain-length selectivity of the lipase from *Burkholderia cepacia* KWI-56 through *in vitro* combinatorial mutagenesis in the substrate-binding site. *Protein Eng.* **15**, 147–152 (2002)
60. Zhu B., Panek J.S.: Methodology based on chiral silanes in the synthesis of polypropionate-derived natural products – total synthesis of ephithilone A. *Eur. J. Org. Chem.* **1**, 1701–1714 (2001)

Magdalena Karaś, Wincenty Drożański, Ryszard Russa

Zakład Mikrobiologii Ogólnej, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii,
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin, e-mail:russa@biotop.umcs.lublin.pl

Wpłynęło w maju 2005 r.

1. Budowa chemiczna peptydoglikanu. 2. Właściwości fizyczne mureiny bakterii Gram-ujemnych. 3. Modele architektury peptydoglikanu. 3.1. Modele warstwowej mureiny. 3.2. Model trójwymiarowej mureiny w postaci rusztowania. 4. Wzrost woreczka mureinowego u bakterii Gram-ujemnych. 4.1. Synteza peptydoglikanu w modelu pasmowej mureiny. 4.2. Wzrost peptydoglikanu w modelu mureiny w postaci rusztowania. 5. Topografia wstawek nowo syntetyzowanego peptydoglikanu. 6. Podsumowanie

Peptidoglycan rod shape Gram-negative bacteria

Abstract: The murein sacculus is the essential part of cell wall of almost all eubacteria. It is needed to withstand the cytoplasmic turgor pressure and maintain a specific cell shape. The sacculus of bacteria appears to be a single molecule covering the inner membrane of bacteria. During bacteria growth the sacculus is enlarged continuously without rupture despite of its very thin structure in Gram-negative cells. In this review some known data about physical properties of murein and two concepts of its three dimensional structure are presented. One of them assumes that murein glycans are arranged parallel to the membrane and another one try to prove they extend perpendicular to it. They were shown advantages and disadvantage of both types of models. Recent studies with usage of GFP (green fluorescence protein) have let visualized the presence and role of helical bacterial cytoskeleton. Opinions of some authors about correlation between these actin-like structures and diffused murein synthesis in cylindrical part of sacculus are also presented in this article.

1. Chemical composition of peptidoglycan. 2. Physical properties of murein in Gram-negative bacteria. 3. Models of peptidoglycan architecture. 3.1. Models of layer murein. 3.2. Three dimensional scaffold model of murein. 4. Growth of murein sacculus of Gram-negative bacteria. 4.1. Peptidoglycan synthesis for model of layer murein. 4.2. Growth of peptidoglycan in scaffold model. 5. Topography intercalation of newly synthesized peptidoglycan. 6. Summary

Słowa kluczowe: bakterie Gram-ujemne, Mbl, modele mureiny, MreB, peptydoglikan

Key words: Gram-negative bacteria, Mbl, models of murein, MreB, peptidoglycan

1. Budowa chemiczna peptydoglikanu

Peptydoglikan stanowi podstawową strukturę ściany komórkowej wspólną niemal dla wszystkich *Eubacteria* (z wyjątkiem bakterii z rodzajów *Planctomyces*, *Pirellula* [29], *Mycoplasma* czy *Anaplasma* [62]) włączając sinice [39, 80]. Powszechnie stosowanym synonimem dla tej makrocząsteczki jest termin mureina wprowadzony w 1964 roku przez Weidela i Pelzera [93]. Obecnie stosowane są oba pojęcia, jednakże termin peptydoglikan trafniej opisuje chemiczną naturę tej makromolekuły.

Dzięki opracowaniu na przełomie lat 50-tych i 60-tych metod izolacji czystych preparatów mureiny zarówno z bakterii Gram-dodatnich [69] jak i Gram-ujemnych [93] zaistniała możliwość chemicznej analizy jej składników, ustalenia pierwszorzędowej struktury a także wrażliwości na enzymy bakteriologiczne.

Okazało się, że bez względu na morfologię komórki bakteryjnej, grubość ściany, przynależność do Gram-dodatnich czy gramujemnych mikroorganizmów, ogólny

plan budowy mureiny niezmiennie pozostaje taki sam. Łańcuchy heteropolimerów glikanowych zbudowane są z naprzemiennie ułożonych podjednostek N-acetyloglukozaminy-(2-acetamido-2-deoxy-D-glukozy)-NAcGlc i kwasu N-acetylmuraminowego-(2-acetamido-2-deoxy-3-O-(D-1-karboksyetylo)-D-glukozy)-NAcMur połączonych wiązaniem β -(1,4) glikozydowym. Z kolei obecność grup mleczanowych przy C3 w kwasie muraminowym pozwala na kowalentne przyłączenie drugiego elementu składowego mureiny w postaci bocznych łańcuchów peptydowych, poprzez które zachodzi sieciowanie łańcuchów glikanowych [27, 28, 47, 74]. Tak więc kowalencyjnie związane komponenty polisacharydowo-peptydowe tworzą wielkocząsteczkowy, nierozpuszczalny polimer cylindrycznego lub kulistego (u ziarniaków) kształtu, niewrażliwy na działanie wielu czynników chemicznych i charakteryzujący się dużą odpornością mechaniczną. Właściwości te pozwalają chronić wnętrze komórki bakteryjnej przed działaniem wysokiego ciśnienia osmotycznego, utrzymywać jej stały kształt oraz gwarantują

jej integralność i zapewniają zaczepienie ciała podstawowego rzeski.

Większość bakterii Gram-ujemnych posiada peptydoglikan należący do chemotypu A1g [80], gdzie w skład pentapeptydu wchodzi: L-alanina, kwas D-glutaminowy, kwas diaminopimelinowy (DAP) i dwie D-alaniny a jego zawartość w osłonach komórkowych waha się w granicach 5–10%.

Peptydoglikan każdej bakterii złożony jest z wielu monomerów zwanych muropeptydami, które można uwolnić z polimeru działaniem muramidazy. Jeszcze do niedawna wyróżniano tylko 11 ich rodzajów na podstawie rozdzielonych otrzymywanych w wyniku zastosowania chromatografii bibułowej czy cienkowarstwowej [31]. Dzięki wprowadzeniu techniki HPLC w połączeniu z FAB-CAD/MS/MS [30, 75] a także nowoczesnych metod elektroforetycznych [98] okazało się, że ich różnorodność jest ogromna i np. u *E. coli* wynosi przeciętnie 40–50 w zależności od szczepu (istnieją doniesienia nawet o 80 różnych typach muropeptydów) [30]. W toku szczegółowej analizy wykazano, że homogenność w składzie chemicznym mureiny niekoniecznie pociąga za sobą strukturalną identyczność. Muropeptydy uwolnione muramidazą z peptydoglikanu mogą wykazywać różnice w długości łańcuchów peptydowych (w granicach 2–5 aminokwasów) [75]. Ponadto w niektórych z nich wykazano obecność reszt lizyny i argininy [75] przyłączonych do łańcuchów peptydowych i pochodzących z końca C lipoproteiny, która została uwolniona proteazami z mureiny w trakcie jej oczyszczania. Z niektórych bakterii [36], posiadających poliaminę kowalentnie przyłączoną do peptydoglikanu, lizozym uwalnia muropeptydy zawierające ten składnik. Muramidazy obok monomerycznych podjednostek uwalniają z mureiny także dimery, trimery i niewielką ilość tetramerów [30, 75, 83] pochodzących z usieciovanych jej fragmentów. Wśród oligomerów dodatkowa różnorodność form podyktowana jest występowaniem różnego typu wiązań krzyżowych. Obok przeważających typu D,D-peptydowych łączących m-DAP i D-alaninę mogą występować w niewielkich ilościach (około 2% w wykładniczej fazie wzrostu) wiązania L,D-peptydowe pomiędzy dwoma cząsteczkami DAP [30]. Skład muropeptydów zależny jest także od stanu fizjologicznego bakterii [10, 83] czy zmian w środowisku zewnętrznym [13, 30] jednak nie na tyle, aby znacząco wpływać na rolę polimeru w klasyfikacji.

2. Właściwości fizyczne mureiny bakterii Gram-ujemnych

Grubość peptydoglikanu badana była początkowo przy zastosowaniu transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM), po uprzednim odwodnieniu i utwale-

niu preparatów mureiny i jej cienkich skrawków lub określana na podstawie ilości znakowanych radioaktywnie składników wstawianych do mureiny (głównie *meso*-DAP) i wyliczeń opartych o wzory chemiczne [96, 100]. W ten sposób określono, że grubość mureiny *E. coli* wynosi 1–3 nm. Badania przy użyciu AFM [97] (*ang.* atomic force microscopy – mikroskopii sił atomowych) podważyły wcześniejsze ustalenia. Ponieważ oznaczenia przeprowadza się w środowisku wodnym czyli zbliżonym do warunków *in vivo* to otrzymane wyniki wskazujące, iż uwodnione woreczki mureinowe *E. coli* mają grubość 6 nm a odwodnione 3 nm (co jest zgodne z wynikami z TEM) mogą być bliższe prawdy. Potwierdzenie tego mogą stanowić podobne wyniki otrzymane dla *E. coli* przez Hobota [38] ($6,5 \pm 0,5$ nm) przy zastosowaniu kriotechniki [32] wymroźeniowego podstawienia wewnątrzkomórkowej wody chemicznymi utrwalczaczami w temperaturze -80°C oraz Leduca [59] ($6,6 \pm 1,4$ nm) dla preparatów elektronomikroskopowych kontrastowanych według procedury Rambourga przy zastosowaniu kwasu fosfowolframowego w kwasie chromowym. Badania Leduca i wsp. [59] wykazały ponadto, iż grubość peptydoglikanu może się zmieniać od ok. $10,7 \pm 1,1$ nm dla bakterii w stacjonarnej fazie wzrostu namrażanych na bogatym podłożu, zaś do $9,9 \pm 1,3$ nm, gdy hodowle prowadzono na pożywce minimalnej.

Woreczki mureinowe są elastycznymi strukturami czego jednym z przejawów jest przekształcanie się nowo tworzonych biegunów z płaskiego septum do formy półkulistej pod wpływem turgoru po podziale komórki [54]. Badania Labischinskiego [3, 56] nad drugo- i trzeciorzędową strukturą mureiny wykazały, że peptydy są najbardziej elastycznym elementem heteropolimeru i mogą być rozciągane nawet czterokrotnie (długość łańcuchów peptydowych zbudowanych z naprzemiennie ułożonych enancjomerów L i D aminokwasów może się wahać od 0,57 nm dla łańcucha w formie pierścienio-podobnej do 2,3 nm kiedy jest wyprostowany) [3, 56]. Koch i Woeste [50] wykazali zmianę wielkości woreczków mureinowych w wyniku modyfikacji umożliwiającej przewagę grup naładowanych dodatnio lub ujemnie (stosując zamianę pH roztworu czy N-bursztynylację mureiny) obserwowaną jako zwiększenie do 300% powierzchni modyfikowanych woreczków mureinowych względem tych w stanie zrelaksowanym. Również badania przy zastosowaniu AFM pokazały, że wzrost turgoru o jedną atmosferę zwiększa ich długość o około 12% zaś szerokość o 8% [97]. Dane te wskazują na zjawisko anizotropii elastyczności przejawiające się większą deformacją struktury peptydoglikanu wzdłuż osi długiej niż w kierunku osi krótkiej [92].

Peptydoglikanowa sieć jest strukturą porowatą pozwalającą na swobodną dyfuzję małych cząsteczek.

Wielkość porów w mureinie ustalono stosując sondy w postaci znakowanego fluoresceiną dekstranu o różnej masie cząsteczkowej [20]. Przeprowadzone przez Demschicka i Kocha [20] eksperymenty wykazały, że dla spreparowanych woreczków *E. coli* ATCC 11775 istnieje możliwość swobodnej dyfuzji cząstek o promieniu w granicach 1,47–2,95 nm (śr. 2,06 nm) co odpowiada masom cząsteczkowym rzędu 22–24 kDa białek globularnych i nienafadowanych. Jednakże, gdy uwzględnimy działający normalnie turgor, który powoduje wydłużenie struktury o 17% [49] promień porów może wzrosnąć do 2,48 nm i będzie istniała możliwość przenikania białek o masie cząsteczkowej do 50 kDa [20, 23]. Odmienne wyniki uzyskano wyznaczając odległość między dwoma graniczącymi pasmami glikanowymi na 1,6–2,0 nm, przy działającym na komórkę turgorze 3 atm z wykorzystaniem techniki AFM [97]. Dane te wskazują, iż jest to wielkość ograniczająca swobodną dyfuzję roztworów chyba, że istnieją miejsca nieciągle w mureinowej sieci w postaci pęknięć, niedoskonałości [20, 74] lub że komórka jest w stanie regulować turgor, który dla *E. coli* wyznaczono na 3–5 atm [97] a tym samym zwiększać odległość między glikanowymi pasmami (o 0,1–1,0 nm). Badania z pracowni Vazquez-Laslopa [88] z komórkami *E. coli* traktowanymi EDTA i poddawanych szokowi osmotycznemu wskazały na możliwość sekrecji z komórki białek nawet o masie cząsteczkowej do 100 kDa. Jednakże *in vivo* w normalnych warunkach wzrostu bakterii transport większych cząstek odbywa się poprzez różnego typu systemy sekrecyjne [60], których tworzenie wymaga lokalnej przebudowy peptydoglikanu.

3. Modele architektury peptydoglikanu

Struktura chemiczna [37, 86], szczegóły biosyntezy [2, 14, 61, 71], właściwości fizyczne [20, 50, 96, 97, 100] oraz biologiczne funkcje mureiny [21, 44], gigantycznej molekule o masie cząsteczkowej 3×10^9 Da, były od połowy lat 60-tych wielokrotnie rewidowane. Pomimo, iż od ponad pół wieku stanowi ona obiekt zainteresowania naukowców pytanie, na temat trójwymiarowej jej organizacji pozostaje bez odpowiedzi. Przyczyną takiego stanu rzeczy jest brak metod badawczych, które pozwalałyby na wnikięcie w architekturę peptydoglikanu w natywnych, nietkniętych komórkach. Stąd wszystkie dostępne w literaturze modele mureiny stworzone zostały w oparciu o pośrednie dowody.

Obecnie w literaturze ścierają się ze sobą dwie zasadnicze koncepcje dotyczące planu budowy peptydoglikanu. Za główne kryterium podziału przyjęto ułożenie pasm glikanowych w mureinie w stosunku do błony komórkowej. Zdecydowana większość proponowanych modeli zakłada równoległe do powierzchni komórki

położenie łańcuchów cukrowych [28, 47, 51]. Na przeciwnym biegunie w stosunku do powyższych pozostaje jedyny jak do tej pory model Dmitrieva [22, 23, 24] przyjmujący, iż oligomery cukrowe w mureinie ustawione są prostopadłe do błony wewnętrznej.

3.1. Modele warstwowej mureiny

Koncepcja mureiny w postaci dwuwymiarowej płaszczyzny ewoluowała począwszy od lat 70-tych, kiedy to powstały pierwsze jej molekularne modele. Oparte one były na założeniu, że polimery glikanowe w muropeptydzie, ze względu na występowanie wiązania β -(1,4) glikozydowego są analogami chityny [27, 28, 47] z peptydowymi bocznymi łańcuchami ułożonymi jednokierunkowo. Keleman i Rogers [47] postulowali, aby pary łańcuchów glikanowych połączone były ze sobą za pomocą wiązań wodorowych utworzonych pomiędzy sąsiadującymi peptydami. Jednakże w późniejszym czasie Formanek i wsp. [27] wykazali konieczność występowania wiązań wodorowych w obrębie jednego peptydu a nie dwóch sąsiadujących. Takie przesłanki pozwoliły stworzyć jednolity model mureiny zarówno dla polimeru w komórkach roślinnych jak i występującego w sporach Gram-dodatnich bakterii np. *Bacillus megaterium* [1], gdzie 50% reszt kwasu muraminowego występuje w postaci δ -laktamów a około 30% jest podstawionych tylko L-alaniną czy *Micrococcus luteus* [79], u którego 50% NAcMur nie jest podstawionych bocznym łańcuchem. Tak więc założenie, że boczne peptydy przyjmują postać 2,2₇ helisy [27] miało uwzględniać takie przypadki. Późniejsze doświadczenia Labischinskiego [56] z uginaniem promieni X oraz spektroskopią w podczerwieni [28] wykazały, że łańcuchy cukrowe nie są tak proste i sztywne jak w chitynie, ale przyjmują postać prawoskrętnej helisy z obrotem co 4 dwucukrowe podjednostki, z której pod kątem prostym wychodzą łańcuchy peptydowe ułożone prostopadłe względem siebie. W związku z tym glikanowe polimery leżące w tej samej płaszczyźnie mogą być sieciowane z sąsiednimi łańcuchami poprzez co drugi peptyd tworząc hipotetyczną strukturę zwaną „tessera”. Tessera w stanie rozciągniętym przyjmuje postać heksagonału o czterech bokach zbudowanych z podjednostek NAcGlc-NAcMur i dwóch utworzonych z usieciowanych peptydów [51–53]. Sieciowanie kilku graniczących ze sobą pasm cukrowych daje strukturę przypominającą wyglądem plaster miodu. Ponieważ łańcuchy cukrowe wchodzące w skład woreczka mureinowego są różnej długości [35] a oligomery zawierające 5–10 podjednostek dwucukrowych przeważają w jego strukturze [35] to z powodu niskiego stopnia sieciowania polimeru charakterystycznego dla bakterii Gram-ujemnych, rzędu 25–50% [30] powtarzalność heksagonali

mogłaby być niedoskonała, ale wciąż pokrywająca powierzchnię komórki na tyle, aby chronić leżącą pod nią błonę cytoplazmatyczną [52]. Potwierdzeniem tego mogą być symulacje komputerowe wykonane przez P i n k a i wsp. [74].

Wczesne modele planarne rozpatrywały warstwę sztywną ściany komórkowej bakterii gramujemnych zasadniczo jako jednowarstwową. Koncepcja ta wprowadzona przez W e i d e l a i P e l z e r a [93] w połowie lat 60-tych w oparciu o pomiary grubości ściany komórkowej przy zastosowaniu TEM oraz ilości wstawianego radioaktywnie znaczonego DAP [7] i do tej pory nie została w sposób jednoznaczny zrewidowana. Nowe techniki krioskopowe stosowane do przygotowywania preparatów do mikroskopu elektronowego [32, 59] umożliwiły wykazanie, iż mureina stanowi grubszą strukturę niż się wcześniej spodziewano. Jednakże zawsze stosowanie wieloetapowych metod utrwalania i kontrastowania stwarza obawę, iż otrzymany wynik obarczony jest błędem wynikającym z interferencji odczynników. Innym istotnym parametrem umożliwiającym wyznaczenie grubości warstw peptydoglikanu może być jego ilość przypadająca na komórkę. Okazuje się jednak, iż w literaturze występują niejednolite dane dotyczące średniej wielkości powierzchni przypadającej na dwucukrową podjednostkę przedstawianej jako: 1,3 [7], 0,61 [94] i 0,77 [40] nm². Tak więc opieranie się o informacje literaturowe może być kłopotliwe i prowadzące do rozbieżnych konkluzji. Ostatnio większość badaczy w oparciu o nowe zrewidowane doniesienia na temat ilości dwucukrowych podjednostek ($3,6 \times 10^6$ /komórkę) [96], przypadającej na powierzchnię komórki (2,5 nm²) oraz pomiary grubości polimeru przy zastosowaniu techniki SANS (*ang.* small-angle neutron scattering – małokątowego rozpraszania neutronów) [57] skłania się ku koncepcji mureiny jednowarstwowej z niewielkimi obszarami dwu- lub trójwarstwowymi. Daje to obraz „łatkowej” mureiny postulowanej przez H ö l t j e g o i G l a u n e r a [40], gdzie dodatkowe warstwy miałyby stanowić: po pierwsze nowo syntetyzowana mureina, najbardziej wewnątrz położona oraz prawie zdegradowana luźno usieciowana, najbardziej zewnętrzna [56].

Innym pytaniem dotyczącym struktury mureiny było i jest pytanie o ułożenie łańcuchów glikanowych w komórce. Teoretycznie polimery cukrowe mogłyby biec zarówno równolegle jak i prostopadle w odniesieniu do długiej osi lub być rozmieszczone przypadkowo. W oparciu o obserwacje bakterii uzyskane przy zastosowaniu mikroskopu świetlnego [18] wykluczono możliwość ułożenia pasm glikanowych zgodnie z kierunkiem długiej osi. Obserwacje te wskazywały, że wzrost bakterii odbywa się poprzez wydłużanie komórki przy zachowaniu stałej średnicy. Łańcuchy glikanowe ze względu na występowanie pierścieni pirano-

zowych wykazują dużą sztywność [53], tak więc rozciąganie w tym kierunku byłoby nieznaczne. Na podstawie fotografii z mikroskopu elektronowego woreczków częściowo degradowanych endopeptydazą lub muramidazą [52, 70, 89] oraz traktowanych ultradźwiękami [90] V e r w e r postulował, iż łańcuchy glikanowe biegną równolegle do mniejszego obwodu komórki. Potwierdzeniem tych ustaleń miał być obraz woreczków mureinowych *E. coli* W173-25 traktowanych penicyliną [81]. W wyniku działania antybiotyku obserwowano prostopadle w stosunku do długiej osi pęknięcia w strukturze mureiny. Tak więc na podstawie powyższych ustaleń wielu badaczy przyjęło hipotezę, iż heteropolimery NAcGlc-NAcMur tworzą stos pierścieni leżących jeden nad drugim [17, 99]. Zaletą modelu miała być możliwość wiernego odwzorowywania pierścieni o stałym promieniu w procesie replikacji co w efekcie prowadziło do utrzymania kształtu bakterii. Jednakże model ten zawiera wiele niedoskonałości, gdyż pętla glikanowa otaczająca komórkę na szerokość powinna zawierać przeciętnie 3500–4000 podjednostek dwucukrowych. Analiza chromatograficzna (HPLC) [35] łańcuchów glikanowych uwolnionych po trawieniu mureiny amidazą wykazała natomiast, że ich średnia długość jest znacznie krótsza. Tak więc, aby utworzyć ciągły pierścień otaczający komórkę na szerokość musiałoby być połączonych ze sobą około 200–300 takich pojedynczych łańcuchów cukrowych. Innym argumentem przeciwko koncepcji mureiny w postaci równolegle leżących pierścieni jest fakt, iż łańcuchy glikanowe pozostające w bliskim sąsiedztwie, tzn. w odległości odpowiadającej długości wiązania kowalencyjnego według podstawowych zasad chemicznej kinetyki, mogą wchodzić w stan kolizji czyli odpychać się nawzajem [23]. Ponadto jedną z ważniejszych funkcji pierścieni miało być utrzymywanie stałej średnicy komórki bakteryjnej zaś z ustaleń B a r n i c k e l e g o [3] i L a b i s c h i n s k i e g o [56] wiadomo, że łańcuchy peptydowe wykazują dużą elastyczność, a tworząc strukturę leżącą w płaszczyźnie działania turgoru ulegałyby rozciąganiu [52]. Mikrografie elektronowe woreczków traktowanych muramidazą uzyskane przez d e P e d r o [52] także pozostają w sprzeczności z wynikami V e r w e r a [89]. Powstałe w wyniku działania enzymu dziury w strukturze polimeru wykazywały różne ułożenie w stosunku do średnicy komórki, a nie jak należałoby się spodziewać prostopadle. Tak więc jednoznaczne ustalenie sposobu ułożenia pasm glikanowych na podstawie obrazów z mikroskopu elektronowego jest niemożliwe. W oparciu o badania d e P e d r o [73] i zgodnie ze swoją teorią SST (Surface Stress Theory [52, 55] – teorią powierzchniowego naprężenia) K o c h postulował, aby ułożenie łańcuchów cukrowych przyjmowało wzór przypadkowy a nie uporządkowany.

3.2. Model trójwymiarowej mureiny w postaci rusztowania

Dla modelu mureiny opracowanego przez Dmitrieva [22–24], przy wykorzystaniu symulacji komputerowych oraz na podstawie szeregu danych eksperymentalnych [13, 56, 57], punktem wyjścia było „rewolucyjne” założenie, iż pasma glikanowe budujące woreczek mureinowy ułożone są prostopadle w stosunku do błony cytoplazmatycznej. Pierwszymi, którzy rozważali taką ewentualność byli Kelema i Rogers [47], jednakże tylko jako jedną z kilku możliwości rozmieszczenia oligomerów cukrowych w peptydoglikanie. Umieszczenie łańcuchów glikanowych, w postaci prawoskrętnych helis z odchodzącymi od nich pod kątem prostym bocznymi peptydami, w takiej płaszczyźnie pozwala wg Dmitrieva na tworzenie wiązań krzyżowych z czterema innymi graniczącymi łańcuchami cukrowymi. W konsekwencji tego długość łańcuchów glikanowych budujących woreczek mureinowy nie ma wpływu na ciągłość polimeru jak to miało miejsce dla modelu A.L. Kocha [51]. Ponadto model mureiny w postaci rusztowania przedstawia stabilną i funkcjonalną sieć dobrze znoszącą nacisk przy niskim całkowitym stopniu sieciowania (rzędu 25–50%) [75] charakterystycznym dla bakterii Gram-ujemnych, dzięki poczynionemu założeniu, że udział wiązań krzyżowych w sąsiedztwie błony zewnętrznej bliski jest 100% (strefa funkcjonalna) [24] i maleje stopniowo lub nagle w kierunku błony komórkowej. Założenie to pozostaje w zgodzie z nową koncepcją przestrzeni peryplazmatycznej w postaci żelu z gradientem gęstości [38].

Również wyznaczona przez Hobota [38] oraz Grahama [32] szerokość przestrzeni peryplazmatycznej odpowiednio 13,0 i 10,6–14,3 nm dobrze koreluje z danymi dotyczącymi długości pasm glikanowych budujących mureinę. Wiadomo, że długość dwucukrowej podjednostki wynosi 1,01 nm [56], tak więc ułożenie w płaszczyźnie prostopadłej do powierzchni komórki łańcuchów długości 8–12 dwucukrowych podjednostek (które przeważają w strukturze PG) a także krótszych rzędu 5 (występujących w mniejszej ilości), które były pomijane przy tworzeniu planarnych modeli [23] odpowiada grubości warstwy peryplazmatycznej.

W prezentowanym modelu sieciowanie łańcuchów glikanowych z czterema sąsiadującymi powoduje tworzenie trójwymiarowych lewoskrętnych helis przypominających pory i posiadających cechy kanałów jonoforowych. Kanały te dzięki ułożeniu bocznych łańcuchów peptydowych w płaszczyźnie niosącej nacisk zdolne są do regulowania swej wielkości [3] w szerokim zakresie, który pozwalałby na swobodne przechodzenie cząstek o wielkościach 22–24 kDa wyznaczonych doświadczalnie przez Demchik

i Kocha [20] zarówno dla woreczków w formie zrelaksowanej jak i rozciągniętej.

Rentgenograficzne badania mureiny przeprowadzone w 2001 roku przez Lee i wsp. [61] wskazywały, że w obrębie centrum aktywnego transpeptydazy dwa pentapeptydy oddziałują ze sobą w formie rozciągniętej. Z kolei modele planarne zakładały występowanie bocznych łańcuchów w formie zrelaksowanej. Różnica pomiędzy stanem rozciągniętym (2,3 nm) i zrelaksowanym (0,57 nm) jest ogromna i prowadzi do znacznych rozbieżności przy wyliczaniu pola powierzchni przypadającej na dwucukrową podjednostkę. Przyjmując za słuszne występowanie peptydów w formie rozciągniętej i po uwzględnieniu średnicy łańcuchów cukrowych otrzymano wartość 27 nm² odpowiadającą powierzchni dwucukrowej podjednostki. Wychodząc z takich założeń Dmitriev wykazał, że proponowany przez niego model nie wymaga większej ilości budulcowego materiału od tego dla modeli planarnych [96], aby pokryć powierzchnię komórki. Przeciwnie zdanie tj. możliwość pokrycia tylko 23% powierzchni komórki w modelu mureiny w postaci rusztowania z 24-disacharydowymi łańcuchami glikanowymi przedstawili Vollmer i Höltje [92].

4. Wzrost woreczka mureinowego u bakterii Gram-ujemnych

Metabolizm woreczka mureinowego, który obejmuje: biosyntezę dwucukrowych pentapeptydowych podjednostek w cytoplazmie [67], włączanie ich w istniejącą strukturę peptydoglikanu po uprzednim przeniesieniu przez błonę cytoplazmatyczną do przestrzeni peryplazmatycznej [14, 71] oraz „obróć metaboliczny” (*ang.* turnover) [41] stanowi złożony proces nie tylko z powodu zaangażowania dużej ilości enzymów oraz metabolitów, ale przede wszystkim z powodu wymagań regulacyjnych oraz topologicznych.

Najmniej poznanym i najbardziej dyskusyjnym etapem jest włączanie nowo zsyntetyzowanych łańcuchów w system istniejącej sieci. Bezpośrednią przyczyną takiego stanu rzeczy jest niemożność ustalenia na dzień dzisiejszy trzeciorzędowej struktury mureiny, w szczególności w przypadku Gram-ujemnych bakterii. Tak więc obok debaty na temat architektury peptydoglikanu równolegle toczą się spory dotyczące powiększania woreczka mureinowego. Co do kwestii wyjściowej badacze są zgodni, że aby bezpiecznie wstawiać nowy materiał do rosnącego woreczka działanie syntetaz i hydrolaz mureinowych musi być ściśle skoordynowane [11, 23, 41, 42].

Proponowane są dwie główne drogi jakimi procesy te mogą przebiegać:

- działanie hydrolaz poprzedza syntezę, aby przygotować miejsce dla nowego materiału

- nowy materiał zakotwiczany jest do woreczka zanim zacznie działać hydrolaza (strategia określona z *ang.* make-before-break) [42]

4.1. Synteza peptydoglikanu w modelu warstwowej mureiny

Burman i Park [11] na podstawie danych otrzymanych z doświadczeń ze znakowaną mureiną [9, 11] stworzyli jeden z wcześniejszych modeli wyjaśniających sposób powiększania się woreczka mureinowego. Analiza stosunku radioaktywności akceptora do donora w dimerach uwolnionych lizozymem a także poczynione trzy założenia mówiące, iż: (I) łańcuchy glikanowe ułożone są prostopadle w stosunku do długiej osi komórki według hipotezy ustanowionej przez Pelzera, (II) sieciowanie nowo wstawianego pasma zachodzi jednocześnie z postępującą polimeryzacją łańcucha cukrowego oraz, (III) iż tylko nowe łańcuchy posiadają pentapeptydowy substrat niezbędny w procesie transpeptydacji, doprowadziły do stworzenia modelu wzrostu mureiny na drodze insercji, którą poprzedza hydroliza starego materiału. Badacze zaproponowali, aby dwufunkcyjne enzymy transglikozylazo/transpeptydazy (PBP1a i PBP1b) współpracowały z D,D-endopeptydazami i wstawiały dwa nowe pasma jednocześnie pomiędzy istniejące (późniejsze doniesienia zrewidowały te dane mówiąc o jednym wstawianym łańcuchu [16]) poruszając się po helikalnym torze wokół obwodu komórki. Endopeptydaza tnąc mostki peptydowe miałyby torować drogę nowo syntetyzowanej mureinie. Proponuje się, by zagadnienie utrzymania stałej średnicy komórki bakteryjnej dla przedstawionego modelu związane było z powielaniem pasm glikanowych w oparciu o starą „primerową” matrycę na wzór procesu transkrypcji DNA. Model Burmana i Parka [11] został w późniejszym czasie zanegowany jako nie zgadzający się z nowymi ustaleniami w dziedzinie morfologii bakterii.

Dla modelu mureiny według A.L. Kocha [51] przyjęto za słuszną strategię make-before-break opracowaną przez Höltje go, która znana jest pod nazwą trzy-za-jedną (*ang.* three-for-one) [51]. Hipoteza ta zakłada, że trzy mureinowe łańcuchy sieciowane są między sobą tworząc triplet, a następnie kowalennie wiązane przy udziale transpeptydaz do wolnych grup aminowych w mostkach peptydowych po obu stronach pojedynczego pasma zwanego kotwiczącym. Proces wstawiania tripletów kończy zachodzące przy udziale amidaz usunięcie łańcucha kotwiczącego. Jednakże, aby istniała możliwość włączania nowoutworzonej trimerowej „tratwy” w warstwę niosącą nacisk, długość łańcuchów glikanowych musi precyzyjnie do siebie pasować. W komórce bakteryjnej pod wpływem działania turgoru pasma glikanowe w peptydoglikanie przyjmują zygza-

kowatą strukturę, co prowadzi do zmniejszenia odległości pomiędzy końcami „tessery”. W takiej sytuacji nie istniałaby możliwość tworzenia wiązań między nową zrelaksowaną i starą napiętą mureiną. Jednakże z wyliczeń dokonanych przez Kocha [51] wynika, że działający turgor rozciągając łańcuchy glikanowe kompensuje skrócenie spowodowane zygzakowatą strukturą.

Model „trzy-za-jedną” wymaga dużej ilości różnych enzymów (syntetaz i hydrolaz), których działanie musi być skoordynowane w czasie i przestrzeni. Jednakże dzięki serii doświadczeń przy zastosowaniu techniki chromatografii powinowactwa ujawniono oddziaływanie białko-białko pomiędzy enzymami wykazującymi działania opozycyjne, tj. mureinowymi polimerazami i depolimerazami. Odkryto, że dwufunkcyjne białka transglikozylazo/transpeptydazy, znane jako PBP 1a, 1b i 1c, transpeptydazy PBP2 i PBP3, D,D-endopeptydazy PBP4 i PBP7, jak i D,D-karboksypeptydazy PBP5, PBP6 oraz lityczne transglikozylazy Slt 70, MltA i MltB reagują ze sobą na drodze powinowactwa. [76, 78]. W pewnych przypadkach jest to oddziaływanie pośrednie poprzez strukturalne białko MipA [91]. Eksperymenty te dowodzą, iż wzrost mureiny może być przeprowadzany przez wieloenzymatyczne kompleksy, analogiczne do holoenzymów replikacji DNA [42]. Skład kompleksów prawdopodobnie podlega dużej dynamice i jest zależny od fazy wzrostu komórki [42]. Ustalono, iż obecność odpowiednich transpeptydaz w kompleksie nadaje mu specyficzne funkcje (PBP2 – uczestniczy w wydłużaniu komórki zaś PBP3 inaczej zwane FtsI *ang.* filamenting temperature sensitive – w tworzeniu przegrody podziałowej [67]). Ponadto wykazano, że enzymy jednego kompleksu mogą być związane z różnymi systemami błon obecnymi u bakterii gramujemnych. PBP1b końcem N połączone jest z błoną cytoplazmatyczną [6] natomiast lityczna transglikozylaza MltA [63] zakotwiczona jest w błonie zewnętrznej. Jeżeli MipA łączy oba enzymy *in vivo*, to być może uczestniczy ono w tworzeniu miejsc adhezji błonowej zwanych węzłami Bayera [5, 60]. Postuluje się ponadto, aby kompleks zawierał monofunkcyjną transglikozylazę [6, 33, 85], która syntetyzowałaby środkowe pasmo tripletu.

Synteza peptydoglikanu w miejscu tworzenia septum również mogłaby przebiegać według mechanizmu „trzy-za-jedną” z tą jednak różnicą, iż triplety musiałyby kotwiczyć jeden pod drugim [46, 51].

Na bazie teorii holoenzymu oraz „trzy-do-jednego” powstał jeszcze inny model wstawiania łańcuchów glikanowych do woreczka mureinowego pozostającego pod działaniem turgoru zwany SST [52, 55]. Zakłada on, iż siłą sprawczą wzrostu mureiny są fizyczne oddziaływania spowodowane przyrostem masy cytoplazmy, a stałość średnicy komórki zapewniają nieczynne metabolicznie bieguny [70].

4.2. Wzrost peptydoglikanu w modelu mureiny w postaci rusztowania (*ang.* scaffold model)

W celu wyjaśnienia sposobu wzrostu mureiny w postaci rusztowania Dmitriev [24] posłużył się koncepcją Bayera [5] mówiącą o tworzeniu się w komórce miejsc adhezji pomiędzy dwoma błonami: cytoplazmatyczną (IM) i zewnętrzną (OM). Według ustaleń Hobota [38] przestrzeń peryplazmatyczna w osłonach komórkowych Gram-ujemnych bakterii wykazuje rosnący gradient gęstości. Poniżej zewnętrznej funkcjonalnej strefy [24] w mureinie wykazującej niemal 100% sieciowanie znajduje się znacznie luźniejszy materiał peptydoglikanu. Według Dmitrieva w obrębie tej strefy dochodzi do lokalnego działania enzymów autolitycznych przebudowujących woreczek mureinowy [24], co doprowadza do tworzenia się przerw w strukturze mureiny. Pod wpływem działającego w komórce turgoru błona cytoplazmatyczna podlega inwaginacji wypełniając puste przestrzenie. W efekcie kompleks enzymatyczny, zlokalizowany na szczycie wygiętej błony, korzystając z dwucukrowych pentapeptydowych podjednostek mureiny dostarczanych z cytoplazmy [67], wstawia je do starej sieci woreczka mureinowego w miejscach powstałych wcześniej przerw stopniowo zapełniając ubytki. Po zakończeniu lokalnej przebudowy lub powiększenia woreczka mureinowego błona cytoplazmatyczna wraca do pierwotnego położenia. Uwzględniając, że peptydy na helisach cukrowych ułożone są w czterech kierunkach [56] i równoległe do powierzchni komórki zgodnie z koncepcją modelu mureiny w postaci rusztowania [22–24] przyjęto, iż w skład kompleksów enzymatycznych powiązanych z błoną powinny wchodzić dwa białka PBP1a lub 1b [15] lub 1c [78] oraz dwie transpeptydazy PBP2. Eksperymentalnie uzyskane dane [19, 46, 52, 70] dowodzą, iż wstawianie nowego materiału w istniejącą sieć peptydoglikanu odbywa się w sposób przypadkowy. Tak więc hipoteza Dmitrieva może tłumaczyć wzrost mureiny w postaci łat w cylindrycznej części komórki [73] prowadzący do jej wydłużenia, a także procesy zachodzące w trakcie jego przebudowy i związane między innymi z tworzeniem oraz „demontażem” systemów sekrecyjnych [60].

5. Topografia wstawiania nowo syntetyzowanego peptydoglikanu

Stosunkowo od niedawna prowadzone badania wykazały istnienie trzech elementów bakteryjnego cytoszkieletu: aktynopodobnych białek MreB i Mbl (*ang.* MreB-like proteins – MreB-podobne białka) oraz krescentyny. MreB obecne są tylko w gatunkach o kształcie cylindrycznym lub helikalnym i zazwyczaj nie spotyka-

ne są u ziarniaków [19]. Mbl, które wykryto u *B. subtilis* nieobecne są w komórkach gramujemnej *E. coli*. Z kolei krescentyna stanowi dodatkowy element cytoszkieletu wykryty u *Caulobacter crescentus* [26]. Stosując technikę immunofluorescencji oraz fuzji z GFP (*ang.* green fluorescent protein – białkiem zielonej fluorescencji) wykazano [45, 84], że elementy cytoszkieletu *B. subtilis* tworzą prawoskrętne helikalne struktury pod powierzchnią błony cytoplazmatycznej. Ponadto stwierdzono, iż filamenty Mbl w postaci podwójnej helisy rozciągnięte są od bieguna do bieguna zaś pojedyncze MreB są krótsze i wykazują mniejszy skok helisy ($0,73 \pm 0,12 \mu\text{m}$) niż w przypadku Mbl ($1,7 \pm 0,28 \mu\text{m}$). Na podstawie tych danych oraz obrazu morfologii mutantów *mreB*⁻ i *mbl*⁻ wywnioskowano, że prawdopodobnie aktynopodobne białko MreB jest odpowiedzialne za utrzymanie stałej szerokości, zaś Mbl długości komórki. Również dane mówiące o nieobecności genów *mreB* u ziarniaków, zarówno Gram-dodatnich (*Streptococcus*) jak i Gram-ujemnych (*Neisseria*) [25], potwierdzałyby te ustalenia.

Na podstawie badań autoradiograficznych mureiny ze znakowanym DAP [9, 11, 46, 95] oraz immunofluorescencyjnych ze wstawianą D-cysteiną [70] postulowano, że synteza peptydoglikanu przebiega według wzoru rozproszonego wzdłuż cylindrycznej części mureiny. Zastosowanie przez Daniela i Erringtona znakowanej wankomycyny [19] (antybiotyku, który specyficznym hamuje traspeptydację prekursorowych monomerów mureiny poprzez wiązanie się z terminalnymi D-Ala-D-Ala w bocznym peptydzie) w celu wizualizacji miejsc wstawiania nowej mureiny w istniejącą sieć polimeru, pozwoliły na połączenie idei syntezy peptydoglikanu „na chybił trafił”, według wzoru rozproszonego, z lokalizacją helikalnych elementów cytoszkieletu [99]. Pomimo, iż badania dotyczyły Gram-dodatniej bakterii *B. subtilis* (ze względu na istnienie u Gram-ujemnych błony zewnętrznej efektywnie hamującej wnikanie stosowanego antybiotyku) i pomimo, iż w końcowej konkluzji stwierdza się, że synteza peptydoglikanu u badanego szczepu jest Mbl-zależna to dalsze badania pozwoliły na wysnucie pewnych wniosków dotyczących również gramujemnych bakterii. Doświadczenia ze znakowaną fluorescencyjnie wankomycyną [19] wykazały, że wstawianie nowych prekursorów mureiny przebiega również w postaci pasma w środkowej części mureiny, w miejscu tworzenia się przegrody podziałowej, której jednym z elementów jest pierścień Z utworzony przez tubulinopodobne białko FtsZ [65]. Skonstruowane mutanty *mbl*⁻ *B. subtilis* nie wykazywały fenotypu letalnego co według autorów spowodowane było prawdopodobnie „przełączeniem” ze wzrostu rozproszonego w cylindrycznej części na wzrost strefowy poprzez FtsZ-zależną syntezę [43] lub wzrost na biegunach [72]. Można więc

wnioskować, że u Gram-ujemnych pałeczkowatych bakterii brodawkowych, które nie tylko nie posiadają białek Mbl (patrz wyżej) ale także homologów MreB, jedynym sposobem wydłużania się jest wzrost strefowy poprzez FtsZ-zależną syntezę. Za słusznością tej idei może przemawiać fakt, że zablokowanie syntezy przegrody podziałowej prowadzi do tworzenia się wygięć i rozgałęzień na końcach ich komórek [58].

So u f o i G r a u m a n n [84] wykazali, że białka MreB i Mbl są dynamicznymi strukturami, które w trakcie trwania cyklu komórkowego przemieszczają się wzdłuż komórki po helikalnym torze. Odkrycie to może stanowić kolejny dowód na udział cytoszkieletu w ukierunkowywaniu syntezy mureiny. Według koncepcji H ö l t j e g o [42] enzymatyczne kompleksy przeprowadzając syntezę mureiny miałyby się poruszać wzdłuż pasm glikanowych. Jednakże koncepcja ta ma jedną podstawową wadę, nic nie mówi o źródle motoryki tych kompleksów. Mostem łączącym informacje zawarte w cytoszkiecie oraz zapewniającym ich przetworzenie na syntezę mureiny, przy udziale złożonych kompleksów enzymatycznych, mogą być według całkowicie hipotetycznego modelu C a b e e n a [12] oraz E r r i n g t o n a [25] białka związane lub zasocjowane z błoną cytoplazmatyczną takie jak: RodA [71], MreC oraz MreB, które miałyby wchodzić w skład kompleksów wydłużających czy FtsW [48] dla kompleksów podziałowych. Wiadomo, że mutacje w obrębie genów dla tych białek powodują zmianę pałeczkowatego kształtu bakterii u *E. coli* [45, 48, 71], a także iż białka te posiadają domeny, dzięki którym mogą kotwiczyć w błonie cytoplazmatycznej. Ponieważ MreB nie posiada takich domen, potrzebuje więc pośredników, aby spełniać postulowaną funkcję związaną z utrzymywaniem kształtu komórki. Badania nad cytoszkieletem u *C. crescentus* [26] wykazały, iż rozmieszczenie PBP2 (białka postulowanego u *E. coli* jako uczestniczące w utrzymywaniu pałeczkowatego kształtu) przybiera wzór podobny do białka MreB w trakcie cyklu komórkowego. Ponieważ występowanie genu *mreB* jest powszechne wśród pałeczkowatych, spiralnych czy wygiętych bakterii, zarówno Gram-ujemnych jak i dodatnich a jedyny wyjątek stanowi większość ziarniaków, tak więc dane uzyskane dla *C. crescentus* można uogólnić i odnieść z powodzeniem do Gram-ujemnych pałeczkowatych bakterii będących w kręgu zainteresowania tego artykułu. U *C. crescentus* [26] i u wielu innych bakterii [25] geny *mreB*, *mreC*, *mreD*, *pbp2*, *rodA*, których produkty znane są z tego, iż mają wpływ na kształt komórki, tworzą pojedynczy zespół (*ang.* cluster) co może stanowić dodatkowy argument za słusznością powyższych teorii.

Kiedy komórka osiągnie dwukrotnie większą długość następuje „przełączenie” z fazy wydłużania na podział, któremu towarzyszy tworzenie septum. Po-

wstawianiu przegrody podziałowej towarzyszy zachodząca dwuetapowo synteza mureiny. Składają się na nią: synteza preseptalnego peptydoglikanu przeprowadzana przez PIPS system (*ang.* penicillin-insensitive peptidoglycan synthesis – niezależny od penicyliny system syntezy peptydoglikanu) FtsZ-zależny [43] oraz septalnego, którego gromadzenie uruchamiane jest po utworzeniu pierścienia cytokinetycznego zawierającego oprócz FtsZ również inne białka podziałowe (FtsA, FtsI, FtsQ) [8, 77]. Badania autoradiograficzne wykazują, że wstawianie łańcuchów mureinowych nie rozciąga się na całą powierzchnię nowotworzonego bieguna, ale ogranicza się do stosunkowo wąskiej strefy wyznaczonej przez zaciskający się pierścień [95] na podobieństwo działania diafragmy w aparacie fotograficznym.

Zagadnienie podziału komórek bakteryjnych ciągnie za sobą kolejne pytanie dotyczące sposobu lokalizacji miejsca tworzenia septum. Teoretycznie wszystkie miejsca w komórce są potencjalnymi miejscami podziału, ale ze względu na maskujące działanie inhibitora MinCD oraz nukleoidu tworzenie przegrody podziałowej ogranicza się tylko do środkowej części komórki [68]. MinCD [82] zabezpiecza przed gromadzeniem się FtsZ, a za tym i podziałem na biegunach komórki zaś nukleoid według hipotetycznej teorii „nucleoid occlusion”, którego molekularny mechanizm nie jest znany, w pozostałej części. Jednakże rodzi się kolejne pytanie skąd białka Min wiedzą gdzie się przyłączyć. Przy zastosowaniu barwników fluorescencyjnych specyficznych dla kardiolipiny M i l e y k o v s k a y a [66] wykazała heterogeny charakter rozmieszczenia fosfolipidów w błonie cytoplazmatycznej *E. coli* oraz *B. subtilis*. Okazało się, że na biegunach i w centrum komórki występują domeny bogate w anionowe fosfolipidy co może sugerować ich wpływ na proces podziału poprzez wiązanie białek odpowiedzialnych za wybór i rozpoznanie miejsca tworzenia septum [66]. Również białka PBP5 i 6 związane prawdopodobnie z podziałem komórki i tworzeniem nowych biegunów poprzez dostarczanie prekursorów dla systemu PBP3/Fts oraz FtsA stabilizujący pierścień Z [64] specyficznie rozpoznają lipidy w błonie [34]. Tak więc być może na topologię wstawiania i przebudowy worczka mureinowego ma wpływ odpowiednie rozmieszczenie lipidów w błonie cytoplazmatycznej.

6. Podsumowanie

Pomimo znacznego postępu badań związanych z budową i syntezą mureiny u Gram-ujemnych pałeczkowatych bakterii, który nastąpił w ciągu ostatnich kilku lat i pomimo wielu podjętych prób wyjaśnienia trzeciorzędowej jej struktury, wciąż nie jesteśmy ani o krok bliżej rozstrzygnięcia sporu dotyczącego ułoże-

nia pasm glikanowych w tym polimerze względem powierzchni komórki. Żaden z modeli architektury peptydoglikanu oraz jego syntezy zaprezentowany w niniejszej pracy nie został w pełni udowodniony. Jeden z nowszych modeli warstwowej mureiny przedstawiony przez A.L. Kocha [51] nie uwzględnia stosunkowo krótkich pasm glikanowych, o długości 5 dwucukrowych podjednostek. Zakłada także konieczność sieciowania rzędu 50%, co nie jest zgodne z doświadczalnie wyznaczonymi wartościami pozostającymi w granicach 25–50% [30]. Komputerowo przeprowadzone symulacje przez Pinka [74] dla tego modelu, które uwzględniały przypadki mniejszej ilości wiązań krzyżowych prowadzące do powstania przerw w strukturze mureiny biegnących prostopadle w stosunku do pasm glikanowych i rozmieszczonych równomiernie, nie stanowią dowodu na prawdziwość powyższych teorii. Pozostaje bowiem pytanie jak komórka reguluje wielkość „dziur” oraz ich położenie, na które autorzy nie dają odpowiedzi. Również model Dmitrieva [22–24] budzi wiele wątpliwości. Według Volmera [92] ilość mureiny obecna w Gram-ujemnych pałeczkowatych bakteriach jest niewystarczająca, aby pokryć całą powierzchnię komórki. Inne pytanie dotyczy możliwości ułożenia pasm glikanowych o długości rzędu 80 dwucukrowych podjednostek [35], które choć nie liczenie to jednak mogą występować w mureinie. Ponadto wątpliwość budzi proponowany przez Dmitrieva kierunek ułożenia łańcuchów cukrowych, które miałyby końcem zawierającymi resztę kwasu 1,6-anhydromuraminowego zwrócone być ku błonie cytoplazmatycznej [23, 24]. Według autora tworzenie reszt 1,6-anhydro przy udziale litycznych transglikozylaz stanowiłoby sygnał dla komórki o zakończeniu syntezy oraz odczepieniu łańcuchów cukrowych od błony cytoplazmatycznej. Jednakże rodzi się wątpliwość czy obecne w przestrzeni peryplazmatycznej białka Slt70 i Slt35 będą w stanie odcinać pasma glikanowe od błony cytoplazmatycznej. Proponowane przez Dmitrieva rozwiązanie wymagałoby raczej, aby enzymy te związane były z błoną wewnętrzną, a jak wiadomo ich lokalizacja jest inna. Poza tym jaką funkcję miałyby pełnić pozostałe lityczne transglikozylazy [4, 41] (MltA, B, C, D) zakotwiczone w błonie zewnętrznej. Inną wątpliwość budzi proponowany sposób włączania dwucukrowych-pentapeptydowych podjednostek do istniejącej sieci. Wcześniejsze doniesienia wskazują, iż proces transglikozylacji przebiega od końca nieredukującego, natomiast model Dmitrieva zakłada, iż wolne końce z resztami NAcGlc od końca nieredukującego skierowane są ku błonie zewnętrznej, z dala od systemu enzymów (białek PBP zlokalizowanych w błonie cytoplazmatycznej) syntezy mureiny [41, 87].

Zdarza się także, iż nowe doniesienia pozostają w sprzeczności z wcześniejszymi ustaleniami. Przykła-

dem może być praca de Pedro z 2003 roku [73]. Autor dokonując wspomaganej komputerowo analizy mikroskopowej woreczków mureinowych otrzymanych z komórek *E. coli* hodowanych w obecności D-cysteiny oraz aztreonamu [70], przedstawił nowy wzór insercji pasm cukrowych w obrębie jego cylindrycznej części. Prace te wykonano w ramach badań dotyczących wstawiania nowych łańcuchów glikanowych w istniejącą sieć peptydoglikanu. Wyniki badań de Pedro zaprzeczają wcześniejszym sugestiom jego [70] a także innych autorów [26], iż nowe podjednostki mureiny są wstawiane według wzoru helikalnego. Według ostatnich doniesień de Pedro [73] proces ten przebiega na drodze trzech różnych wzorów insercji: włączania całych grup łańcuchów oligoglukanowych w postaci „łatek”, pasma w centralnej części komórki oraz regularnego, jednolitego włączania nowego materiału pomiędzy stary. Taki sposób wzrostu woreczka mureinowego postulował A.L. Koch w swojej SST teorii [52, 55].

Być może rozstrzygnięcie spornych kwestii wymaga wprowadzenia w przyszłości nowych technik, które rozwieją wszelkie wątpliwości w sposób jednoznaczny i niepodważalny.

Piśmiennictwo

1. Atrih A., Bacher G., Körner R., Allmaier G., Foster S.J.: Structural analysis of *Bacillus megaterium* KM spore peptidoglycan and its dynamics during germination. *Microbiol.* **145**, 1033–1041 (1999)
2. Barbosa M.D.F.S., Ross H.O., Hillman M.C., Meade R.P., Kurilla M.G., Pomliano D.L.: A multitarget assay for inhibitors of membrane-associated steps of peptidoglycan biosynthesis. *Anal. Biochem.* **306**, 17–22 (2002)
3. Barnickel G., Labischinski H., Bradaczek H., Giesbrecht P.: Conformational energy calculation on the peptide part of murein. *Eur. J. Biochem.* **95**, 157–165 (1979)
4. Bateman A., Bycroft M.: The structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD). *J. Mol. Biol.* **299**, 1113–1119 (2000)
5. Bayer M.E.: Zones of membrane adhesion in the cryofixed envelope of *Escherichia coli*. *J. Struct. Biol.* **107**, 268–280 (1991)
6. Berardino M.D., Dijkstra A., Stüber D., Keck W., Gubler M.: The monofunctional glycosyltransferase of *Escherichia coli* is a member of a new class of peptidoglycan-synthesising enzymes. *FEBS Lett.* **392**, 184–188 (1996)
7. Braun V., Gnrke H., Henning U., Rehn K.: Model for the structure of the shape-maintaining layer of the *Escherichia coli* cell envelope. *J. Bacteriol.* **114**, 1264–1270 (1973)
8. Buddelmeijer N., Beckwith J.: Assembly of cell division proteins at the *E. coli* cell center. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 553–557 (2002)
9. Burman L.G., Raichler J., Park J.T.: Evidence for diffuse growth of the cylindrical portion of the *Escherichia coli* murein sacculus. *J. Bacteriol.* **155**, 983–988 (1983)
10. Burman L.G., Park J.T.: Changes in the composition of *Escherichia coli* murein as it ages during exponential growth. *J. Bacteriol.* **155**, 447–453 (1983)

11. Burman L.G., Park J.T.: Molecular model for elongation of the murein sacculus of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1844–1848 (1984)
12. Cabeen M.T., Jacobs-Wagner Ch.: Bacterial cell shape. *Nature Rev. Microbiol.* **3**, 601–610 (2005)
13. Caparrós M., Pisabarro A.G., de Pedro M.A.: Effect of D-amino acids on structure and synthesis of peptidoglycan in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**, 5549–5559 (1992)
14. Chandrakala B., Elias B.C., Mehra U., Umapathy N.S., Dwarakanath P., Balganesht S., de Sousa S.M.: Novel scintillation proximity assay for measuring membrane-associated steps of peptidoglycan biosynthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 768–775 (2001)
15. Charpentier X., Chalut Ch., Rémy M.H., Masson J.M.: Penicillin-binding proteins 1a and 1b form independent dimers in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**, 3749–3752 (2002)
16. Cooper S., Hsieh M.L., Guenther B.: Mode of peptidoglycan synthesis in *Salmonella typhimurium*: single-strand insertion. *J. Bacteriol.* **170**, 3509–3512 (1988)
17. Cooper S.: The constrained hoop: an explanation of the overshoot in cell length during a shift-up of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**, 5239–5243 (1989)
18. Cooper S.: Synthesis of the cell surface during the division cycle of rod-shaped, Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **55**, 649–674 (1991)
19. Daniel R.A., Errington J.: Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell*, **113**, 767–776 (2003)
20. Demchick P., Koch A.L.: The permeability of the wall fabric of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **178**, 768–773 (1996)
21. Dijkstra A., Keck W.: Peptidoglycan as a barrier to trans-envelope transport. *J. Bacteriol.* **178**, 5555–5562 (1996)
22. Dmitriev B.A., Ehlers S., Rietschel E.T.: Layered murein revisited: a fundamentally new concept of bacterial cell wall structure, biogenesis and function. *Med. Microbiol. Immunol.* **187**, 173–181 (1999)
23. Dmitriev B.A., Toukach F.V., Schaper K.J., Holst O., Rietschel E.T., Ehlers S.: Tertiary structure of bacterial murein: the scaffold model. *J. Bacteriol.* **185**, 3459–3468 (2003)
24. Dmitriev B.A., Toukach F.V., Ehlers S.: Towards a comprehensive view of the bacterial cell wall. *Trends Microbiol.* **13**, 569–574 (2005)
25. Errington J.: The bacterial actin cytoskeleton. *ASM News*, **69**, 608–614 (2003)
26. Figge R.M., Divakaruni A.V., Gober J.W.: MreB, the cell shape-determining bacterial actin homologue, co-ordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.* **51**, 1321–1332 (2004)
27. Formanek H., Formanek S., Wawra H.: A three-dimensional atomic model of the murein layer of bacteria. *Eur. J. Biochem.* **46**, 279–294 (1974)
28. Formanek H., Schleifer K.H., Seidel H.P.: Three-dimensional structure of peptidoglycan of bacterial cell walls: infra red investigations. *FEBS Lett.* **70**, 150–154 (1976)
29. Fuerst J.A., Sambhi S.K., Paynter J.L., Hawkins J.A., Atherton J.G.: Isolation of a bacterium resembling *Pirellula* species from primary tissue culture of the giant tiger prawn (*Penaeus monodon*). *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 3127–3134 (1991)
30. Glauner B., Höltje J.V., Schwarz U.: The composition of the murein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**, 10088–10095 (1988)
31. Gmeiner J., Essig P., Martin H.H.: Characterization of minor fragments after digestion of *Escherichia coli* murein with endo-N,O-diacetylmuramidase from *Chalaropsis*, and determination of glycan chain length. *FEBS Lett.* **138**, 109–112 (1982)
32. Graham L.L., Harris R., Villiger W., Beveridge T.J.: Freeze-substitution of Gram-negative Eubacteria: General cell morphology and envelope profiles. *J. Bacteriol.* **173**, 1623–1633 (1991)
33. Hara H., Suzuki H.: A novel glycan polymerase that synthesizes uncross-linked peptidoglycan in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **168**, 155–160 (1984)
34. Harris F., Brandenburg K., Seydel U., Phoenix D.: Investigations into the mechanisms used by the C-terminal anchors of *Escherichia coli* penicillin-binding proteins 4, 5, 6 and 6b for membrane interaction. *Eur. J. Biochem.* **269**, 5821–5829 (2002)
35. Harz H., Burgdorf K., Höltje J.V.: Isolation and separation of the glycan strands from murein of *Escherichia coli* by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **190**, 120–128 (1990)
36. Hirao T., Sato M., Shirahata A., Kamio Y.: Covalent linkage of polyamines to peptidoglycan in *Anaerovibrio lipolytica*. *J. Bacteriol.* **182**, 1154–1157 (2000)
37. Hoare D.S., Work E.: The stereoisomers of alpha epsilon-diaminopimelic acid. II. Their distribution in the bacterial order Actinomycetales and in certain Eubacteriales. *Biochem. J.* **65**, 441–447 (1957)
38. Hobot J.A., Carlemalm E., Villiger W., Kellenberger E.: Periplasmic gel: new concept resulting from the reinvestigation of bacterial cell envelope ultrastructure by new methods. *J. Bacteriol.* **160**, 143–152 (1984)
39. Hoiczyc E., Hansel A.: Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. *J. Bacteriol.* **182** (2000)
40. Höltje J.V., Glauner B.: Structure and metabolism of *Escherichia coli* sacculus. *Res. Microbiol.* **141**, 75–89 (1990)
41. Höltje J.V.: From growth to autolysis: the murein hydrolases in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **164**, 243–254 (1995)
42. Höltje J.V.: A hypothetical holoenzyme involved in the replication of the murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol.* **142**, 1911–1918 (1996)
43. Janakiraman A., Goldberg M.B.: Recent advances on the development of bacterial poles. *Trends Microbiol.* **12**, 518–525 (2004)
44. Johannsen L., Toth L.A., Rosenthal R.S., Opp M.R., Obal Jr F., Cady A.B., Krueger J.M.: Somnogenic, pyrogenic, and hematologic effects of bacterial peptidoglycan. *Am. J. Physiol. – Reg. I.* **25**, 182–186 (1990)
45. Jones L.J.F., Carballido-Lopez R, Errington J.: Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell*, **104**, 913–922 (2001)
46. de Jonge B.L.M., Wientjes F.B., Jurida I., Driehuis F., Wouters J.T.M., Nanninga N.: Peptidoglycan synthesis during the cell cycle of *Escherichia coli*: composition and mode of insertion. *J. Bacteriol.* **171**, 5783–5794 (1989)
47. Kelemen M.V., Rogers H.J.: Three-dimensional molecular models of bacterial cell wall mucopeptides (peptidoglycans). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 992–996 (1971)
48. Khattar M.M., Begg K.J., Donachie W.D.: Identification of FtsW and characterization of a new *ftsW* division mutant of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**, 7140–7147 (1994)
49. Koch A.L., Lane S.L., Miller J.A., Nickens D.G.: Contraction of filaments of *Escherichia coli* after disruption of cell membrane by detergent. *J. Bacteriol.* **169**, 1979–1984 (1987)
50. Koch A.L., Woeste S.: Elasticity of the sacculus of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**, 4811–4819 (1992)

51. Koch A.L.: The three-for-one model for Gram-negative wall growth: a problem and a possible solution. *FEMS Microbiol. Lett.* **162**, 127–134 (1998)
52. Koch A.L.: Orientation of the peptidoglycan chains in the sacculus of *Escherichia coli*; *Res. Microbiol.* **149**, 689–701 (1998)
53. Koch A.L.: Simulation of the conformation of the murein fabric: the oligoglycan, penta-muropeptide, and cross-linked nona-muropeptide. *Arch. Microbiol.* **174**, 429–439 (2000)
54. Koch A.L.: The bacterium's way for safe enlargement and division. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3657–3663 (2000)
55. Koch A.L.: Why are rod-shaped bacteria rod-shaped? *Trends Microbiol.* **10**, 452–455 (2002)
56. Labischinski H., Barnickel G., Bradaczek H., Giesbrecht P.: On the secondary and tertiary structure of murein. Low and medium-angle X-ray evidence against chitin-based conformations of bacterial peptidoglycan. *Eur. J. Biochem.* **95**, 147–155 (1979)
57. Labischinski H., Goodell E.W., Goodell A., Hochberg M.L.: Direct proof of a 'more-than-single-layered' peptidoglycan architecture of *Escherichia coli* W7: a neutron small-angle scattering study. *J. Bacteriol.* **173**, 751–756 (1991)
58. Latch J.N., Margolin W.: Generation of buds, swellings, and branches instead of filaments after blocking the cell cycle of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **179**, 2373–2381 (1997)
59. Leduc M., Fréhel C., Siegel E., van Heijenoort J.: Multi-layered distribution of peptidoglycan in the periplasmic space of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 1243–1254 (1989)
60. Lee V.T., Schneewind O.: Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Genes Dev.* **15**, 1725–1752 (2001)
61. Lee W., Mc Donough M.A., Kotra L., Li Z.H., Salvagi N.R., Takeda Y., Kelly J.A., Mobashery S.: A 1,2 – Å snapshot of the final step of bacterial wall biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 1427–1431 (2001)
62. Lin M., Rikihisa Y.: *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. *Infect. Immun.* **71** (2003)
63. Lommatzsch J., Templin M.F., Kraft A.R., Vollmer W., Höltje J.V.: Outer membrane localization of murein hydrolases: MltA, a third lipoprotein lytic transglycosylase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**, 5465–5470 (1997)
64. Löwe J., van den Ent F.: Conserved sequence motif at the C-terminus of the bacterial cell-division protein FtsA. *Biochimie*, **83**, 117–120 (2001)
65. Margolin W.: Bacterial shape: growing off this mortal coil. *Curr. Opin. Biol.*, **13**, 705–707 (2003)
66. Mileyskova E., Dowhan W.: Role of membrane lipids in bacterial division-site selection. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 135–142 (2005)
67. Nanninga N.: Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 110–129 (1998)
68. Norris V., Woldringh C., Milykovskaya E.: A hypothesis to explain division site selection in *Escherichia coli* by combining nucleoid occlusion and Min. *FEBS Lett.* **561**, 3–10 (2004)
69. Park J.T., Hancock R.: A fractionation procedure for studies of the synthesis of cell-wall mucopeptide and of other polymers in cells of *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* **22**, 249–258 (1960)
70. de Pedro M.A., Quintela J.C., Höltje J.V., Schwarz U.: Murein segregation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**, 2823–2834 (1997)
71. de Pedro M.A., Donachie W.D., Höltje J.V., Schwarz U.: Constitutive septal murein synthesis in *Escherichia coli* with impaired activity of the morphogenetic proteins RodA and penicillin-binding protein 2. *J. Bacteriol.* **183**, 4115–4126 (2001)
72. de Pedro M.A., Young K.D., Höltje J.V., Schwarz H.: Branching of *Escherichia coli* cells arises from multiple sites of inert peptidoglycan. *J. Bacteriol.*, **185**, 1147–1152 (2003)
73. de Pedro M.A., Schwarz H., Koch A.L.: Patchiness of murein insertion into the sidewall of *Escherichia coli*. *Microbiol.* **149**, 1753–1761 (2003)
74. Pink D., Moeller J., Quinn B., Jericho M., Beveridge T.: On the architecture of the Gram-negative bacterial murein sacculus. *J. Bacteriol.* **182**, 5925–5930 (2000)
75. Quintela J.C., Caparrós M., de Pedro M.A.: Variability of peptidoglycan structural parameters in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **125**, 95–100 (1995)
76. Romeis T., Höltje J.V.: Specific interaction of penicillin-binding proteins 3 and 7/8 with soluble lytic transglycosylase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**, 21603–21607 (1994)
77. Rothfield L.: New insights into the developmental history of the bacterial cell division site. *J. Bacteriol.* **185**, 1125–1127 (2003)
78. Schiffer G., Höltje J.V.: Cloning and characterization of PBP1c, a third member of the multimodular class A penicillin-binding proteins of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **274**, 32031–32039 (1999)
79. Schleifer K.H., Kandler O.: *Micrococcus lysodeicticus*: a new type of cross-linkage of the murein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **28**, 965–972 (1967)
80. Schleifer K.H., Kandler O.: Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **36**, 407–477 (1972)
81. Schnaitman C.A.: Solubilization of the cytoplasmic membrane *Escherichia coli* by Triton X-100. *J. Bacteriol.* **108**, 545–552 (1971)
82. Shih Y.L., Le T., Rothfield L.: Division site selection in *Escherichia coli* involves dynamic redistribution of Min proteins within coiled structures that extend between the two cell poles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 7865–7870 (2003)
83. Signoretto C., del Mar Lleó M., Canepari P.: Modification of the peptidoglycan of *Escherichia coli* in the viable but non-culturable state. *Curr. Microbiol.* **44**, 125–131 (2002)
84. Soufo H.J.D., Graumann P.L.: Dynamic movement of actin-like proteins within bacterial cells. *EMBO Rep.* **5**, 789–794 (2004)
85. Spratt B.G., Zhou J., Taylor M., Merrick M.J.: Monofunctional biosynthetic peptidoglycan transglycosylases. *Mol. Microbiol.* **19**, 639–647 (1996)
86. Stevens C.M., Halpern P.E., Gigger R.P.: Occurrence of D-amino acids in some natural materials. *J. Biol. Chem.* **190**, 705–710 (1951)
87. Terrak M., Ghost T.K., van Heijenoort J., van Beeumen J., Lampilas M., Aszodi J., Ayala J.A., Ghuysen J.M., Nguyen-Distèche M.: The catalytic, glycosyl transferase and acyl transferase modules of the cell wall peptidoglycan-polymerizing penicillin-binding protein 1b of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **34**, 350–364 (1999)
88. Vázquez-Laslop N., Lee H., Hu R., Neyfakh A.A.: Molecular sieve mechanism of selective release of cytoplasmic proteins by osmotically shocked *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**, 2399–2404 (2001)
89. Verwer R.W.H., Nanninga N., Keck W., Schwarz U.: Arrangement of glycan chains in the sacculus of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **136**, 723–729 (1978)

90. Verwer R.W.H., Beachey E.H., Keck W., Stoub A.M., Poldermans J.E.: Oriented fragmentation of *Escherichia coli* sacculi by sonication. *J. Bacteriol.* **141**, 327–332 (1980)
91. Vollmer W., von Rechenberg M., Höltje J.V.: Demonstration of molecular interactions between the murein polymerase PBP1B, the lytic transglycosylase MltA, and the scaffolding protein MipA of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **274**, 6726–6734 (1999)
92. Vollmer W., Höltje J.V.: The architecture of the murein (peptidoglycan) in Gram-negative bacteria: vertical scaffold or horizontal layer(s)? *J. Bacteriol.* **186**, 5978–5987 (2004)
93. Weidel W., Pelzer H.: Bagshaped macromolecules – a new outlook on bacterial cell walls. *Adv. Enzymol. RAMB*, **26**, 193–232 (1964)
94. Wientjes F.B., Pas E., Taschner P.E.M., Woldringh C.L.: Kinetics of uptake and incorporation of meso-diaminopimelic acid in different *Escherichia coli* strains. *J. Bacteriol.* **164**, 331–337 (1985)
95. Wientjes F.B., Nanninga N.: Rate and topography of peptidoglycan synthesis during cell division in *Escherichia coli*: concept of a leading edge. *J. Bacteriol.* **171**, 3412–3419 (1989)
96. Wientjes F.B., Woldringh C.L., Nanninga N.: Amount of peptidoglycan in cell walls of Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **173**, 7684–7691 (1991)
97. Yao X., Jericho M., Pink D., Beveridge T.: Thickness and elasticity of Gram-negative murein sacculi measured by atomic force microscopy. *J. Bacteriol.* **181**, 6865–6875 (1999)
98. Young K.D.: A simple gel electrophoretic method for analyzing the muropeptide composition of bacterial peptidoglycan. *J. Bacteriol.* **178**, 3962–3966 (1996)
99. Young K.D.: Bacterial shape. *Mol. Microbiol.* **49**, 571–580 (2003)
100. Zaritsky A., Woldringh C.L., Mirelman D.: Constant peptidoglycan density in the sacculus of *Escherichia coli* B/r growing at different rates. *FEBS Lett.* **98**, 29–31 (1979)

ATYPOWE SZCZEPY GRONKOWCA ZŁOCISTEGO (*STAPHYLOCOCCUS AUREUS*) NIE POSIADAJĄCE KOAGULAZY LUB CZYNNIKA ZLEPNEGO (CF)

Katarzyna Garbacz, Janusz Galiński

Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Akademii Medycznej, ul. Do Studzienki 38, 80-227 Gdańsk,
tel.: 349 18 45, fax: 349 18 29, e-mail: kasgab@amg.gda.pl

Wpłynęło w maju 2005 r.

1. Wprowadzenie. 2. Występowanie atypowych szczepów *S. aureus* pozbawionych koagulazy (CNSA) lub CF (CFNSA). 3. Właściwości szczepów atypowych. 4. Przyczyny braku koagulazy lub CF. 5. Metycylinooporność a szczepy atypowe *S. aureus*. 6. Podsumowanie

Atypical *Staphylococcus aureus* strains defective in coagulase or clumping factor (CF)

Abstract: Production of coagulase and clumping factor is a typical feature for *S. aureus* species, although strains not producing these proteins have been reported. Frequency of strains showing negative reaction for coagulase or CF is assessed for 3 to 20%. CF-negative *S. aureus* may lose other proteins typical for this species, as protein A or thermostable nuclease. Lack of coagulase or CF in some *S. aureus* strains has not been explained, presumably it is not result of genetic defect but rather inhibition of expression of coagulase or CF gene. Coagulase-negative or CF-negative strains of *S. aureus* are in majority methicillin-resistant. This fact is probably connected with integration of methicillin-resistance region to genome of *S. aureus*. This phenomenon may increase ability of the strain to recombine and in result, causes lack of some properties typical for *S. aureus*.

1. Introduction. 2. Occurrence of coagulase-negative (CNSA) or CF-negative (CFNSA) *S. aureus* strains. 2. Properties of atypical *S. aureus* strains. 3. Causes for lack of coagulase or CF. 4. Resistance to methicillin and atypical *S. aureus* strains. 5. Summary

Słowo kluczowe: *S. aureus*, koagulazoujemne, CF-ujemne szczepy

Key words: *S. aureus*, coagulase negative, CF-negative strains

1. Wprowadzenie

Zdolność jednoczesnego wytwarzania koagulazy i czynnika zlepnego (clumping factor) jest cechą charakterystyczną dla gatunku *Staphylococcus aureus* [3, 43, 44]. Cecha ta odgrywa istotną rolę w jego taksonomii, a także w diagnostyce mikrobiologicznej [3, 17, 18]. Wyjątkowo napotymane są jednak szczepy atypowe pozbawione jednego, a nawet obydwu tych czynników. Wzmianki o istnieniu takich szczepów można natknąć w starszym piśmiennictwie, niemniej występowanie ich określane jest tam jako sporadyczne i traktowane jako anomalia [2, 5, 12, 15]. W ostatnich latach ukazały się doniesienia z różnych krajów (Niemiec, Włoch, Wielkiej Brytanii, Francji, a także Polski) wskazujące na to, że nastąpił wzrost częstości izolacji szczepów gronkowca złocistego, które wykazują ujemny odczyn na koagulazę bądź CF [10, 11, 32, 40, 49].

2. Występowanie szczepów *S. aureus* pozbawionych koagulazy (CNSA) lub CF (CFNSA)

Częstość izolowania koagulazoujemnych szczepów *S. aureus* obecnie oceniana jest na kilka do kilkunastu procent. We Włoszech i Francji odsetek CNSA szaco-

wany był na poziomie około 4%, podobnie jak w Kanadzie gdzie wynosił prawie 3% [11, 23, 49]. Z badań innych autorów wynika, że w naszym kraju częstość izolacji CNSA jest nieco wyższa, bo około 8–12%, a nawet jak podaje Szymbanska i wsp. 20–25% [8, 9, 45].

W nielicznych pracach poświęconych szczepom CF-ujemnym trudno znaleźć informację na temat częstości ich izolowania. Dane przedstawione przez Vandenescha czy Guzmaną pozwalają wnioskować o częstszym występowaniu na terenie Francji czy Włoch szczepów pozbawionych CF niż koagulazy [11, 49]. Badania prowadzone w Polsce, odmienne do powyższych wykazały, że częstość występowania szczepów *S. aureus* pozbawionych CF (CFNSA) była prawie dwukrotnie niższa niż pozbawionych koagulazy [8, 9].

Szczepy *S. aureus* nie posiadające CF izoluje się również z zakażeń u zwierząt, a ich odsetek szacowany jest na poziomie aż kilkunastu procent [22].

Istnieją doniesienia o pojawianiu się niekiedy gronkowców złocistych jednocześnie pozbawionych koagulazy i CF lecz częstość ich występowania jest bardzo niska, bo sięga zaledwie 1% [38, 45].

Badania nad występowaniem w szpitalach koagulazoujemnych lub CF-ujemnych szczepów *S. aureus*

dowodzą, że izoluje się je przede wszystkim w oddziałach zabiegowych. Wydaje się, że zakażenia szczepami CFNSA dotyczą ludzi z obniżoną odpornością, bowiem przypadki opisane w Niemczech i Wielkiej Brytanii mówią o pacjentach w ciężkim stanie po hemodializie lub z chorobą nowotworową, przebywających w oddziale intensywnej opieki medycznej [24, 40]. Jak podają autorzy z Polski i Wielkiej Brytanii szczepa CNSA izolowano z oddziałów chirurgii, neurochirurgii, ortopedii oraz transplantacji [9, 26, 32].

3. Właściwości szczepów atypowych

Analiza właściwości szczepów atypowych *S. aureus* pozwala sądzić, że poza brakiem koagulazy czy CF posiadają one w większości gatunkowo typowe cechy [9, 26]. Niemniej zdarzają się szczepy pozbawione również innych niż koagulaza czy CF swoistych dla gatunku białek. Dotyczy to przede wszystkim szczepów CFNSA, które mogą być pozbawione białka A lub termostabilnej nukleazy. Jak wynika z badań autorów defekt w postaci braku białka A może dotyczyć nawet przeważającej części szczepów CF-ujemnych [9]. Zdecydowanie rzadziej brak tych czynników dotyczy koagulazoujemnych gronkowców, jednak jak podaje Van d e n e s c h takie szczepy też są niekiedy izolowane [49].

Pojawianie się atypowych *S. aureus* stanowi duże ryzyko błędnej ich identyfikacji, ponieważ koagulaza i CF stanowią podstawę wstępnego rozpoznania gatunku [17, 18]. Pojawianie się szczepów jednocześnie pozbawionych kilku gatunkowo swoistych czynników zwiększa prawdopodobieństwo niewłaściwego ich rozpoznania, co może mieć swoje konsekwencje kliniczne i epidemiologiczne [32, 33]. Jak wynika z pracy Ne v i l l e ' a niewytwarzanie przez CFNSA białka A może fałszować wyniki komercyjnych testów lateksowych, takie jak Staphaurex, w których rozpoznanie gatunku polega na wykrywaniu CF i białka A [32].

Wydaje się, że jednoczesny brak zdolności wytwarzania clumping factor i białka A przez niektóre szczepy gronkowca złocistego może wynikać z mutacji we wspólnym systemie regulacji ekspresji białek, nazywanego *agr*. W tym systemie ta sama cząstka regulatorowa (RNAIII) kontroluje aktywność licznych genów i operonów *S. aureus* w odpowiedzi na różnorodne bodźce ze środowiska. Sygnały te powodują uwalnianie peptydu sygnałowego pobudzającego kaskadowe wytwarzanie transkryptu RNAIII, który jest cząstką efektorową odpowiedzi *agr*. Cząstka RNAIII powoduje w fazie wzrostu logarytmicznego zahamowanie syntezy pewnych białek i jednocześnie indukuje wytwarzanie innych. Zbadano, że następuje wtedy pobudzenie ekspresji genów nukleazy, lipazy, hialuronidazy, leukocy-

dyny, eksfoliatyny, TSST i toksyny epidermolitycznej oraz zahamowanie wytwarzania białka A i clumping factor [51]. Wydaje się więc prawdopodobne, że jednoczesna utrata zdolności wytwarzania CF i białka A przez niektóre szczepy *S. aureus* może wynikać ze zmian w systemie regulacji ekspresji tych białek – *agr*.

Badania pokrewieństwa szczepów atypowych *S. aureus* nie wykazały jednoznacznie czy są to szczepy należące do jednej linii klonalnej. Z jednej strony wyniki uzyskane przez S c h w a r z k o p f e dowodzą rozprzestrzenienia się na terenie szpitali w Niemczech jednego klonu CF-ujemnych szczepów *S. aureus* [39]. Z drugiej zaś strony okazało się, że gronkowce złociste pozbawione koagulazy izolowane w Polsce należą do kilku klonów [27]. Również z badań prowadzonych przez autorów wynika, że szczepy atypowe stanowią grupy o niejednolitej strukturze klonalnej [8, 9].

4. Przyczyny braku koagulazy lub CF u atypowych szczepów *S. aureus*

Pytanie o przyczynę pojawiania się szczepów *S. aureus* nie posiadających koagulazy czy CF nie znalazło jak dotąd jednoznacznej odpowiedzi. Rozpatrywane są zarówno uwarunkowania fenotypowe i genetyczne.

Uważa się, że brak koagulazy może wynikać z zahamowania wydzielania jej na zewnątrz komórki i wiązania z błoną cytoplazmatyczną [6]. Wymienia się również wiele możliwych przyczyn mających uwarunkowania w genomie *S. aureus*. Opisano insercję transpozonu (Tn917), jak również mutacje związane z opornością na antybiotyki, w wyniku których doszło do zahamowania syntezy koagulazy. D u v a l wymienia utratę zdolności ścinania osocza jako jeden z efektów konwersji lizogennej z niektórymi fagami (LS1 i LS2) [26]. Istnieją także hipotezy na temat mutacji w systemach regulacji ekspresji (np. *agr*) genu koagulazy owo-cujące zahamowaniem jej wytwarzania.

Niemniej jako zasadniczą genetyczną przyczynę tego zjawiska rozpatruje się brak samego genu *coa*, odpowiedzialnego za wytwarzanie koagulazy. Niektóre prace mówią o utracie genu *coa* przez szczepy CNSA [29] inne zaś wskazują na możliwość występowania allelicznego do *coa* genu *fbpA*, który koduje białko wiążące fibrynogen i występuje alternatywnie do genu *coa* w tym samym miejscu replikonu [42]. Szacuje się, że około 20% szczepów *S. aureus* zamiast genu *coa* posiada gen *fbpA* [42].

Z drugiej zaś strony badania autorów dowodzą, że koagulazoujemne szczepy *S. aureus* posiadają gen warunkujący wytwarzanie koagulazy [8, 9]. W związku z powyższym można przypuszczać, że brak koagulazy ma swoje uwarunkowania fenotypowe lub wynika z zahamowania ekspresji genu koagulazy. Na tę ostat-

nią możliwość wskazują badania przeprowadzone przez Vandenescha na szczepach CNSA, które dowiodły, że brak koagulazy był spowodowany blokadą ekspresji genu koagulazy, a nie brakiem samego genu. Zahamowanie wytwarzania koagulazy u połowy badanych CNSA miało miejsce na etapie transkrypcji, a u połowy na etapie translacji genu koagulazy [50].

Przyczyny braku CF u szczepów *S. aureus* są jeszcze słabiej poznane niż zjawisko braku koagulazy. W starszym piśmiennictwie pojawia się wzmianka na temat utraty czynnika zlepnego przez niektóre szczepy *S. aureus* na skutek wielokrotnego pasażowania bądź niewłaściwego przechowywania [5, 46]. Badania genetyczne sugerują, że przyczyną utraty CF może być insercja transpozonu lub integracja plazmidowych genów do chromosomu [26].

Prawdopodobne jest, że anomalie w wytwarzaniu gatunkowo swoistych białek, koagulazy lub czynnika zlepnego, spowodowane są mutacjami w którymś z globalnych systemów regulacji ekspresji białek u *S. aureus*, takich jak wcześniej wspomniany *agr* czy też *sar*, *sB*, *mgrA*.

5. Metycylinooporność a szczepy atypowe *S. aureus*

Wzrost częstości izolacji szczepów pozbawionych koagulazy bądź CF przypada na lata, w których istotną rolę w zakażeniach *S. aureus* zaczęły odgrywać odporne na metycylinę gronkowce złociste [30]. Pojawienie się szczepów *S. aureus* opornych na ten antybiotyk, w skrócie MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) odnotowano na początku lat 60-tych, tuż po wprowadzeniu do lecznictwa metycyliny [14, 19].

Metycylina jest przedstawicielem penicylin niewrażliwych na penicylinazy gronkowcowe, których wprowadzenie było spowodowane powszechną opornością szczepów *S. aureus* na penicylinę benzylową [1, 4, 21, 47]. Mechanizm oporności na metycylinę nie wynika z produkcji penicylinaz, ale z modyfikacji w białku PBP, które u szczepów opornych jest zastępowane przez zmutowane białko PBP2a, niezdolne do łączenia z antybiotykami b-laktamowymi. Tym samym antybiotyki te nie wykazują aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec szczepów MRSA [37, 48]. Wytwarzanie zmutowanego białka PBP2a warunkuje gen *mec A*, zlokalizowany na chromosomie [31].

Początkowo izolowane szczepy MRSA cechowała jedynie oporność na antybiotyki β -laktamowe [19]. W latach 80-tych pojawiły się nowe szczepy metycylinoopornych gronkowców złocistych cechujące się również opornością na antybiotyki, inne niż β -laktamowe oraz nastąpił wzrost częstości ich izolacji z zakażeń szpitalnych [35, 36, 38]. W latach 90-tych MRSA stały się jednym, z ważniejszych czynników zakażeń szpi-

talnych stanowiąc problem zarówno terapeutyczny jak i epidemiologiczny [16, 20, 34, 41].

Dotychczasowe badania wskazują, że ujemny odczyn na koagulazę lub clumping factor dotyczy przede wszystkim metycylinoopornych *S. aureus*. Ponad 60% szczepów CNSA izolowanych we Francji cechowała oporność na metycylinę [49]. Występujące w innych krajach atypowe gronkowce złociste to również wyłącznie albo przede wszystkim szczepy MRSA [24, 32, 40]. Spostrzeżenie to dotyczy także naszego kraju, bowiem wśród szczepów pozbawionych koagulazy bądź CF izolowanych ze szpitali zaznacza się wyraźna dominacja metycylinoopornych *S. aureus* [8, 9, 26, 27].

Związek pomiędzy metycylinoopornością a utratą koagulazy czy CF wynika prawdopodobnie z faktu obecności obok genu metycylinooporności (*mecA*) ruchomych elementów DNA, takich jak sekwencje insercyjne czy transpozony, które nadają temu fragmentowi dużą zdolność do zmienności genetycznej [28, 29]. Dlatego nabywanie oporności na metycylinę może powodować reorganizacje w genomie *S. aureus* skutkujące utratą pewnych typowych dla gatunku właściwości.

6. Podsumowanie

Mimo, że wytwarzanie koagulazy i czynnika zlepnego (CF) jest cechą gatunkową *S. aureus*, to zdarzają się szczepy nie posiadające ich. Częstość izolowania szczepów atypowych szacuje się najczęściej na poziomie kilku do kilkunastu procent. Gronkowce złociste nie posiadające CF może również cechować brak innych typowych dla gatunku właściwości, takich jak wytwarzanie białka A czy termostabilnej nukleazy. Przyczyny ujemnego odczynu na koagulazę czy CF u niektórych *S. aureus* nie są dokładnie znane, przypuszcza się, że nie wynikają one z utraty genów kodujących te białka, ale z zahamowania ich ekspresji. Utrata koagulazy lub CF dotyczy przede wszystkim szczepów gronkowców złocistych opornych na metycylinę (MRSA). Fakt ten prawdopodobnie wynika z nabywania regionu metycylinooporności, który zwiększa zdolność szczepu do rekombinacji genetycznych, które owocują utratą pewnych gatunkowo swoistych cech.

Piśmiennictwo

1. Barber M., Rozwadowska-Dowzenko M.: Infection by penicillin-resistant staphylococci. *Lancet*, **2**, 641–644 (1948)
2. Barret S.P.: Rate isolation of *Staphylococcus aureus* strains possessing coagulase or clumping factor. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* **2**, 475–476 (1983)
3. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (wyd. X) red. J.G. Holt, N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, Williams and Wilkins, Baltimore 1994

4. Brumfit W.M.D., Hamilton-Miller J.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *N. Engl. J. Med.* **320**, 1188–1196 (1989)
5. Dziarski R., Hryniewicz W., Ludwicka L., Świtalski L.M., Jeliaszewicz J.: Właściwości biologiczne składników ściany komórkowej gronkowców i paciorkowców. *Post. Mikrobiol.* **15**, 107–143 (1976)
6. Fung J.C., Kaplan M.H.K., Hsieh H.C.: Phenotypical and genotypical characterization of epidemic clumping factor-negative, oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **20**, 115 (1984)
7. Garbacz K., Piechowicz L., Wiśniewska K., Galiński J.: Charakterystyka metycylinoopornych gronkowców złocistych (MRSA) regionu gdańskiego w oparciu o polimorfizm genu koagulazy. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **53**, 311–319 (2001)
8. Garbacz K., Piechowicz L., Wiśniewska K., Galiński J.: Charakterystyka defektywnych szczepów MRSA nie wytwarzających koagulazy lub czynnika CF. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **54**, 1–8 (2002)
9. Garbacz K.: Występowania i charakterystyka koagulazoujemnych i CF-ujemnych szczepów gronkowców złocistych. Praca doktorska, Akademia Medyczna w Gdańsku 2004
10. Golledge C., Gordon A.: Slide coagulase positive, tube coagulase negative *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, **567**, 443 (1989)
11. Guzman C.A., Guardati M.C., Fenoglio D., Coratza G., Pruzzo C., Satta G.: Novel immunoenzymatic assay for identification coagulase- and protein A-negative *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 1194–1197 (1992)
12. Jeljaszewicz J.: Badania nad koagulazami gronkowcowymi. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **12**, 21–32 (1960)
13. Jeljaszewicz J.: Badania nad koagulazami gronkowcowymi. Występowanie różnych czynników toksycznych i biochemicznych wśród koagulazoujemnych i koagulazododatnich szczepów gronkowców. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **12**, 33–41 (1960)
14. Jevons M.P.: „Celbenin” resistant *Staphylococcus aureus*. *Br. Med. J.* **1**, 124–125 (1961)
15. Kaczmarek E.: Koagulaza gronkowcowa. *Post. Hig. Med. Dośw.* **40**, 268–288 (1986)
16. Kerr S., Kerr G.E., Mackintosh C.A., Marples R.R.: A survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* affecting patients in England and Wales. *J. Hosp. Infect.* **16**, 35–48 (1990)
17. Kloose W.E., Schleifer K.H.: Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* **1**, 82–88 (1975)
18. Kloose W.E., Schleifer K.H.: The Prokaryotes. A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg 1981, s.1548
19. Knox R.: „Celbenin” resistant staphylococci. *Br. Med. J.* **1**, 126 (1961)
20. Krzysztoń-Russjan J., Noworyta J., Ząbek J.: Analiza zmienności szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych w ciągu dwóch lat od pacjentów szpitalnych. *Mikrob. Med. zesz.* **2**, 17–23 (1999)
21. Lacey R.W.: Multi-resistant *Staphylococcus aureus* a suitable case for inactivity. *J. Hosp. Infect.* **9**, 103–105 (1987)
22. Laevans H., Devriese L.A., Deluyker H., Hommez J., Kruif A.: An atypical *Staphylococcus aureus* intramammary infection in a dairy herd. *Vet. Microbiol.* **52**, 271–275 (1996)
23. Lee V.T., Goh S.H., Byrne S.K., Vortel J., Chow W.: Analysis of the coagulase gene by polymerase chain reaction as an epidemiology typing method of *Staphylococcus aureus*. *Staphylococci and staphylococcal infections. Zbl. Bakt. Suppl.* **26**, Gustav Verlag Fischer Stuttgart 1994, 107–109
24. Mackay A.D., Quick A., Gillespie S.H., Kibbler C.C.: Coagulase-negative methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Lancet*, **342**, 492 (1993)
25. Masuda S., Seki K., Hwang S.M., Ogasawara M., Sakurada J., Murai M.: Simple methods for demonstration of staphylococcal protein A and staphylocoagulase. *The staphylococci, Zbl. Bakt. Suppl.* **2**, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York 1991, s.170
26. Młynarczyk G., Kochman M., Ławrynowicz M., Fordymacki P., Młynarczyk A., Jeliaszewicz J.: Wybrane właściwości szczepów *Staphylococcus aureus* fenotypowo wykazujących brak syntezy koagulazy. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **49**, 5–12 (1997)
27. Młynarczyk A., Młynarczyk G., Łuczak M., Jeliaszewicz J.: Zastosowanie pulsacyjnej elektroforezy do wewnątrzgatunkowego różnicowania metycylinoopornych, koagulazoujemnych szczepów *Staphylococcus aureus* (MRSA-CN). *Med. Dośw. Mikrobiol.* **51**, 207–212 (1999)
28. Młynarczyk A., Młynarczyk G., Jeliaszewicz J.: The genom of *Staphylococcus aureus*: a review. *Zbl. Bakteriol.* **287**, 277–314 (1998)
29. Młynarczyk A., Młynarczyk G., Szymanowska A., Stańczak J., Łuczak M., Jeliaszewicz J.: Zastosowanie PCR do oceny występowania genów *coa* i *nuc* u metycylinoopornych, koagulazoujemnych szczepów *Staphylococcus aureus* (MRSA-CN). *Med. Dośw. Mikrobiol.* **52**, 217–222 (2000)
30. Morita M.M.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: past, present and future. *Infect. Control.* **28**, 625–637 (1993)
31. Murakami K., Minamide W., Wada K., Nakamura E., Teraoka H., Watanabe S.: Identification of methicillin-resistant strains staphylococci by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 2240–2244 (1991)
32. Neville L.O., Billington O.J., Kibbler C.C., Gillespie S.H.: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* without clumping factor, protein A and DNase. *Lancet*, **338**, 518 (1991).
33. Pennell D., Rott-Petri J.A., Kurzynski T.A.: Evaluation of three commercial agglutination tests for the identification of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **20**, 614–617 (1984)
34. Piechowicz L., Namysł E., Galiński J.: Występowanie metycylinoopornych gronkowców złocistych w Polsce i ich charakterystyka. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **45**, 273–276 (1993)
35. Rahman N., Noble W.C., Cookson B.D.: Mupirocin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, **ii**, 387 (1987)
36. Reboli A.C., John J.F., Levkoff A.H.: Epidemic methicillin-gentamicin-resistant *Staphylococcus aureus* in neonatal intensive care unit. *Am. J. Dis. Child.* **143**, 34–39 (1989)
37. Reynolds P.E., Brown D.J.: Penicillin-binding proteins of β -lactam-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett.* **192**, 28–32 (1985)
38. Schaefer S.: Methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* resistant to quinolones. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 335–336 (1989)
39. Schwarzkopf A., Karch H., Schmidt H., Lenz W., Heesemann J.: Phenotypical and genotypical characterization of epidemic clumping factor-negative, oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 2281–2285 (1993)
40. Schwarzkopf A., Schmidt-Rotte H., Schmidt H., Kunz E., Karch H., Heesemann J.: Molecular analysis of nosocomial

- infection by oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* lacking protein A and clumping factor. *Lancet*, **340**, 621 (1992)
41. Shanson D.C.: Antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Clinical Management and Laboratory Aspects. (red.) Cafferkey MT. Marcel Dekker. N.Y., 1992, s. 11
 42. Smeltzer M.S., Gillaspay A.F., Pratt F.L.: Prevalence and chromosomal map location of *Staphylococcus aureus* adhesin genes. *Gene*, **196**, 249–259 (1997)
 43. Sperber W.H. i Tatini S.R.: Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* **29**, 502–505 (1975)
 44. Szewczyk E., Sobiś M.: Gronkowce koagulazoujemne – klasyfikacja, występowanie, chorobotwórczość. *Post. Mikrobiol.* **27**, 175–191 (1988)
 45. Szymanowska A., Sawicka-Grzelak A., Młynarczyk A., Młynarczyk G.: Ocena wrażliwości na leki i cech biochemicznych u koagulazoujemnych szczepów *S. aureus* izolowanych z materiałów klinicznych. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **45**, 11–14 (1993)
 46. Świtalski L.M.: Isolation and purification of staphylococcal clumping factor. *Staphylococci and staphylococcal diseases*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1976, s. 413–425
 47. Thornsberry C.: The development of antimicrobial resistance in staphylococci. *J. Antimicrob. Chemother.* **21**, 9–17 (1988)
 48. Ubukata K., Yamashita N., Konno M.: Occurrence of a β -lactam-inducible penicillin-binding protein in methicillin-resistant staphylococci. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **27**, 851–857 (1985)
 49. Vandenesch F., Bes M., Lebeau C., Greenland T., Brun Y., Etienne J.: Coagulase-negative *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, **342**: 995–6 (1993)
 50. Vandenesch F., Lebeau C., Bes M., Brun Y.: Coagulase deficiency in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* involves both transcriptonal and post-transcriptional defects. *J. Med. Microbiol.* **40**, 344–49 (1994)
 51. Wójcik K.J.: Regulacja syntezy czynników wirulencji w komórkach szczepów *Staphylococcus aureus*. *Post. Biol. Kom.* **24**, 77–85 (1997)

Redakcja *Postępów Mikrobiologii* gorąco dziękuje recenzentom nie będącym członkami Komitetu Redakcyjnego, którzy na naszą prośbę podjęli się oceny prac nadsyłanych do naszego pisma w latach 2004–2005:

Dr hab. Katarzynie Brzostek
Dr Pawłowi Grzesiowskiemu
Prof. dr hab. Adamowi Jaworskiemu
Dr Magdalenie Kawalec
Prof. dr hab. Wiesławowi Kacy
Prof. dr hab. Zdzisławowi Markiewiczowi
Dr Elżbiecie Stefaniuk
Prof. dr hab. Mirosławie Włodarczyk

Grzegorz Madajczak

Zakład Bakteriologii, Państwowy Zakład Higieny
ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa, e-mail: madajcza@wp.pl

Wpłynęło w sierpniu 2005 r.

1. Wstęp. 2. Aktywacja apoptozy makrofagów przez pałeczki *Salmonella*. 3. Rola białka SpvB w aktywacji procesu apoptozy. 4. Podsumowanie

Macrophages apoptosis activation by *Salmonella* rods

Abstract: Macrophages apoptosis activation is very important element of *Salmonella* rods virulence. This process lets in infection spreading on whole body, simultaneously bacteria avoid immunological system. In course of *Salmonella* depended programmed cell death at least two ways could be favored: the early apoptosis, which occurs about 45–60 minutes after bacteria internalization into macrophage and the late programmed cell death, which begins 12–20 hours later. For early apoptosis proteins encoded by genes localized in first *Salmonella* pathogenicity island are responsible. For late apoptosis proteins encoded by genes localized in second *Salmonella* pathogenicity island are responsible instead.

1. Introduction. 2. Macrophages apoptosis activation by *Salmonella* rods. 3. SpvB protein role in apoptosis activation. 4. Summary

Słowa kluczowe: aktywacja apoptozy, apoptoza makrofagów, białko SpvB, *Salmonella*

Key words: apoptosis activation, macrophages apoptosis, SpvB protein, *Salmonella*

1. Wstęp

Pałeczki *Salmonella enterica* subsp. *enterica* najczęściej wywołują zakażenia ograniczone do przewodu pokarmowego, jednak w pewnych sytuacjach dochodzi do pokonania przez te drobnoustroje bariery błony śluzowej jelita, penetracji do układu limfatycznego, czego efektem może być powstanie zakażenia uogólnionego. W uogólnieniu salmonelozy istotną rolę odgrywają makrofagi, do których pałeczki *Salmonella* wnikają wykorzystując zmiany w cytoskiecie wywołwane przez bakteryjne białka efektorowe. Wraz z makrofagami pałeczki te są roznoszone po całym organizmie, dzięki czemu docierają do narządów i tkanek. W następstwie zakażenia makrofagów pałeczkami *Salmonella*, dochodzi do obumierania tych komórek, co służy rozszerzaniu się zakażenia na kolejne komórki gospodarza.

2. Aktywacja apoptozy makrofagów przez pałeczki *Salmonella*

Do śmierci makrofagów, także tych zakażonych pałeczkami *Salmonella*, dochodzi w następstwie martwicy (*necrosis*) lub zaprogramowanej śmierci – apoptozy nazywanej samobójstwem komórki. Różnica pomiędzy obydwoimi procesami polega głównie na tym, że w przebiegu apoptozy uruchamianych jest wiele

specyficznych szlaków przekąźnikowych wymagających syntezy określonych białek. Martwica, jest natomiast procesem biernym, w którym do rozpadu komórki dochodzi w sposób niekontrolowany. Dodatkowe różnice pomiędzy obydwoimi procesami polegają również na tym, że apoptoza dotyczy pojedynczych komórek danego narządu lub tkanki, a martwica swym zasięgiem obejmuje zwykle pewien mniej lub bardziej rozległy region. Ponadto śmierć komórki przez apoptozę, w przeciwieństwie do śmierci w następstwie martwicy, nie wywołuje odpowiedzi immunologicznej.

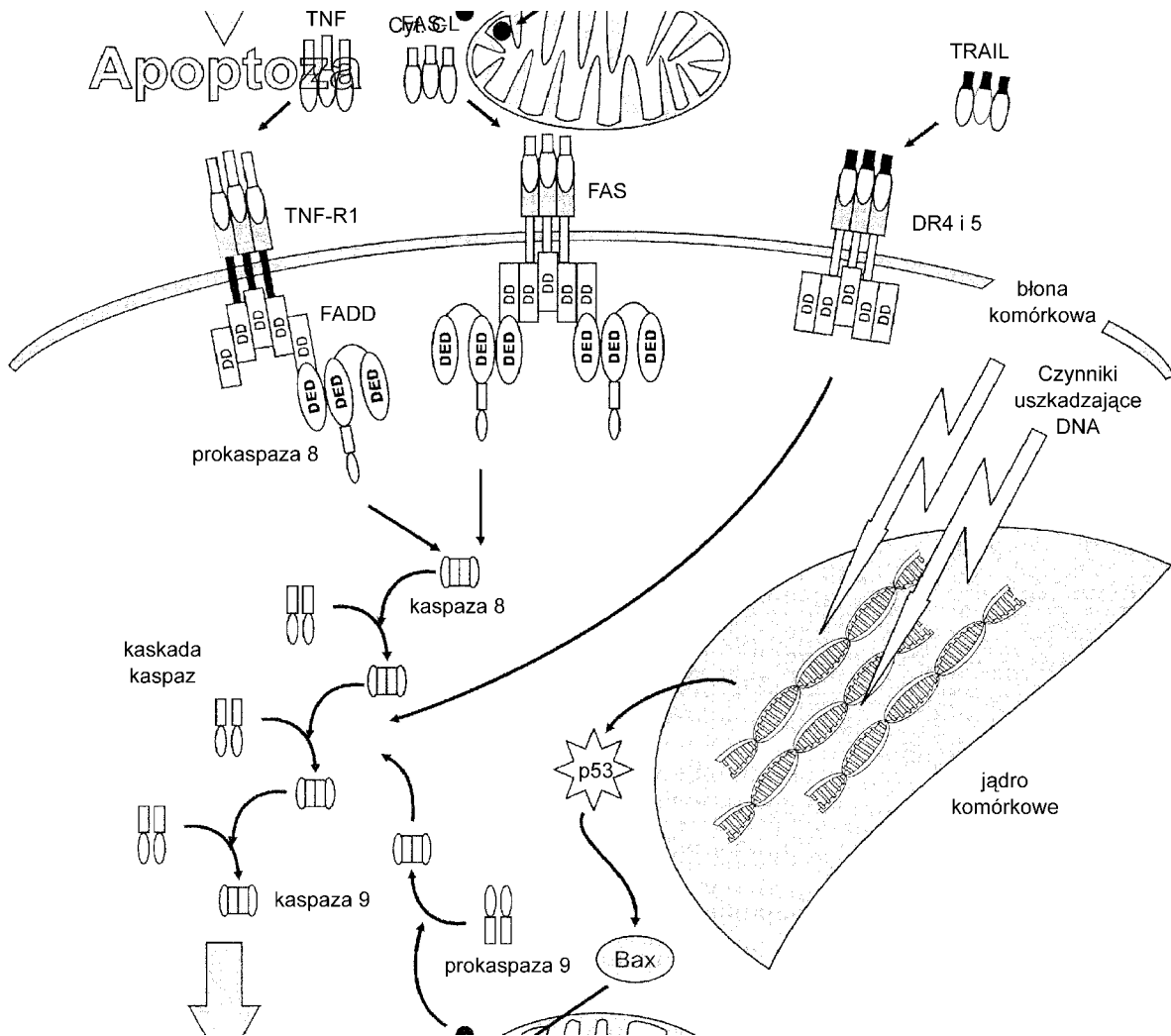
Za degradację organelli komórkowych w przebiegu apoptozy odpowiedzialne są proteazy cysteinowe – kaspazy, które hydrolizują wiązania peptydowe białek, w miejscu gdzie w sekwencji aminokwasowej występuje kwas asparaginowy. Enzymy te występują w cytoplazmie w formie nieaktywnej, a ich aktywacja polega na przecięciu prokaspazy na dwie podjednostki, między innymi przez inne kaspazy. Na końcu odcinana jest N-końcowa domena tworzącego się białka. Kaspazy pełnią co najmniej trzy funkcje w trakcie procesu apoptozy tj.: unieczynnijają inhibitory apoptozy, niszczą struktury komórkowe oraz zaburzają funkcje wypełniane przez białka, na skutek fizycznego rozdzielenia domeny regulatorowej białka od domeny katalitycznej. Obecnie znanych jest 14 kaspaz, których znaczenie dla procesu zaprogramowanej śmierci komórki jest zróżnicowane. Dotychczas uważano, że kaspaza-1 nie bierze udziału w aktywacji apoptozy, lecz indukuje

wydzielanie prozapalnej interleukiny IL-1 β [2]. Jednak ostatnie badania nad aktywacją apoptozy przez pałeczki *Shigella* i *Salmonella* wykazały jej udział w procesie apoptozy [9, 10].

W przebiegu apoptozy wyróżnia się dwa główne etapy: indukcji oraz egzekucji. W trakcie pierwszego etapu dochodzi do zapoczątkowania apoptozy na jednym z dwóch możliwych szlaków: wewnątrz- lub zewnątrzpochodnym (Rys. 1). Droga wewnątrzpochodna może być zapoczątkowana przez białko p53, które jest odpowiedzialne za nadzór nad prawidłowością materiału genetycznego. Wszelkie poważne uszkodzenia DNA doprowadzają do aktywacji tego białka, które blokuje cykl komórkowy oraz indukuje ekspresję co najmniej dwóch proapoptycznych białek z rodziny Bcl-2: białka Bax i Nox. Wspomniane białka powodują uwolnienie z mitochondriów cytochromu c, który prze-

kształca prokaspazę-9 do jej aktywnej formy – kaspazy-9 [15]. Z mitochondriów uwalniany jest również czynnik indukujący apoptozę – AIF, który doprowadza do aktywacji kaspazy-3 [25].

Do aktywacji szlaku zewnątrzpochodnego dochodzić może w wyniku związania się ligandu z tak zwanymi „receptorami śmierci” na błonie komórkowej (Rys. 1). Zaliczamy do nich: receptor dla TNF typu I (CD-120a), FAS (CD-95) i receptory dla TRAIL (DR5) [21]. Wymienione receptory posiadają w części wewnątrzkomórkowej sekwencje nazywane domenami śmierci (death domains – DD), z którymi wiążą się białka adaptorowe FADD oraz TRADD. Do nich zaś poprzez sekwencję DED przyłącza się prokaspaza-8, uczestnicząca w aktywacji innych kaspaz [21]. Innymi czynnikami „zewnętrznymi”, które mogą wywołać apoptozę komórki są: utrata kontaktu komórki z inny-



Ryc. 1. Schemat aktywacji apoptozy na drodze zewnątrz- i wewnątrzpochodnej. Na podstawie: Wójcik [24]

mi komórkami lub z podłożem (np. przez odklejenie się komórki od podłoża w hodowli), brak czynników wzrostu, a także wybrane białka bakteryjne.

W pierwszych doświadczeniach nad przeżywaniami pałeczek *Salmonella* we wnętrzu makrofagów nie zwracano uwagi na ich wpływ na zaprogramowaną śmierć komórki gospodarza. Istnienie takiego zjawiska potwierdziły dopiero późniejsze prace przeprowadzone *in vitro* i *in vivo*, jednakże uzyskiwane wyniki doświadczeń były niejednoznaczne [5]. Jedne z nich wskazywały na to, że pałeczki *Salmonella* szybko powodują apoptozę, inne zaś wykazywały, że następuje to dopiero w 24-godzinnych hodowlach [5, 7, 18]. Również obserwacje przebiegu samego procesu nie dawały jednolitych odpowiedzi na pytania nurtujące badaczy. Chen i wsp. [5] wykazali, że apoptoza w tych komórkach ma typowy przebieg z aktywacją kaspazy-3, fragmentacją chromatyny i obecnością nukleosomów w cytoplazmie. van der Velden i wsp. [22] zauważyli, że pałeczki *Salmonella* oddziałują cytotoksycznie na makrofagi, w wyniku czego obserwuje się efekt zbliżony do martwicy. Badacze ci nie stwierdzili aktywacji kaspazy-3, ale zaobserwowali dezintegrację błon komórkowych. Zacytowane rozbieżności w wynikach badań nad apoptozą w makrofagach zakażonych pałeczkami *Salmonella* dowodzą, że proces ten jest bardziej złożony niż pierwotnie sądzono.

Monack i wsp. [18] w swych doświadczeniach wykazali wczesną, bo zachodzącą już po 30 min. zwiększoną śmiertelność makrofagów zakażonych inwazyjnym szczepem *Salmonella* Typhimurium, w porównaniu do szczepów nieinwazyjnych oraz hodowli niezakażonych. Aby przekonać się o charakterze zwiększonej śmiertelności badanej linii komórkowej makrofagów, przeprowadzili badania z użyciem mikroskopii elektronowej. Pozwoliło to, już w dwie godziny po zakażeniu, na wykrycie zmian charakterystycznych dla apoptozy, takich jak: agregacja chromatyny, wakuolizacja cytoplazmy oraz fragmentacja DNA chromosomalnego na odcinki o długości 180–200 pz. Kiedy w doświadczeniach użyto nieinwazyjnych szczepów *Salmonella* Typhimurium, pozbawionych możliwości marszczenia błony komórkowej (o fenotypie Inv^-), makrofagi, do których je wprowadzono nie wykazywały zwiększonego odsetka apoptozy w porównaniu z hodowlą makrofagów niezakażonych. Zdaniem autorów wskazuje to na powiązanie mechanizmów, w wyniku których pałeczki *Salmonella* nabierają zdolności do wywoływania apoptozy z mechanizmem marszczenia błony komórkowej kontrolowanym przez białka wydzielane z udziałem trzeciego systemu sekrecji (TTSS) [18].

W doświadczeniach prowadzonych przez Chen i wsp. [5] nad apoptozą makrofagów, wywoływaną przez pałeczki *Salmonella* Typhimurium, użyto szczepów z mutacjami w obrębie genów *invA* oraz *invG*.

Szczepy takie nie powodowały efektu cytotoksycznego w hodowli komórek w ciągu trzech godzin od inokulacji, co również może świadczyć o zaangażowaniu aparatu TTSS w dostarczaniu do komórki gospodarza białek odpowiedzialnych za wywoływanie apoptozy makrofagów. W celu identyfikacji białek efektorowych uczestniczących w tym procesie, do badań użyto szczepów *Salmonella* Typhimurium posiadających mutacje w pojedynczych genach, takich jak *invJ*, *spaO*, *spiB*, *spiC* oraz *spiC*, których produkty ekspresji wydzielane są przez TTSS-1. Każdy ze szczepów, z mutacją w jednym z wyżej wymienionych genów, wykazywał obniżoną zdolność do wywoływania apoptozy w badanej linii komórkowej makrofagów.

Zgodnie z wynikami badań, przeprowadzonych przez Hersh i wsp. [9], czynnikiem odpowiedzialnym za aktywację zaprogramowanej śmierci makrofaga jest białko SipB, które jest transportowane do cytozolu komórki gospodarza poprzez TTSS. Jak już wspomniano wcześniej, białko to kodowane jest przez gen *sipB*, zlokalizowany w obrębie pierwszej wyspy patogenności (SPI-1), a mikroiniekcja oczyszczonego białka do makrofaga doprowadza do śmierci komórki, z objawami charakterystycznymi dla apoptozy. Białko to wykazuje wysoką homologię do białka IpaB, wytwarzanego przez *Shigella flexneri*, które podczas zakażenia tymi pałeczkami doprowadza do śmierci komórki gospodarza przez apoptozę. SipB specyficznie wiąże się z prokaspazą-1, co doprowadza do jej aktywacji [10]. Aktywna kaspaza-1 wykazuje zaś działanie proapoptotyczne. Stwierdzono, iż makrofagi pozbawione kaspazy-1 są zdecydowanie bardziej odporne na wywoływanie zaprogramowanej śmierci przez pałeczki *Salmonella* niż makrofagi zdolne do wytwarzania tej proteazy [9]. Dotychczas nie poznano dokładnej roli kaspazy-1 w procesie aktywacji śmierci komórki, gdyż nie udało się powiązać jej oddziaływania ani na wewnątrzpochodną, ani zewnątrzpochodną drogę aktywacji apoptozy.

Chen i wsp. [5] w swoich badaniach opisywali zmiany morfologiczne w makrofażu, powstające w trakcie zakażenia badanymi szczepami *Salmonella* Typhimurium. Stosując technikę barwienia DAPI (4'-6-dwuamidyno-2-fenylindol), w mikroskopie fluorescencyjnym nie stwierdzali zmian charakterystycznych dla apoptozy w przeciągu 1 do 2 godz. po zakażeniu hodowli bakteriami. Również hybrydyzacja *in situ* z zastosowaniem sondy znakowanej dUTP-digoksigeniną, w pierwszych 2 godz. po zakażeniu, nie wykazała obecności krótkich odcinków DNA, charakterystycznych dla apoptozy. Odcinki takie wykrywano dopiero po 4 godz. po zakażeniu i później, a w mikroskopie fluorescencyjnym obserwowano kondensację i fragmentację chromatyny. Dla porównania, szczepy z mutacją w genie *invA*, nie wykazywały opisanych zmian

nawet po wielogodzinnej inkubacji. Natomiast w hodowlach makrofagów zakażonych dzikimi szczepami *Salmonella* Typhimurium już po 3 do 6 godz. po inokulacji, w obserwacji w mikroskopie elektronowym stwierdzano wiele innych objawów charakterystycznych dla przebiegu apoptozy, jak: uwypuklenie się błony komórkowej, kondensację chromatyny oraz tworzenie ciałek apoptotycznych.

W przebiegu zakażenia makrofagów pałeczkami *Salmonella* Typhimurium obserwowano również liczne komórki, których śmierć należało zaklasyfikować jako martwicę, nie zaś zaprogramowaną śmierć komórki. Stwierdzano wtedy brak kondensacji chromatyny, brak fragmentacji DNA chromosomalnego, brak aktywacji kaspazy-1 oraz nieobecność innych charakterystycznych objawów zaprogramowanej śmierci komórki. Liczba makrofagów w hodowli ulegających nekrozie drastycznie wzrastała, jeżeli do doświadczenia użyto więcej niż 100 komórek bakteryjnych na jednego makrofaga. Jeśli jednak do doświadczenia użyto szczepów z unieczynnionymi genami kodującymi TTSS-1, nie dochodziło do gwałtownego zamierania hodowli makrofagów, bez względu na liczbę komórek bakteryjnych użytych do zakażenia.

Zróznicowanie przejawów cytotoksycznego oddziaływania pałeczek *Salmonella* na makrofagi może sugerować, że proces ten przebiega na więcej niż jednej drodze. Tak więc można wyróżnić szybką śmierć komórki, która ma miejsce do około 45 min. po inokulacji i charakteryzuje się objawami zbliżonymi do martwicy. Zależna jest ona od kaspazy-1 i nazywana „zaprogramowaną martwicą”. Wiadomo także, że do szybkiej, zaprogramowanej śmierci komórki dochodzić może również na drodze niezależnej od kaspazy-1. Zjawisko to zostało potwierdzone w doświadczeniach na makrofagach pozbawionych kaspazy-1 przez Jesenberga i wsp. [12]. Autorzy udowodnili, że w takim przypadku za proces aktywacji apoptozy odpowiedzialna jest kaspaza-2 doprowadzająca do aktywacji innych kaspaz, tj.: -3, -6 i -8. Ponadto, jak wynikało z przeprowadzonych doświadczeń, zakażenie pałeczkami *Salmonella* Typhimurium makrofagów mysich pozbawionych kaspazy-1, doprowadziło do uwolnienia cytochromu c z mitochondriów. Czynnikiem odpowiedzialnym za wywoływanie tego procesu jest tu również wspomniane wcześniej białko SipB. W doświadczeniach, w których uzyskano ekspresję białka SipB w makrofagach, stwierdzono że doprowadza ono do powstania wielopęcherzykowych struktur

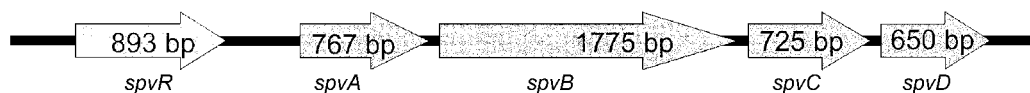
przypominających autofagosomy, w których zlokalizowane są markery mitochondrialne oraz szorstkiej siateczki śródplazmatycznej, co świadczy o ich pochodzeniu z tych struktur. Białko SipB doprowadzać może do fuzji mitochondriów z wytworzeniem struktury Nebenkern, czyli wielowarstwowych układów powstałych przez wzajemne „owijanie” się wokół siebie mitochondriów [8]. Opisane struktury są charakterystyczne dla procesu autofagii, czyli apoptozy typu drugiego. Charakterystyczną cechą tego typu zaprogramowanej śmierci makrofaga zakażonego pałeczkami *Salmonella* jest brak jej zależności od kaspaz [9].

Wiadomo, że pałeczki *Salmonella* pozbawione wyspy patogenności SPI-1, nadal są zdolne do wywoływania śmierci makrofaga, aczkolwiek proces ten wymaga dłuższej, bo ponad 24-godzinnej inkubacji [7, 16, 19]. Geny, których produkty są odpowiedzialne za opóźniony efekt cytotatyczny, zgrupowane są w obrębie drugiej wyspy patogenności (SPI-2). van der Velden i wsp. [21] wykazali, iż szczepy *Salmonella* Typhimurium z istotnymi mutacjami zarówno w SPI-1, jak i SPI-2 nie wywołują apoptozy w zakażonych makrofagach. Nie znane są poszczególne mechanizmy interakcji białek wydzielanych przez TTSS i kodowanych przez geny SPI-2 oraz czynników komórki gospodarza, które doprowadzają do zaprogramowanej śmierci komórki. Znaczącą rolę również przypisuje się aktywacji kaspazy-1, chociaż wiadomo również, że do zapoczątkowania zaprogramowanej śmierci makrofaga dochodzi na drodze niezależnej od kaspazy-1 [12, 19].

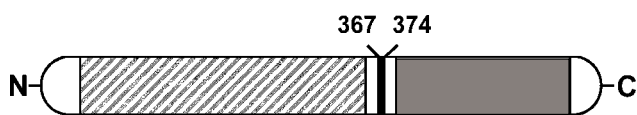
3. Rola białka SpvB w aktywacji procesu apoptozy

Wyniki najnowszych badań Kurita i wsp. [11] świadczą o tym, że w wywoływaniu apoptozy komórek eukariotycznych istotną rolę odgrywa również produkt plazmidowego genu *spvB*. Gen ten występuje w obrębie plazmidowego zgrupowania genów *spv*. Zgrupowanie genów *spv* (*Salmonella* plasmid virulence) zlokalizowane jest w wysoce konserwatywnym odcinku dużego plazmidu chorobotwórczości, o masie cząsteczkowej 7,8 kb. Region ten złożony jest z pięciu ramek odczytu – genów *spvR*, *spvA*, *spvB*, *spvC* oraz *spvD* (Rys. 2.).

Otto i wsp. [20] wykazali, że gen *spvB* koduje wielodomenowe białko (Rys. 3), w którego C-terminalnym fragmencie znajduje się obszar o aktywności mono(ADP-rybozyl) transferazy (mADPRTs). Mono-ADP rybozylacja jest potranslacyjną modyfikacją



Ryc. 2. Schemat plazmidowego zgrupowania genów *spv*.

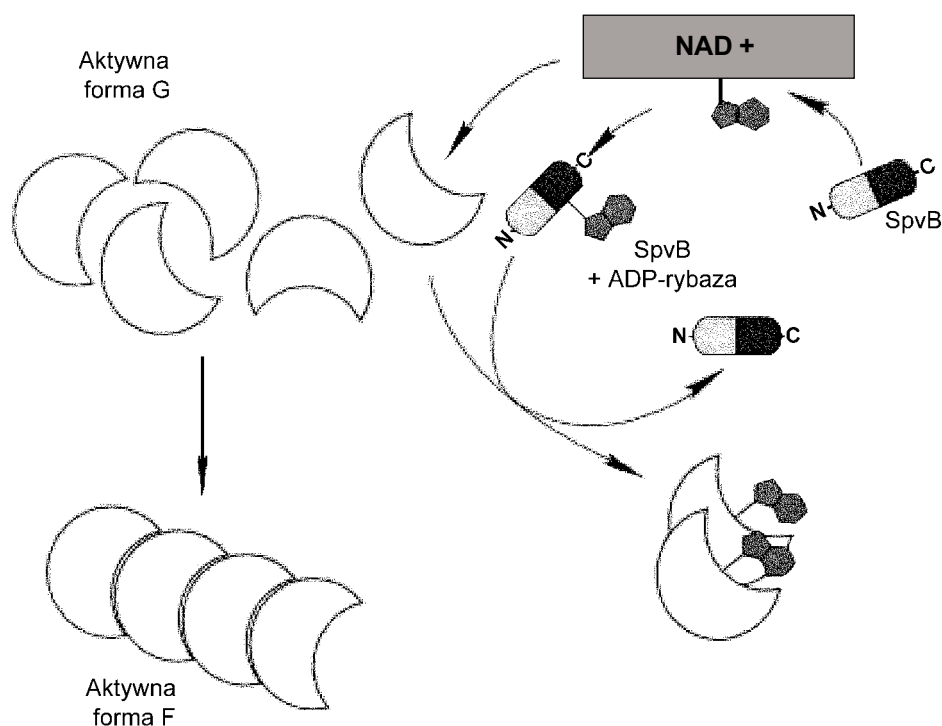


Ryc. 3. Domeny białka SpvB. Czarnym kolorem zaznaczono fragment poliprolinowy rozdzielający domenę C-terminalną i N-terminalną

białka katalizowaną przez enzym. Enzymy mono(ADP-rybozyl)-transferazy katalizują przeniesienie ADP-rybozy z NAD^+ do określonego aminokwasu białka docelowego z uwolnieniem amidu kwasu nikotynowego. Według Aktories, mono-ADP-rybozylacja jest także podstawą oddziaływania toksyny błoniczej, która w ten sposób blokuje syntezę białka w komórkach eukariotycznych. Podobnie działa egzotoksyna A *Pseudomonas aeruginosa* oraz toksyny *Bordetella pertussis*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli*, egzoenzym S *Bacillus cereus* i *Vibrio cholerae* [1]. Enzymy te po dostaniu się do komórki gospodarza powodują ADP rybozylację białek G, innych małych białek wiążących GTP (białka Ras, Rho) lub aktyny powodując zmianę ich funkcji [1]. Domena N-terminalna białka SpvB wykazuje natomiast homologię do toksyny TcaC wydzielanej przez *Photobacterium luminescens*, bakterii chorobotwórczej dla owadów oraz owadobójczej toksyny SepB, wydzielanej przez *Serratia entomophila*, której geny zlokalizowane są na plazmidzie [3, 20].

Najbardziej prawdopodobna rola białka SpvB jest związana z regulacją procesów polimeryzacji aktyny w komórkach gospodarza, już po utworzeniu się dojrzalego SCV. Wykazano bowiem, że największą aktywność białko to wykazuje w stosunku do aktyny. Rybozylacja G-aktyny doprowadza do zahamowania jej polimeryzacji do formy F, odwrotnie do procesów aktywowanych przez białka kodowane przez geny zlokalizowane w SPI-1 i SPI-2, a wydzielanych przez TTSS (Rys. 4). Antagonizm działania efektorów TTSS oraz SpvB potwierdza także odmienny sposób regulacji ekspresji genu *spvB*, gdzie główną rolę przypisuje się RpoS, co sprawia, iż SpvB jest wydzielany w późnej fazie obecności *Salmonella* we wnętrzu makrofaga [14].

Wiadomo także, że białko SpvB wykazuje właściwości cytotoksyczne, doprowadzając do zaprogramowanej śmierci zainfekowanych komórek. Nie znana jest jednak droga przekazywania, na której białko SpvB doprowadza do apoptozy. Wiadomo, iż zastosowanie inhibitorów kaspazy-1, a także -2, -3, -5, -6, -8 nie wpłynęło negatywnie na proces apoptozy zależnej od SpvB. Sugeruje to, iż ścieżka aktywacji zaprogramowanej śmierci komórki, zależnej od SpvB, jest odmienna od aktywacji przez białko SipB. Pewną rolę można tu przypisywać wpływowi SpvB na cytoskielet komórki, co doprowadza do jej zmian morfologicznych, czego konsekwencją może być odklejenie się komórki od podłoża. Utrata kontaktu z podłożem jest zaś ważnym czynnikiem proapoptotycznym [13].



Ryc. 4. Schemat obrazujący rybozylację formy globularnej aktyny (aktyna G) przez białko SpvB

4. Podsumowanie

Pałeczki *Salmonella* uzyskały na drodze ewolucji zdolność przeżywania we wnętrzu makrofagów, które wykorzystywane są, jako swego rodzaju „taksówki” roznoszące zarazki po całym organizmie. Pozwala to przede wszystkim uniknąć wpływu układu immunologicznego, a także podawanych leków przeciwbakteryjnych. Takie rozwiązanie, „z punktu widzenia bakterii”, ma jedną wadę – tak długo, jak bakterie pozostają we wnętrzu makrofaga, niemożliwe jest ich rozprzestrzenianie się na inne komórki gospodarza. Aby wyjść z tego zamknięcia pałeczki *Salmonella* wykształciły mechanizmy aktywacji śmierci komórki, bez wzbudzenia odpowiedzi immunologicznej – czyli apoptozy lub innych odmian zaprogramowanej śmierci komórki. Możliwości aktywacji tego procesu przez pałeczki *Salmonella* są znane od lat, lecz nadal nie do końca poznano mechanizmy regulujące wspomniane procesy.

Piśmiennictwo

- Aktories K.: ADP-Ribosylating Toxins. Springer Verlag. Berlin 1991.
- Alnemri E.S., Livingston D.J., Nicholson D.W., Salvesen G., Thornberry N.A., Wong W.W., Yuan J.: Human ICE/CED nomenclature. *Cell*, **87**, 171 (1996)
- Bowen D., Rocheleau T.A., Blackburn M., Andreev O., Golubeva E., Bhartia R., French-Constant R.H.: Insecticidal toxins from the bacterium *Photobacterium luminescens*. *Science*, **280**, 2129–2132 (1998)
- Cano D.A., Martinez-Moya M., Pucciarelli M.G., Groisman E.A., Caseadesus J., Garcia-Del Portillo F.: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium response involved in attenuation of pathogen intracellular proliferation. *Infect. Immun.* **69**, 6463–6474 (2001)
- Chen L.M., Hobbie S., Galán J.E.: Requirement of CDC42 for *Salmonella*-induced cytoskeletal and nuclear responses. *Science*, **274**, 2115–2118 (1996)
- Garcia-Del Portillo F.: *Salmonella* intracellular proliferation: where, when and how? *Microb. Infect.* **3**, 1305–1311 (2001)
- Guilloteau L.A., Wallis T.S., Gautier A.V., MacIntyre S., Platt D.J., Lax A.J.: The *Salmonella* virulence plasmid enhances *Salmonella*-induced lysis of macrophages and influences the inflammatory responses. *Infect Immun.* **64**, 3385–3393 (1996)
- Hales K., Fuller M.: Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell*, **90**, 121–129 (1997)
- Hernandez L.D., Pypaert M., Flavell R.A., Galan J.E.: A *Salmonellae* protein causes macrophage cell death by inducing autophagy. *J. Cell. Biol.* **163**, 1123–1131 (2003)
- Hersh D., Monack D.M., Smith M.R., Ghori N., Falkow S., Zychlinski A.: The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 2396–2401 (1999)
- Hilibi H., Moss J.E., Hersh D., Chen Y., Arondel J., Banerjee S., Flavel R. A., Yuan J., Sansonetti P. J., Zychlinski A.: *Shigella*-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB. *J. Biol. Chem.* **273**, 32895–32900 (1998)
- Jesenberger V., Procyk K.J., Yuan J., Reipert S., Baccarini, M.: *Salmonella*-induced caspase-2 activation in macrophages: a novel mechanism in pathogen-mediated apoptosis. *J. Exp. Med.* **192**, 1035–1046 (2000)
- Kurita A., Gotoh H., Eguchia M., Okadab N., Matsuura S., Matsui H., Danbarab H., Kikuchia Y.: Intracellular expression of the *Salmonella* plasmid virulence protein, SpvB, causes apoptotic cell death in eukaryotic cells. *Microb. Pathogen.* **35**, 43–48 (2003)
- Lesnick M.L., Reiner N.E., Fierer J., Guiney D.G.: The *Salmonella spvB* gene encodes enzyme, that ADP-ribosylates actin and destabilizes the cytoskeleton of eucaryotic cells. *Mol. Microbiol.* **39**, 1464–1470 (2001)
- Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S. M., Ahmad M., Alnemri E.S., Wang X.: Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell*, **91**, 479–489 (1997)
- Libby S.J., Goebel W., Ludwig A., Buchmeier N., Bowe F., Fang F.C., Guiney D.G., Songer J.G., Heffron F.: A cytotoxin encoded by *Salmonella* is required for survival within macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 489–493 (1994)
- Matsui H., Bacot C.M., Garlington W.A., Doyl T.J., Roberts S., Gulig P.A.: Virulence plasmid-born spvB and spvC genes can replace the 96-kilobase plasmid in Conferring Virulence to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in subcutaneously inoculated mice. *J. Bacteriol.* **183**, 4652–4658 (2001)
- Monack D.M., Raupach B., Hromockyj A.E., Falkow S.: *Salmonella* Typhimurium invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 9833–9838 (1996)
- Monack D.M., Detweiler C.S. and Falkow S.: *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent macrophage death is mediated in part by the host cysteine protease caspase-1. *Cell. Microbiol.* **3**, 825–837 (2001)
- Otto H., Tezcan-Merdol D., Girish R., Haag F., Koch-Nolte F.: The spv gene-product of the *Salmonella enterica* virulence plasmid is a mono(ADP-ribosyl)transferase. *Molec. Microbiol.* **37**, 1106–1115 (2000)
- Petak L., Houghton J.A.: Shared pathways: death receptors and cytotoxic drug in cancer therapy. *Pathol. Oncol. Res.* **7**, 95–106 (2001)
- van der Velden A.W., Lindgren S.W., Worley M.J., Heffron F.: *Salmonella* pathogenicity island 1-independent induction of apoptosis in infected macrophages by *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Infect. Immun.* **68**, 5702–5709 (2000)
- Watson P., Gautier A., Paulin S., Bland A., Jones P., Wallis T.: *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Dublin can lyse macrophages by a mechanism distinct from apoptosis. *Infect. Immun.* **68**, 3744–3747 (2000)
- Wójcik C.: Apoptoza (w) Seminaria z cytofizjologii dla studentów medycyny, weterynarii i biologii. red. Kawiak J., Zabla M. Urban & Partner, Wrocław, 2002, s. 88
- Zamzami N., Susin S. A., Marchetti P., Hirsch T., Gomez-Monterrey I., Castedo M., Kroelner G.: Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* **183**, 1533–1544 (1996)

WYKORZYSTANIE PROCESÓW BIODEGRADACJI STYRENU DO OCZYSZCZANIA GAZÓW ODLOTOWYCH

Krystyna Przybulewska¹, Andrzej Wieczorek²

¹Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiska, Akademia Rolnicza,
ul. Słowackiego 17, 71-434 Szczecin, e-mail: kprzybulewska@agro.ar.szczecin.pl
²Instytut Chemii i Podstaw Ochrony Środowiska, Politechnika Szczecińska

Wpłynęło w lipcu 2005

1. Wstęp. 2. Styren, źródła i drogi rozprzestrzeniania się oraz wpływ na organizmy żywe. 3. Przemiany metaboliczne, produkty pośrednie, inhibitory i aktywatory degradacji styrenu. 4. Metody oczyszczania gazów odlotowych. 5. Czynniki wpływające na degradację styrenu. 6. Podsumowanie

Utilization of biodegradation of styrene for a waste gases treatment

Abstract: The state of studies as well as methods and devices applied during removal of volatile substances, particularly styrene, was presented in the paper. Styrene is a compound from a group of the most strenuous substances present in an environment. It negatively affects the people and animal's health. Studies being conducted point out that it is very important to work out efficient method making possible to remove such type of pollutants. Biological methods seem to be the most useful due to their effectiveness, capacity and low cost as compared to other ones. This fact points to the necessity of searching and isolation of microorganisms able to styrene degradation as well as possibility to apply achieved vaccines in industrial systems for waste gas purification polluted with styrene.

1. Introduction. 2. Styrene-sources and ways of spreading, the influence on living organisms. 3. Metabolic conversions, mediate products, inhibitors and activators of styrene degradation. 4. Methods for waste gas purification. 5. Factors affecting the styrene degradation; 6. Summary

Słowo kluczowe: oczyszczanie gazów odlotowych, styren, biodegradacja

Key words: waste gas purification, styrene, biodegradation

1. Wstęp

Wraz z rozwojem cywilizacji, następuje wzrost emisji substancji szkodliwych do środowiska naturalnego. Mogą one stanowić zagrożenie dla zdrowia i życia człowieka oraz wszystkich organizmów żywych. W ostatnich latach szczególną uwagę zaczęto zwracać na wzrastającą ilość węglowodorów emitowanych do atmosfery. Głównym antropogennym źródłem tego typu zanieczyszczeń są: transport, przemysł petrochemiczny i koksowniczy, przemysł chemiczny, głównie produkcja i przetwórstwo tworzyw sztucznych, produkcja farb, lakierów itp. Potężnym źródłem węglowodorów lekkich są też składowiska odpadów i hodowla bydła. Wprowadzane do środowiska substancje, ulegają w powietrzu skomplikowanym przemianom, czego efektem jest znaczący wzrost ich toksyczności [1, 70].

Do usuwania zanieczyszczeń organicznych z przemysłowych gazów odlotowych wykorzystuje się wiele metod fizykochemicznych. Są to metody tradycyjne, których stosowanie w wielu przypadkach jest ograniczone. Dotyczy to w szczególności sytuacji kiedy gazą odlotową są rozcieńczone i zapyłone, a jednocześnie ich strumień jest duży i niestabilny w czasie. Głównymi

problemami w stosowaniu tych metod są wysokie koszty eksploatacyjne oraz generowanie zanieczyszczeń wtórnych, w wyniku stosowania agresywnych reagentów, czy też niepełnych lub zachodzących w niepożądanych kierunkach przemian [2]. Poszukiwanie alternatywnych metod usuwania zanieczyszczeń gazowych, zaowocowało licznymi rozwiązaniami opartymi na metodach biologicznych i biotechnologicznych, które w wielu przypadkach są skuteczne, wydajne, i mniej kosztowne niż metody fizykochemiczne [3, 6, 7, 19, 52, 55–57, 60].

Jednym z bardziej uciążliwych dla środowiska związków jest styren, którego produkcja w roku 1993 w USA przekraczała 5,3 miliona ton [45]. Tak szerokie i ilościowo duże wykorzystanie tego związku, znacząco wpływa na wielkość jego emisji do atmosfery. Przykładowo w 1995 roku w USA jedynie w związku z przetwórstwem tworzyw wzmocnionych włóknem szklanym (z wyłączeniem przemysłu budowy jednostek pływających) wyemitowane zostało do środowiska ok. 15,4 tys. ton styrenu [62]. Stwarza to konieczność poszukiwania metod umożliwiających usuwanie styrenu z gazów odlotowych powstających w związku z jego stosowaniem w różnych gałęziach przemysłu.

Jednym najważniejszych kierunków prowadzonych w związku z tą potrzebą badań jest zaadaptowanie na skalę przemysłową procesów degradacji zanieczyszczeń, zachodzących w środowisku naturalnym z udziałem mikroorganizmów [4, 68].

2. Styren, źródła i drogi rozprzestrzeniania się oraz wpływ na organizmy żywe

Styren (winylobenzen) jest lepka, bezbarwną lub o lekko żółtawym odcieniu cieczą, o przenikliwym zapachu (Tab. 1). Jest słabo rozpuszczalny w wodzie, rozpuszczalny w etanolu, eterze etylenowym i acetonie, dobrze rozpuszczalny w benzenie i eterze nadtowym. W atmosferze styren reaguje z rodnikami hydroksylowymi i ozonem. Czas połowicznego przeobrażenia wynosi odpowiednio 3,5 i 9 godzin. Reakcje te zachodzą przy współudziale NO_x i światła słonecznego. Styren bierze również udział w tworzeniu się smogu. Biologiczny rozkład styrenu zachodzi głównie w glebie dzięki mikroorganizmom glebowym. Styren szybko paruje z wód powierzchniowych. Okres jego półtrwania w rzekach wynosi 4 godziny, a w stawach 13 dni [39, 44, 45, 62].

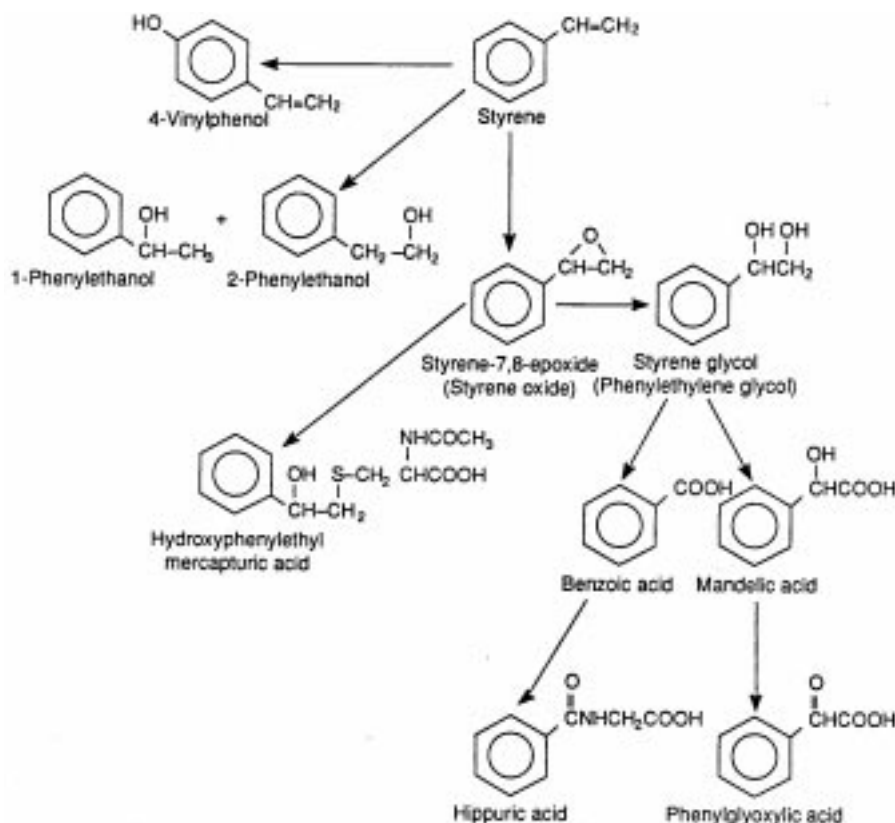
Tabela I
Charakterystyka i podstawowe właściwości styrenu

Wzór cząsteczkowy:	C_8H_8
Struktura chemiczna:	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}=\text{CH}_2$
Masa cząsteczkowa:	$104,14 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$
Temperatura wrzenia:	$145,2^\circ\text{C}$
Temperatura krzepnięcia:	$-30,63^\circ\text{C}$
Gęstość:	$0,9060 \text{ kg} \times \text{dm}^{-3}$
Temperatura zapłonu:	31°C
Rozpuszczalność w wodzie:	$310 \text{ mg} \times \text{dm}^{-3}$ w 25°C
Stała Henry'ego:	$2,75 \times 10^{-3} \text{ atm} \times \text{m}^3 \times \text{mol}^{-1}$
Współczynnik biokoncentracji w rybach:	13,5 (złota rybka)
Współczynniki przeliczeniowe	1 ppm w powietrzu = $4,2 \text{ mg} \times \text{m}^{-3}$, $1 \text{ mg} \times \text{m}^{-3} = 0,24 \text{ ppm}$

Styren jest jednym z ważniejszych monomerów na świecie. Produkowany jest na skalę przemysłową dwiema metodami. Pierwsza z nich, najpopularniejsza polega na odwodornieniu etylobenzenu, druga opracowana przez firmę Halcon polega na równoległym uzyskiwaniu styrenu i tlenku propylenu [40–43]. Polimery i kopolimery styrenu mają coraz szersze zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu. Z jego udziałem wytwarzane są tak popularne tworzywa jak: polistyren, nienasycone żywice poliestrowe, kauczuk styrenowo-butadienowy (SBR), kopolimer akrylonitryl-butadien-styren (ABS), kauczuki styrenowo-akrylonitrylo-

we (SAN). Wykorzystywany może też być w przemyśle spożywczym jako dodatek zapachowy i smakowy (USA, zatwierdzony przez FDA). W warunkach naturalnych styren jest produktem rozkładu kwasu cy-namonowego.

Powszechność zastosowania styrenu w różnych gałęziach przemysłu, sprawia że każdy organizm żywy narażony jest na jego oddziaływanie. Styren może być wprowadzany do organizmu drogą pokarmową wraz z żywnością lub wodą, przez skórę oraz drogi oddechowe. U osób wdychających powietrze zanieczyszczone styrenem zaobserwowano absorpcję 66% styrenu zawartego w tym powietrzu. Ilość styrenu wchłanianego przez skórę jest znacznie niższa. Po wchłonięciu do organizmu, jest on transportowany do tkanki tłuszczowej. U szczurów poddanych działaniu styrenu przy stężeniu 52–2000 ppm przez 5 godzin, zaobserwowano dziesięciokrotnie wyższe stężenie tego związku w tkance tłuszczowej niż w innych tkankach. Przepuszczalnie styren jest metabolizowany do tlenku styrenu, a następnie do glikolu styrenowego (rys. 1). Ten z kolei metabolizowany jest do kwasu migdałowego lub benzoesowego i dalej do kwasu hipurowego. Kwas migdałowy metabolizowany jest też do kwasu fenyloglioksykowego. Na jednym ze szlaków metabolizmu dochodzi do koniugacji tlenku styrenu i glutationu z wytworzeniem winylofenolu. Większość styrenu znajdującego się w organizmie, jest wydalana przez układ moczowy. U człowieka głównymi metabolitami w moczu jest kwas migdałowy i kwas fenyloglioksykowy. Z moczem szczurów wydalany jest dodatkowo kwas hipurowy i glukuronid. U ochotników wystawionych na działanie styrenu w dawce 50 ppm zaobserwowano, że najwyższe stężenie kwasu migdałowego w moczu ma miejsce po 4 godzinach ekspozycji, natomiast kwasu fenyloglioksykowego między 4 a 6 godziną [44–48, 72–74]. Prawdopodobnie nie ulega on kumulacji w organizmach. Jest to wniosek oparty na podstawie czynnika biokoncentracji 13,5 (złota rybka), rozpuszczalności styrenu w wodzie, oraz jego składu chemicznego [44]. OSHA (Administracja Bezpieczeństwa Zawodowego i Zdrowia, USA) zaleciła dopuszczalne stężenie styrenu równe 100 ppm w czasie 8 godzin. Ustalenia podobnych innych organów określają tę wartość na 50 ppm. W Polsce najwyższe dopuszczalne stężenie na stanowiskach pracy (NDS) wynosi $50 \text{ mg} \times \text{m}^{-3}$. EPA (Agencja Ochrony Środowiska USA) w oparciu o badania na zwierzętach doświadczalnych (zmiany parametrów krwinek czerwonych, zmiany zachodzące w wątrobie), określiła dopuszczalną dawkę styrenu wprowadzaną drogą pokarmową, równą $0,2 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ w ciągu jednego dnia [45]. WHO (Światowa Organizacja Zdrowia) wydała dwie wytyczne dotyczące dopuszczalnych koncentracji styrenu $800 \mu\text{g} \times \text{m}^{-3}$ w czasie 24 h i $70 \mu\text{g} \times \text{m}^{-3}$ w czasie 30 minut. Pierw-



Rys. 1. Ścieżki metaboliczne styrenu u człowieka i zwierząt

sza dotyczy wpływu na zdrowie, druga nieprzyjemnego zapachu [28].

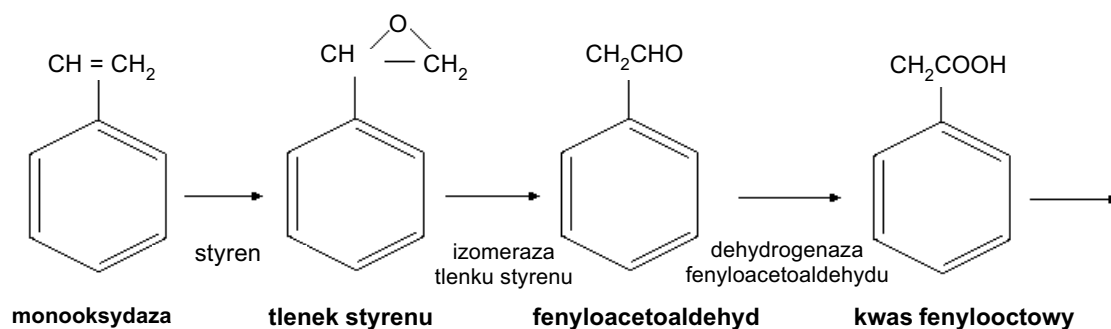
Międzynarodowa Agencja do Badań nad Nowotworami wydała orzeczenie, w którym stwierdza, że styren może być rakotwórczy dla człowieka. Dotychczasowe badania przeprowadzone w tym kierunku nie dały jednoznacznej odpowiedzi na pytanie czy styren jest czynnikiem karcenogennym. Testy przeprowadzone na myszach i szczurach, wykazały że styren nie jest rakotwórczy dla szczurów. U myszy poddanych działaniu styrenu o stężeniu 20, 40, 80, 160 ppm zaobserwowano wzrost zachorowań na guzy płuc. Guzy te okazywały się złośliwe tylko u zwierząt wystawionych na najwyższe stężenia, i częściej zdarzały się u samic.

Z opublikowanych w 1994 roku wyników badań pracowników wystawionych na długotrwałe, wysokie stężenie styrenu wynika, że nie zaobserwowano ponadprzeciętnego wzrostu zachorowań na raka [49]. Wyniki uzyskane w innych badaniach donoszą o wzroście zachorowań na nowotwory złośliwe układu limfatycznego i krwionośnego w grupie pracowników przemysłu produkującego i przetwarzającego styren [4, 45].

W raporcie EPA z 1994 roku zamieszczono wyniki badań nad teratogennym wpływem styrenu na ssaki. Zaobserwowano wzrost częstości anomalii chromosomowych u samic myszy poddanych działaniu styrenu o stężeniu 300 ppm przez 6 godzin dziennie przez 2–11 tygodni [44]. Z badań przeprowadzonych na

zarodkach kurzych wynika, że styren i tlenek styrenu wpływają embriotoksycznie. Około 20% zarodków narażonych na działanie tych związków uległo deformacji. Wzrost resorpcji płodów zaobserwowano u chomika chińskiego poddanego działaniu styrenu o stężeniu 1000 ppm przez 6–18 dni [39]. U samic królików wystawionych na działanie tlenku styrenu o stężeniu 15 i 50 ppm zaobserwowano wzrost toksyczności w stosunku do zarodków. Natomiast, u samic szczurów stężenie 100 ppm nie wpływała na spadek potencjału rozrodczego czy też zmiany w budowie zarodka [50].

Brak jest przekonujących dowodów na embriotoksyczny wpływ styrenu u człowieka. Waga noworodków matek, wystawionych na wysokie stężenia styrenu była o 4% mniejsza niż przeciętna, różnica ta nie jest jednak na tyle znacząca, by móc wyciągnąć odpowiednie wnioski. Wyniki kilku badań sugerują, że ekspozycja na działanie styrenu może prowadzić do spontanicznych poronień, ale najczęściej jest to hipoteza odrzucona, ze względu na brak przekonujących dowodów [44]. U osób narażonych na wysokie stężenia styrenu obserwuje się podrażnienie górnych dróg oddechowych i gardła oraz zaburzenia widzenia [47]. Nie udało się jednoznacznie stwierdzić czy styren jest odpowiedzialny za uszkodzenie nerek i wątroby u człowieka [51]. U długoletnich pracowników zakładów produkujących polimery styrenu, zaobserwowano niższą zawartość krwinek czerwonych i zmieniony profil enzymatyczny

Rys. 2. Metabolizm styrenu przy udziale *Pseudomonas putida* CA-3

wątroby. Nie potwierdzono jednak, że skutki te wywołuje styren, gdyż osoby te poddane były równoczesnemu działaniu innych związków chemicznych [45]. Liczne badania potwierdzają natomiast, że styren wywołuje skutki neurologiczne. Przy stężeniu styrenu 50–100 ppm dochodziło do zmniejszenia szybkości przewodności nerwowej, oraz obniżenia czasu reakcji. U osób wystawionych na działanie styrenu o stężeniu >50 ppm obserwowano takie objawy jak osłabienie, bóle głowy, zmęczenie, nerwowość, a przy stężeniu >200 ppm: senność nudności i zaburzenia równowagi [4].

3. Przemiany metaboliczne, produkty pośrednie, inhibitory i aktywatory degradacji styrenu

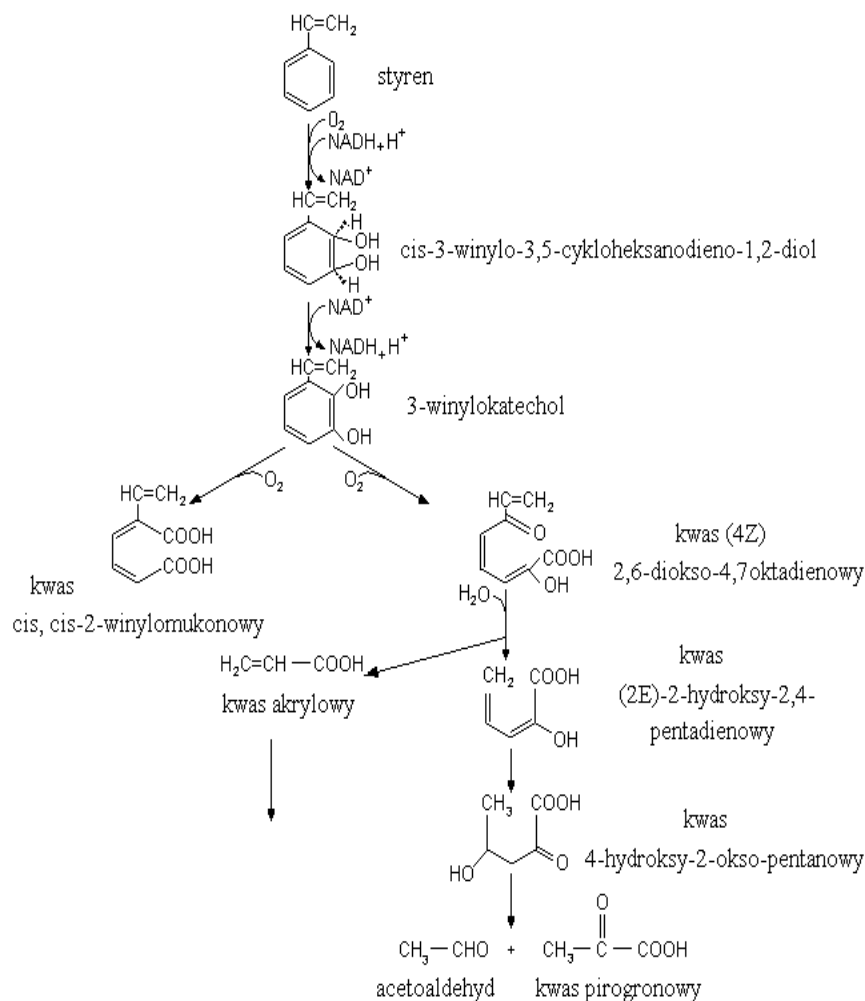
Wobec możliwości wykorzystania bakterii rozkładających styren na skalę przemysłową, istotna jest znajomość metabolizmu i produktów pośrednich powstających w procesie biodegradacji. Jak wykazano w wielu badaniach, pierwszym etapem rozkładu styrenu jest jego utlenianie do tlenku styrenu. Nie stanowi to problemu, jeżeli zachodzą kolejne etapy prowadzące do wytworzenia związków nietoksycznych. Jeśli jednak tlenek styrenu jest ostatnim produktem degradacji, to jest to wysoce niekorzystne, gdyż związek ten jest bardziej toksyczny niż sam substrat [25, 67].

W 1978 roku Sielicki i wsp. [31] opisali degradację styrenu z wykorzystaniem mieszaniny mikroorganizmów wyizolowanych z gleby. Opisali oni dwa mechanizmy przekształceń. Pierwszy polega na utlenianiu styrenu do fenyloetanolu, a następnie do kwasu fenylooctowego. Zasugerowali, że istnieje możliwość spontanicznej polimeryzacji styrenu do niskocząsteczkowych oligomerów, przy udziale mikroorganizmów. Badania prowadzone później wykazały istnienie bogatszych w związki pośrednie dróg metabolizmu styrenu. Generalnie jednak większość zbadanych mikroorganizmów prowadzi rozkład styrenu na drodze przemian poprzez tlenek styrenu do 2-fenyloetanolu lub fenyloacetaldehydu, a następnie do kwasu fenylooctowego [26]. O'Connor i wsp. [36] zajmowali się rozkładem

styrenu zachodzącym przy udziale *Pseudomonas putida* CA-3. Początkowym etapem metabolizmu styrenu przez ten szczep jest przemiana tlenowa polegająca na epoksydacji styrenu do tlenku styrenu przy udziale monooksygenazy, który następnie ulega izomeryzacji do fenyloacetaldehydu dzięki aktywności izomeryzy tlenku styrenu. Fenyloacetaldehyd jest utleniany do kwasu fenylooctowego przez dehydrogenazę fenyloacetaldehydu (rys. 2).

Z badań nad metabolizmem styrenu przez różne mikroorganizmy wynika, że ilość i rodzaj produktów pośrednich jest zależny od stosowanego konkretnego szczepu. Szczep *Pseudomonas* badany przez Shirai i Hisatsuka utlenia styren poprzez monooksygenazę do tlenku styrenu, który następnie jest redukowany do 2-fenyloetanolu [25]. Hartmans i wsp. [24] wykazali, że szczep *Xantobacter* 124X zdolny do degradacji styrenu, może rozkładać styren i 2-fenyloetanol poprzez fenyloacetaldehyd i kwas fenylooctowy. W hodowli innego szczepu *Pseudomonas putida* oznaczonego R1 zaobserwowano obecność fenyloetanolu i kwasu migdałowego [26]. Produktami pośrednimi degradacji styrenu przez grzyby *Phanerochaete chrysosporium* opisanymi przez Braun-Lulleman i wsp. są 1,2-etanodiol, 2-fenyloetanol i kwas benzoesowy [17]. Warhurst i wsp. [26] relacjonowali całkowicie odmienny od opisanych wcześniej, metabolizm styrenu zachodzący w obecności szczepu *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259. Schemat rozkładu, którego pierwszym etapem jest przekształcenie styrenu do pochodnej cis-heksadienoglikolu, pokazany został na Rysunku 3.

Styren stanowi dla mikroorganizmów źródło węgla i energii. W czasie pełnego rozkładu styrenu powstaje CO_2 i H_2O , a część węgla jest wykorzystywana przez mikroorganizmy na produkcję biomasy. Ilość użytego węgla jest zależna od konkretnego drobnoustroju. Szczepy badane przez Arnold'a i wsp. [28] wykazywały znaczne różnice, nie tylko pod względem zdolności do degradacji styrenu, ale również pod względem stopnia przekształcania go na biomasę i CO_2 . Trzy wyizolowane szczepy wykorzystywały 68% styrenu do

Rys. 3. Metabolizm styrenu przy udziale *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259

produkcji biomasy, podczas gdy szczep zidentyfikowany jako *Tsukamurella* sp. E-93476 wykorzystywał w tym celu tylko 1% styrenu. W produkcji CO_2 wysoką efektywność wykazywał też szczep *Pseudomonas* E-93486, który na ten cel wykorzystywał 66% styrenu. Wykrycie pośrednich produktów biodegradacji sprawiało trudności. Prawdopodobnie styren szybko ulegał rozkładowi do związków mało złożonych, a następnie przekształcany w biomasę, CO_2 i H_2O . Jedynie w hodowli szczepu *P. chlororaphis* i mieszaniu wszystkich izolatów obecny był fenyletanol [28]. Efektywną degradację lotnych związków organicznych prowadzoną przez grzyby potwierdzili również inni autorzy [65, 71].

Mikroorganizmy znajdujące się w jakimkolwiek środowisku wybierają takie źródło składników odżywczych, które jest najłatwiej przyswajalne. Obecność w środowisku innych źródeł węgla obok styrenu może hamować jego degradację. Zjawiskiem tym zainteresował się O' Connor i wsp. [36]. Jako potencjalne źródło węgla mogące wpływać hamująco na degradację styrenu przez szczep *Pseudomonas putida* CA 3 badane były: glukoza, aceton, cytrynian i glutaminian.

Metabolizowanie styrenu było niemożliwe tak długo jak w podłożu znajdowały się glutaminian lub cytrynian, natomiast glukoza nie wpływała na rozkład styrenu. Zaobserwowano jednak, że u innych gatunków *Pseudomonas*, glukoza a także histydyna może w podobny jak glutaminian i cytrynian sposób wpływać na aktywność enzymów i hamować metabolizm badanych ksenobiotyków [36].

Przy opracowywaniu systemu do biofiltracji gazów powstałych w czasie produkcji części samochodowych okazało się, że szczepy mogące wykorzystywać styren jako jedyne źródło węgla i energii nie są zdolne do degradacji styrenu w obecności octanu butylu. Zastosowanie innych szczepów i zmniejszenie stężenia octanu butylu we wprowadzanym gazie częściowo rozwiązało problem [15].

W badaniach Lu i wsp. [38] nad biofiltracją styrenu i akrylonitrylu, wykazano wyższą efektywność degradacji pojedynczo występujących związków w porównaniu do ich mieszaniny. W mieszaninie akrylonitrylu i styrenu szybkość eliminacji akrylonitrylu $28 \text{ g} \times \text{m}^{-3} \times \text{h}^{-1}$ była wyższa niż styrenu $22 \text{ g} \times \text{m}^{-3} \times \text{h}^{-1}$. Akrylonitryl

był więc substratem preferowanym przez mikroorganizmy. Autorzy wysnuli wniosek, że mikroorganizmy mające do dyspozycji całą gamę substratów wybierają ten który jest najłatwiej przyswajalny. W tym konkretnym przypadku, różnica w szybkości usuwania zanieczyszczeń między mieszaniną i pojedynczymi związkami wzrastała, wraz ze wzrostem obciążenia biofiltra węglem, wskazując że efekt konkurencyjności między tymi dwoma związkami wzmagany jest przez wzrastające obciążenie węglem. Przy obciążeniu $30 \text{ g m}^{-3} \text{ h}^{-1}$ szybkość biofiltracji wynosiła 3 i $4 \text{ g} \times \text{m}^{-3} \times \text{h}^{-1}$ odpowiednio dla akrylonitrylu i styrenu, a przy obciążeniu $60 \text{ g} \times \text{m}^{-3} \times \text{h}^{-1}$, $16 \text{ g} \times \text{m}^{-3} \times \text{h}^{-1}$ dla akrylonitrylu i $11 \text{ g} \times \text{m}^{-3} \times \text{h}^{-1}$ dla styrenu [38].

Metabolizm styrenu możliwy jest dzięki enzymom umożliwiającym rozkład tego związku. Aktywacja enzymów może zachodzić pod wpływem dodatku określonego substratu. Wykazano, że szczep *Pseudomonas putida* CA-3 zdolny jest do rozkładu styrenu, jeśli związek ten zostanie doprowadzony do pożywki wzrostowej z glukozą. Szczepy wyrosłe na podłożu z samą glukozą nie były zdolne do metabolizowania styrenu. Okazało się również, że nie tylko dodatek samego styrenu ale również, tlenku styrenu i fenyloacetoaldehydu indukuje enzymy rozkładające styren i wszystkie produkty pośrednie jego metabolizmu przez ten szczep (tlenek styrenu, fenyloacetoaldehyd, kwas fenylooctowy). Dodatek kwasu fenylooctowego aktywował enzymy biorące udział w jego rozkładzie i fenyloacetoaldehydu, nie indukował natomiast enzymów rozkładających styren i tlenek styrenu [36]. Induktorem syntezy enzymów może być nie tylko sam substrat i jego metabolity. W badaniach degradacji styrenu przez grupę grzybów zdolnych do rozkładu ligniny, wykorzystano kilka induktorów mogących wpłynąć na efektywność rozkładu styrenu. Najwyższy stopień degradacji styrenu przez szczepy *Pleurotus ostreatus* (9F6, G241) uzyskiwano w kulturach wyrosłych na ligninisulfonianie, słabsze efekty uzyskano przy zastosowaniu słomy i drewna. Pozytywne efekty uzyskano przez dodatek ligninosulfonianu i ligninocelulozy do hodowli szczepu *Trametes versicolor*. Szczep *Phanerochaete chrysosporium* najwyższą efektywność degradacji wykazywał po indukcji drewnem i słomą [17].

4. Metody oczyszczania gazów odlotowych

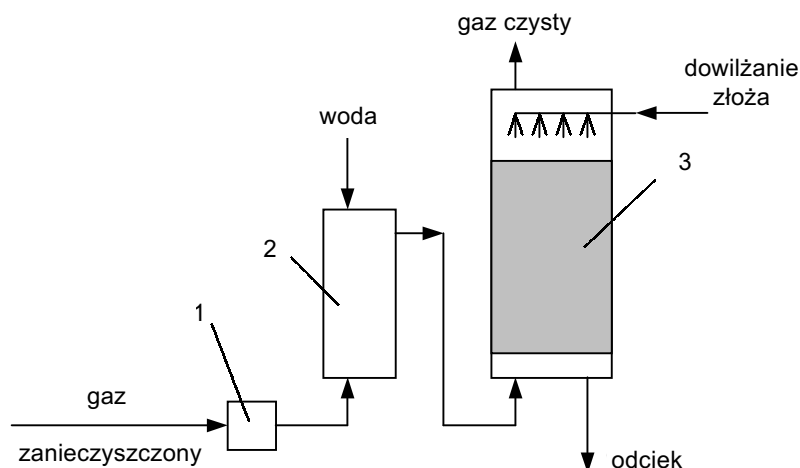
Wiele obiektów gospodarczych i komunalnych emituje do atmosfery uciążliwe dla środowiska, zarówno proste jak i złożone mieszaniny gazów oraz par związków organicznych i nieorganicznych. Niejednokrotnie emisje te cechuje, poza zmiennością składu chemicznego, duża różnorodność parametrów i właściwości fizycznych. Sprawia to, że trudno znaleźć jedną uni-

wersalną metodę oczyszczania [61]. O wyborze tej czy innej metody powinien rozstrzygać proces decyzyjny oparty na sprawdzonych i racjonalnych kryteriach. Jednak często i czynniki emocjonalne nie mogą być pominięte i mogą ostatecznie rozstrzygać, szczególnie przy wyborze pomiędzy dwoma porównywalnymi rozwiązaniami, z których jedno jest tradycyjne, a drugie proekologiczne.

Do oczyszczania gazów zawierających związki organiczne stosuje się obecnie spalanie oraz metody: adsorpcyjne, absorpcyjne, kondensacyjne i biologiczne [61–63]. Metody biologiczne ze względu na wykorzystanie w procesie biokatalizatora i produkty końcowe, należało by zaliczyć do metod spalania katalitycznego, czyli metod niszczących. Przydatne są one szczególnie tam, gdzie metody tradycyjne są nieskuteczne technicznie, ekonomicznie, bądź nieakceptowane ze powodów socjopolitycznych. Zazwyczaj wyróżnia się tutaj trzy rozwiązania szczegółowe: metodę biofluczki, biofiltrację oraz biofiltrację z przepłukiwaniem złoża (ang. biotrickling). W działalności badawczej sporo uwagi poświęcane jest też bioreaktorom membranowym.

Biofluczki (bioskruber) stanowi układ złożony z kolumny absorpcyjnej (absorber) i napowietrzanej komory osadu czynnego. Klasycznym sorbentem jest tutaj wodna zawiesina mikroorganizmów. W kolumnie absorpcyjnej oczyszczane gazy kontaktują się przeciwnieprądowo z sorbentem. W wyniku tego zachodzi absorpcja zanieczyszczeń w fazie ciekłej, a oczyszczony gaz odprowadzany jest do atmosfery. Osad czynny obciążony zanieczyszczeniami spływa grawitacyjnie do komory napowietrzania, gdzie zachodzi właściwa degradacja. Sorbent ulega samoregeneracji i powraca do absorbera. W bioskruberach związki organiczne nie zawierające w cząsteczkach innych pierwiastków niż węgiel, wodór i tlen rozkładane są przez mikroorganizmy do CO_2 i H_2O . Jeżeli w cząsteczkach zanieczyszczeń zawarte są atomy siarki, azotu, fluorowców itp., to zwykle powstają odpowiednie kwasy mineralne co prowadzi do zakwaszenia sorbenta. Konieczne jest wtedy jego bieżące neutralizowanie. Do zalet tych urządzeń zaliczyć można duże szybkości przenikania masy dla substancji dobrze rozpuszczalnych w wodzie, możliwość oczyszczania gazów zawierających zanieczyszczenia w wyższych stężeniach niż w przypadku biofiltrów klasycznych, możliwość kontroli procesu bioregeneracji sorbenta oraz zwartość stosowanej instalacji. Wadą bioskruberów jest konieczność stosowania dużych natężeń zraszania absorbera przy zanieczyszczeniach słabo rozpuszczalnych, wysoki jak na metody biologiczne koszt inwestycyjny i eksploatacyjny, oraz wytwarzanie nadmiaru biomasy [3, 6–8].

W przypadku biofiltrów głównym elementem jest złożo filtracyjne zasiedlone przez mikroorganizmy zdol-



Rys. 4. Schemat ideowy instalacji biofiltracyjnej: 1 – odpylacz, 2 – nawilżacz, 3 – złożo biologiczne

ne do degradacji zanieczyszczeń gazowych. Podczas powolnego przedmuchiwania powietrza zanieczyszczenia są absorbowane lub ulegają sorpcji w cienkiej warstwie fazy ciekłej pokrywającą materiał stały – biofilm, a następnie rozkładane przez mikroorganizmy do wody i dwutlenku węgla [12–13]. Powstały CO_2 przechodzi z fazy wodnej do gazowej i opuszcza filtr. Budowa typowego biofiltra przedstawiona została na Rysunku 4.

Według Szklarczyka możliwość zastosowania biofiltrów zależy od następujących kryteriów [7]:

- Zanieczyszczenia gazowe powinny być rozpuszczalne, choćby w niewielkim stopniu, w wodzie lub tłuszczach i w stosowanym materiale filtracyjnym,
- Powinny być substancjami podatnymi na rozkład biologiczny,
- Temperatura oczyszczanego gazu powinna mieścić się w granicach $15\text{--}35^\circ\text{C}$,
- Zanieczyszczone gazy nie powinny zawierać pyłów i aerozoli i powinny wykazywać wysoką wilgotność,
- Zanieczyszczenia nie mogą wpływać toksycznie na mikroorganizmy.

Parametry mające wpływ na działanie biofiltra wg Ottengrafa to: podłoże filtracyjne, szybkość i czas przepływu gazu, koncentracja zanieczyszczeń w gazie, wilgotność powietrza, odczyn (pH), temperatura, produkty pośrednie i końcowe oraz szczepienie [15].

Jako naturalne, biologicznie aktywne podłoża filtracyjne stosuje się: żyzną glebę o spulchnionej strukturze, torf oraz odpady torfowe, komposty z odpadów komunalnych, komposty z kory drzew i odpady drzewne [7].

Z dużym powodzeniem wykorzystuje się mieszaniny tych podłoży z innymi, niekoniecznie naturalnymi materiałami. Przykładowo, przy biofiltracji styrenu i toluenu zastosowano mieszaninę torfu i szkła w stosunku 4:1 [16, 69]. W celu zwiększenia kontaktu mię-

dzy komórkami grzybów, a wprowadzonym do biofiltra w fazie gazowej styrenem zastosowano kilka materiałów nośnikowych takich jak pianka poliuretanowa, porowata glina i perlit. W tym przypadku najlepszy okazał się perlit, ale różnice były nieznaczne [17]. Dla polepszenia struktury, właściwości sorpcyjnych materiału, oraz przedłużenia jego trwałości dodaje się chruszt, wióry drzewne, mech, korę, pożywki mineralne, a także związki utrzymujące odpowiednie pH [2, 11].

Stosowane są, szczególnie w przypadku biofiltrów przepłukiwanych, złoża z materiałów nieorganicznych oraz złoża syntetyczne, jak: węgiel aktywny, perlit, wypalana glina (keramzyt), pianka poliuretanowa, polistyren.

Właściwie dobrane podłoże powinno dostarczać mikroorganizmom optymalną powierzchnię i wystarczającą do wzrostu ilość składników odżywczych. Ponadto powinno umożliwiać równomierne w płaszczyźnie przekroju poprzecznego rozprowadzanie gazu i zabezpieczać przed nadmiernym spadkiem ciśnienia. Dlatego tak ważne jest właściwe upakowanie złoża, i jego gęstość. Dla optymalnego działania jakiegokolwiek biofiltra istotne jest zachowanie odpowiedniej wilgotności i pH złoża. Ze względów finansowych oraz praktycznych wymagany jest długi okres przydatności, który w przypadku większości stosowanych materiałów wynosi kilka lat. Przykładowo czas eksploatacji materiału filtracyjnego stosowanego w filtrach BIOTON, będącego kompozycją z kompostu i kuleczek polistyrenowych, wynosi 3,5–4 lat. Skuteczność biofiltracji gazów zawierających styren i octan butylu z wykorzystaniem filtrów tej firmy wynosi 95% [11, 16].

Istotnym parametrem brany pod uwagę podczas projektowania systemów do biofiltracji jest ładunek zanieczyszczonych gazów, który zwykle zawiera się w granicach $50\text{--}300\text{ m}^3 \times \text{m}^{-3} \text{ reaktora} \times \text{h}^{-1}$ i czas zatrzymania (retencji) gazu w urządzeniu, który wynosi 10–70 s. Stężenia poszczególnych zanieczyszczeń kształtują się

Tabela II

Podatność zanieczyszczeń gazowych na biodegradację

Związki nieorganiczne	Związki organiczne			
Łatwo	Łatwo	Dobrze	Z trudem	Bardzo trudno
<i>Siarkowodór</i> <i>Amoniak</i> <i>Tlenek węgla</i> <i>Ditlenek siarki</i>	Alkohole: <i>Metanol, Butanol</i> Aldehydy: <i>Formaldehyd Octowy</i> Aminy Kwasy organiczne	Estry: <i>Etylooctowy</i> Ketony, Fenole Węglowodory aromatyczne: <i>Benzen, Styren</i> Merkaptany	Węglowodory alifatyczne i policykliczne: <i>Metan, Pentan</i> <i>Cykloheksan</i>	Inne węglowodory: <i>Chlorowane</i> <i>Policykliczne</i> <i>Poliaromatyczne</i>

od kilku mg do kilku g w m³ gazu. W praktyce rzadko przekraczana jest wartość 1,5–2 g × m⁻³. Szybkość biofiltracji wyrażana jest jako iloraz masy rozkładanego zanieczyszczenia, objętości złoża i czasu [$\frac{g_{\text{substratu}}}{m^3_{\text{złoża}} \times h^{-1}}$], [3]. Jednym z czynników wpływających na efektywność biofiltracji jest budowa i właściwości związków wchodzących w skład gazów przemysłowych oraz ich stężenia. Niektóre z tych związków mogą wpływać toksycznie na mikroorganizmy, stąd ich podatność na rozkład biologiczny jest różna [6]. W tabeli 2 wymienione zostały związki najczęściej występujące w gazach i ich podatność na biodegradację. W literaturze można znaleźć wiele opisów prac poświęconych różnym aspektom biofiltracji: podatności zanieczyszczeń na biodegradację, sprawności i szybkości biofiltracji oraz wpływu na filtrację różnych parametrów, czynnikom przeszkadzającym itd. Spośród przebadanych w jednej z prac związków [7] odporne na biofiltrację okazały się nitrobenzen oraz chlorowcopochodne węglowodorów. W badaniach prowadzonych równolegle w dwóch reaktorach w których podano rozkładowi octan n-butylu i n-butanol zaobserwowano wpływ natężenia przepływu gazu i obciążenia substratem na efektywność degradacji. Najwyższy stopień oczyszczania – 91% – uzyskano dla n-butanolu przy obciążeniu 92,95 mg × m⁻³ × s⁻¹ i 12,4 mg × m⁻³ × s⁻¹ dla octanu n-butylu. W przypadku obu związków skuteczność biofiltracji spadała w miarę wzrostu ich stężenia w wprowadzanym gazie [1].

Zależność efektywności biodegradacji od szybkości przepływu gazu i stężenia substratu obserwowano w badaniach nad degradacją toluenu. Efektywność ta spadała w miarę wzrostu stężenia toluenu powyżej 400 ppm i szybkości przepływu. W emitowanych gazach przemysłowych zwykle mamy do czynienia z mieszaniną związków chemicznych. Efektywność ich usuwania ze względu na różnice w podatności na biodegradację, właściwościach fizycznych, wpływy hamujące itd. jest z natury różna. Przykładowo eliminacja acetonu, 2-propanolu i dichlorometanu z mieszaniny gazowej w biofiltrze zachodziła z szybkościami, odpowiednio, 164, 57 i 15 $\frac{g_{\text{substratu}}}{m^3 \times h^{-1}}$, a eta-

nolu i toluenu z odpowiadającymi im szybkościami 120 i 70 $\frac{g_{\text{substratu}}}{m^3 \times h^{-1}}$ [3].

Optymalna wilgotność w złożu sprzyja procesom sorpcji zanieczyszczeń w biofilmie i ich utlenianiu, limituje też opory i charakter przepływu, a stąd decyduje o sprawności oczyszczania gazu. Wilgotność złoża biofiltrów w zależności od wypełnienia powinna mieścić się w granicach [3]:

- Dla filtrów kompostowych 20–70%.
- Torfowych 30–70%.
- Przy wypełnieniu glebą 10–20%.

Według Junesona i wsp. [27] w przypadku złoża kompostowego wilgotność nie powinna być mniejsza niż 40% i większa niż 65%. Zbyt mała zawartość wody prowadzi do spadku degradacji i tworzenia się kanalików w złożu, a zbyt wysoka do zatykania złoża i tworzenia się obszarów o warunkach beztlenowych [8, 27].

Do tych informacji należy jednak podchodzić z ostrożnością, bo nie zawsze autorzy rozróżniają wilgotność wyrażaną względem suchej od wilgotności określonej względem wilgotnej masy (przy odniesieniu do masy suchej uzyskuje się wyższe wartości).

W wielu eksperymentach dowiedziono, że przy utrzymaniu parametrów przepływu gazu, decydujące znaczenie dla efektywności procesu ma wilgotność złoża, np. jak w przypadku biofiltracji toluenu i ksyleny na dwóch złożach kompostowych [18].

Oprócz nawadniania złoża, nawilża się również wprowadzany gaz. Względna wilgotność powietrza powinna wynosić 96–100% [8].

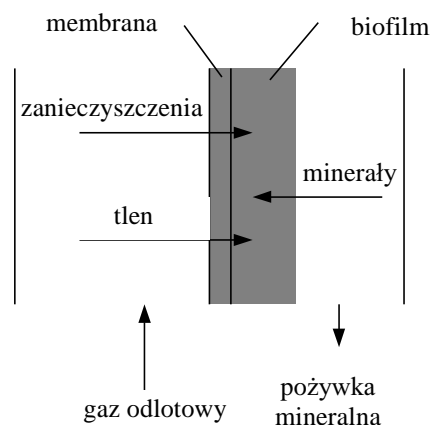
W przypadkach degradacji w biofiltrach substratów zawierających heteroatomy inne niż tlen (S, P, Cl, F i in.), ze względu na akumulowanie się w złożu kwasów mineralnych będących produktami rozkładu tych substancji, konieczne jest przepłukiwanie złoża (ang. trickling). Spływającą ze złoża ciecz neutralizuje się, uzupełnia w niej składniki odżywcze i ponownie wykorzystuje do przepłukiwania złoża. Wadą tego rozwiązania jest często występujące zjawisko zatykania złoża przez mikroorganizmy tworzące micelle (ang. clogging). Kwasowość – pH – złoża powinna być w pobliżu obo-

jętnego (7–8). Temperatura nie może przekraczać maksymalnej temperatury w której mikroorganizmy zdolne są do wzrostu i metabolizowania wprowadzanych zanieczyszczeń [3]. Zwykle jest to nie więcej niż 40°C.

Jednym z istotnych składników biofiltrów są mikroorganizmy. Stanowią je bakterie i grzyby występujące w środowisku naturalnym, na wysypiskach odpadów, używane w oczyszczalniach ścieków, a także pochodzące ze specjalnych hodowli. Mikroorganizmy, którymi szczepione są złoża należą do bakterii rodzaju *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Hyphomicrobium*, *Rhodococcus*, *Xanthobacter*, *Arthrobacter*, *Methylosinus*, *Methylomonas*, *Thiobacillus*, *Proteus*, *Actinomyces*, *Bacillus*, oraz grzybów *Circinella* sp., *Cephalotecium* sp., *Mucor* sp., *Ovularia* sp., *Penicillium* sp. [3,6, 66].

Jak wykazało wielu badaczy, efektywność rozkładu zanieczyszczeń w różnych systemach zależy od doboru właściwych drobnoustrojów. Porównując mikroorganizmy degradujące polichlorowane bifenyle (PCB) zaobserwowano, że efektywność rozkładu jest cechą szczepową. W każdym z badanych rodzajów *Bacillus*, *Nocardia* i *Penicillium*, były szczepy o lepszych i gorszych zdolnościach destrukcyjnych. Zazwyczaj wyższą efektywność degradacji uzyskuje się także przy stosowaniu mieszaniny drobnoustrojów. W badaniach biodegradacji frakcji olejowych, większy o ok. 80–90% ubytek olejów z hodowli uzyskiwano w przypadku mieszanin mikroorganizmów, niż w przypadku pojedynczych szczepów [19, 20]. Do podobnych wniosków doszli Buitron i wsp. [58] w badaniach nad degradacją związków fenolu. Wykazano że mieszanina szczepów *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Flavimonas* sp., i *Chryseomonas* sp. wykazuje dwukrotnie wyższą aktywność metaboliczną w stosunku do związków fenolu niż pojedyncze szczepy. Z obserwacji Westmeister i wsp. cytowanych przez Łebkowską [59] wynika, że nie zawsze mieszanina mikroorganizmów wykazuje wyższą aktywność w porównaniu z pojedynczymi szczepami. Bakterie *Alkaligenes* sp. zdolne były do degradacji 4-chlorofenolu w ściekach sterylnych, natomiast w ściekach niesterylnych, w obecności innych bakterii, ginęły. Okazało się, że toksyczny wpływ na bakterie *Alkaligenes* sp. miał semialdehyd kwasu 5-chloro-2-hydroksymukonowego, będący produktem metabolizmu pozostałych bakterii.

Bioreaktory membranowe są urządzeniami, w których procesy biochemiczne przebiegają w sposób ciągły, z równoczesnym odprowadzaniem produktów reakcji. Można je stosować do usuwania hydrofobowych związków organicznych. Zanieczyszczony gaz przechodzi przez hydrofobową błonę, w której następuje rozpuszczenie składników hydrofobowych i ich dyfuzja na drugą stronę membrany, na której znajdują się mikroorganizmy. Drobnoustroje degradujące zanieczyszcze-



Rys. 5. Schemat przepływów w reaktorze membranowym

nia mogą być rozproszone lub unieruchomione. Przykład takiego reaktora biologicznego pokazany został na rysunku 5.

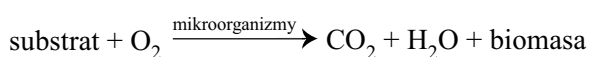
Procesy z zastosowaniem membran z immobilizowanymi komórkami mikroorganizmów mogą być stosowane samodzielnie, lub w połączeniu z innymi metodami. Bioreaktory membranowe mogą być montowane niemal w dowolnym miejscu i można je łatwo dopasować do każdej skali procesu. Dotychczas bioreaktory membranowe zastosowano do degradacji, między innymi, chlorowcopochodnych związków aromatycznych przez *Pseudomonas putida*, a także do unieszkodliwiania fenolu. Wysoką 99% degradację fenolu uzyskiwano przy zastosowaniu bioreaktora z immobilizowanymi komórkami *Candida tropicalis* [10]. Niestety pomimo zalet tych bioreaktorów, mają one kilka wad, które znacznie ograniczają możliwość ich zastosowania. Jedną z nich są stosunkowo wysokie koszty inwestycyjne. Dużym problemem jest zjawisko „foulingu”, które polega na zanieczyszczeniu membran w wyniku gromadzenia się w ich porach cząstek, wpływających na zmniejszenie przepuszczalności lub blokadę błony. Innym problemem jest ograniczona żywotność membran oraz niska wytrzymałość chemiczna i termiczna [3, 9, 64].

4. Czynniki wpływające na degradację styrenu

Metody polegające na usuwaniu z udziałem mikroorganizmów, substancji zagrażających naszemu środowisku znane są od wielu lat. Nie są one niczym innym, jak wykorzystaniem na szeroką skalę procesów zachodzących w środowisku naturalnym. Niestety niekorzystny wpływ działalności człowieka jest tak duży, że musimy wspomagać naturę w jej samooczyszczaniu. Z punktu widzenia środowiska zastosowanie metod mikrobiologicznej degradacji wydaje się prawie idealnym rozwiązaniem. Podczas tego typu procesów

powstają tylko nieszkodliwe produkty jak CO₂, H₂O i sole mineralne, dzięki czemu nie przesuwamy problemu zanieczyszczeń w inne miejsce. Ponadto w niektórych przypadkach mikroorganizmy mogą dokonać tego, czego chemia dokonać nie może. Między innymi stąd bierze się tak duże w ostatnim czasie zainteresowanie rozwojem biologicznych metod degradacji zanieczyszczeń [11, 52–54].

Drobnoustroje biorące udział w tych procesach są wysoce zróżnicowane metabolicznie, tak więc teoretycznie każde zanieczyszczenie typu organicznego powinno dać się zdegradować, przez odpowiednio dobrane mikroorganizmy. Podczas mikrobiologicznej degradacji zanieczyszczeń zawartych w gazach zachodzą dwa zasadnicze procesy: sorpcja zanieczyszczeń i ich biodegradacja. Efektem tego jest powstanie prostych związków nieorganicznych, takich jak CO₂ i H₂O.



W przypadku usuwania zanieczyszczeń gazowych istnieją pewne ograniczenia. Biologicznemu oczyszczaniu można poddać tylko gazy [2, 21–22]:

- podatne na rozkład biologiczny,
- rozpuszczalne w wodzie lub lipidach (lipidy wchodzi w skład błony komórkowej),
- których temperatura nie hamuje procesów życiowych mikroorganizmów,
- wolne od substancji trujących dla mikroorganizmów, takich jak metale ciężkie i kwasy.

Mikroorganizmy wykorzystywane do rozkładu ksenobiotyków typu styrenu czy też innych węglowodórów aromatycznych, należą do trzech grup. Są to bakterie, promieniowce oraz grzyby. Jednym z ważniejszych problemów w projektowaniu systemów do oczyszczania gazów jest dobór odpowiednich mikroorganizmów. Ustalone powinny być wszystkie czynniki determinujące ich skuteczność i bezpieczne użycie. Istotna jest więc wiedza o [1, 23]:

- zdolności szczepu do wzrostu w obecności różnego rodzaju związków organicznych,
- szybkości i stopniu zużycia tych związków,
- zdolności emulgowania substratów,
- wymagań pokarmowych szczepów,
- aktywności enzymów,
- produktach metabolizmu,
- występujących zjawiskach kometabolizmu,
- warunkach izolowania i selekcji szczepów.

Mikroorganizmy wykorzystywane do degradacji ksenobiotyków są izolowane ze środowiska naturalnego, oraz już istniejących systemów oczyszczających. Ich aktywność względem badanego zanieczyszczenia jest jednak często zbyt niska, by mogły być wykorzystane na skalę przemysłową. Istnieje więc konieczność adaptacji mikroorganizmów do wysokich stężeń danego

związku. Adaptacja ta związana jest z odpowiedzią danego szczepu lub mieszaniny drobnoustrojów na zmieniające się warunki. Jest to często związane z koniecznością syntezy przez mikroorganizmy nowych rodzajów enzymów, umożliwiających metabolizm jedynego źródła węgla znajdującego się w danym środowisku, by umożliwić ich dalszy rozwój. Nie wszystkie mikroorganizmy wyizolowane ze środowiska naturalnego są zdolne do adaptacji i czerpania korzyści z nowej sytuacji [21].

W środowisku naturalnym możemy znaleźć mikroorganizmy zdolne do degradacji styrenu. Nie jest to zaskoczeniem, jeśli weźmiemy pod uwagę fakt, że styren nie jest wyłącznie produktem działalności człowieka, ale w niewielkich ilościach powstaje w ekosystemach naturalnych bez naszego udziału, jak chociażby w wyniku dekarboksylacji kwasu cynamonowego [24, 25]. Pierwsze kroki podejmowane w celu izolacji mikroorganizmów zdolnych do degradacji tego związku kończyły się niepowodzeniami prawdopodobnie dlatego, że stosowane stężenia styrenu były na tyle wysokie, iż mogły wpływać toksycznie.

H a r t m a n s i wsp. [25] wyizolowali z gleby i wody mikroorganizmy degradujące styren. Hodowlę prowadzono trzema metodami z dodatkiem styrenu jako jedynego źródła węgla i energii. W celu wyizolowania czystych kultur pobierano pojedyncze kolonie i izolowano na podłoże z wyciągiem drożdżowym i glukozą. Dzięki zastosowaniu względnie niskich stężeń styrenu, nie przekraczających 0,5 mM × dm³ podczas hodowli, udało się wyizolować 14 szczepów bakterii i dwa szczepy grzybów.

W a r h u r s t i wsp. [26] jako inokulum do hodowli zastosowali odpady przemysłu chemicznego. Hodowlę prowadzono w kolbkach z płynną pożywką mineralną i dodatkiem styrenu w ilości nie przekraczającej 1 mM. Tą metodą udało się wyizolować bakterię zidentyfikowaną jako *Rhodococcus rhodochrous*, wykazującą wysoką aktywność metaboliczną nie tylko w stosunku do styrenu ale również innych substratów, takich jak: toluen, etylobenzen, benzen, fenol i inne.

W badaniach nad biofiltracją przy wysokich stężeniach styrenu J u n e s o n i wsp. [27] izolowali drobnoustroje z mułu pościekowego. Hodowlę prowadzono w kolbkach z płynną pożywką mineralną do której wprowadzano styren w formie gazowej. Czyste hodowle uzyskano z mieszaniny mikroorganizmów wysianych na podłoża stałe. Badając profile kwasów tłuszczowych (MIDI) zidentyfikowano sześć gatunków: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Flavobacterium mizn-tali*, *Nocardia globerula*, *Rhodococcus erythropolis*, *Micrococcus varians*, *Xantobacter agilis*.

Za pomocą testów diagnostycznych A r n o l d i wsp. [28] zidentyfikowali siedem szczepów bakterii wyizolowanych z filtra torfowego. Duże trudności sprawiła

ich identyfikacja. Przyczyną tego był fakt, że izolaty były albo nietypowe, albo nieznanne w używanych bazach danych. W efekcie wykazano przynależność tych bakterii do: rodzaju *Tsukamurella*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Xanthomonas*, i o niezidentyfikowanym rodzaju w g grupie *Proteobacteria*.

Obecnie w identyfikacji mikroorganizmów zastosowanie znajdują techniki molekularne. Jedną z nich T r e s s e i wsp. [29] wykorzystali do analizy populacji mikroorganizmów obecnych w bioreaktorze do degradacji styrenu. Na podstawie analizy 16S rDNA zidentyfikowano *Rhodococcus erythropolis* jako bakterię zasiedlającą biofilm. Jednocześnie analiza z wykorzystaniem elektroforezy na żelu wykazała różnicę w populacji mikroorganizmów między materiałem szczepiennym i biofilmem bioreaktora. Ustalono, że tylko 50% bakterii obecnych w inokulum zasiedlało biofilm reaktora. Może to świadczyć o trudnościach w adaptacji pewnych grup bakterii do warunków bioreaktora. Zaobserwowano również różnicę w populacji bakterii zawieszonych i immobilizowanych. Po 35 dniach pracy bioreaktora większa była różnorodność bakterii immobilizowanych niż zawieszonych. Okres ten nazwano więc okresem adaptacji. Pomiędzy 84 i 182 dniem pracy bioreaktora, skład gatunkowy biofilmu nie ulegał zmianie. Autorzy sugerują, iż w tym czasie dochodziło do dojrzewania biofilmu. Istnieje wiele hipotez na ten temat, pewne jest natomiast, że starszy biofilm jest bardziej odporny na działanie antybiotyków, a stały skład gatunkowy zapewnia wysoki stopień degradacji.

Do mikroorganizmów degradujących styren należą ponadto: *Pseudomonas*, *Xanthobacter*, *Alkaligenes*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia Clostridium* i *Enterobacter*, *Bjerkandera adusta*, *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Exophiala jeanselmei* [17, 24, 28, 30].

Stężenie styrenu jest jednym z najważniejszych czynników mających wpływ na efektywność biodegradacji i szybkość adaptacji mikroorganizmów. Od koncentracji tego związku chemicznego zależy jego toksyczność względem mikroorganizmów. W badaniach nad grupą grzybów *Bjerkandera adusta*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* (F6), *Pleurotus ostreatus* (G241), *Phanerochaete chrysosporium*, zaobserwowano wpływ stężenia styrenu na aktywność poszczególnych szczepów. Wszystkie zdolne były do metabolizmu styrenu przy stężeniu 22 i 44 $\mu\text{mol} \times (250 \text{ ml})^{-1}$, natomiast stężenie 88 $\mu\text{mol} \times (250 \text{ ml})^{-1}$ wpływało toksycznie na wszystkie szczepy oprócz *Pleurotus ostreatus* [17].

Dziesięć szczepów wyizolowanych z biofiltra torfowego zdolnych było do degradacji styrenu przy stężeniu 0,02% w podłożu. Tolerancję na stężenie 0,2% wykazywało dziewięć szczepów, natomiast tylko jeden z nich *Pseudomonas chlororaphis* zdolny był do

wzrostu przy 6% zawartości styrenu [28]. Efektywność degradacji styrenu przez mieszaninę mikroorganizmów glebowych, badana przez S i e l i c k i e g o i wsp. [31] była najwyższa (90%) przy koncentracji styrenu 0,2%. Dodatek styrenu w ilości 0,5% powodował spadek efektywności degradacji do 75%.

Badania laboratoryjne nad zdolnością do degradacji styrenu przez różne szczepy, są wstępem do ich późniejszego wykorzystania w instalacjach do oczyszczania gazów. Prowadząc biofiltrację gazów zaobserwowano, że efektywność oczyszczania wzrasta powoli, aż osiągnie pewną wartość. Okres adaptacji zależy od rodzaju zanieczyszczeń i populacji mikroorganizmów i trwa od kilku godzin do kilku tygodni. Z czasem złożone biofiltra pokrywane jest warstwą mikroorganizmów zdolnych do efektywnej degradacji wprowadzanych zanieczyszczeń [8].

Dla szczepu *Rhodococcus* FG 12 wykorzystanego w biofiltracji styrenu i octanu butylu okres adaptacji wyniósł w przybliżeniu miesiąc. W tym czasie nastąpiło zwiększenie gęstości populacji i rosła efektywność degradacji, aż do 90% [15]. Czas adaptacji szczepu *Rhodococcus rhodochrous* AL NCIMB 13259 w biofiltrze do którego wprowadzano gaz zawierający styren w stężeniu $0,05 \text{ g} \times \text{m}^{-3}$ wyniósł 2 dni. Po tym okresie uzyskano 100% efektywność degradacji. W publikacji tej opisano również wpływ szybkości wprowadzania gazu i zawartości styrenu na efektywność biofiltracji. Przy stopniowym zwiększaniu szybkości przepływu i stężenia styrenu oraz zachowaniu 10-godzinnej okresu pomiędzy kolejnymi testami, przeznaczonego na adaptację mikroorganizmów i stabilizację systemu, udało się uzyskać szybkość degradacji równą $63 \text{ g} \times \text{m}^{-3} \times \text{h}^{-1}$ [16].

Zależność biodegradacji od szybkości przepływu gazu i stężenia styrenu badał również J u n e s o n i wsp. [27]. W czasie uruchamiania instalacji, czas retencji gazu był równy 120 s, natomiast stężenie styrenu wynosiło 1,2–2,8 $\text{g} \times \text{m}^{-3}$. Skuteczność usuwania styrenu podczas pierwszych dni była niska i zwiększała się stopniowo. Po 11 dniach wzrost ilości degradowanego styrenu wskazywał na adaptację mikroorganizmów do warunków panujących w biofiltrze. Po tym czasie stopniowo zwiększono szybkość przepływu gazu i koncentrację styrenu. Zachowanie odpowiednich warunków i czasu potrzebnego na adaptację mikroorganizmów umożliwiło osiągnięcie wysokiej szybkości biodegradacji 69–118 $\text{g} \times \text{m}^{-3} \times \text{h}^{-1}$. Efektywność wynosiła zaś średnio 65–75%, maksymalnie uzyskiwano nawet 100% efektywność biofiltracji.

W biofiltrach torfowych zasiedlonych mieszaniną bakterii okres adaptacji trwał 12 dni, podczas których efektywność degradacji wzrastała, aż osiągnęła 80%. Przeciętna redukcja styrenu po 190 dniach wyniosła 70% (maksymalnie 98%), a średnia szybkość eliminacji

styrenu $12 \text{ g} \times \text{m}^{-3} \times \text{h}^{-1}$ (maksymalna $30 \text{ g} \times \text{m}^{-3} \times \text{h}^{-1}$) [28]. Przeciętna szybkość degradacji styrenu zachodzącej przy udziale *Exophiala jeanselmei* zasiedlających biofiltr wyniosła $79 \text{ g} \times \text{m}^{-3} \times \text{h}^{-1}$. W tym czasie efektywność mieściła się w granicach 96–98% [30].

Woda jest jednym z najważniejszych czynników regulujących wzrost i rozwój drobnoustrojów. Większość drobnoustrojów wymaga do swojego rozwoju jej aktywności (a_w) w granicach 0,95–0,99. Minimalne wartości a_w , przy których drobnoustroje są jeszcze aktywne mieszczą się w zakresie 0,60–0,95. Wartości te zależne są od rodzaju, gatunku i szczepu. Pleśnie i drożdże wykazują większą tolerancję na niską aktywność wody niż bakterie [32–35].

Wykazano, że na degradację styrenu przez grzyby *Exophiala jeanselmei* ogromny wpływ ma zapewnienie odpowiedniej ilości i aktywności wody. Stopień degradacji styrenu określany był przy aktywności wody równej: 0,90; 0,93; 0,97; 1,0; Rozkład styrenu przy udziale *Exophiala jeanselmei* możliwy był jeszcze $a_w = 0,91$, jednak wynosił tylko 5% maksymalnej wartości uzyskiwanej przy $a_w = 1,0$ [30].

Wilgotność jest więc jednym z ważniejszych parametrów decydujących o sprawności biofiltracji. Jej spadek prowadzi do wysychania złoża, oraz jego pęknięcia czego efektem są zaburzenia jednolitego przepływu gazu i utrata aktywności enzymatycznej drobnoustrojów. Niekorzystne jest również nadmierne nawilżanie złoża, które prowadzi do powstania warunków beztlenowych hamujących funkcje życiowe mikroorganizmów.

Względna wilgotność fazy gazowej ma wyraźny wpływ na pracę biofiltra. Przeciętna zawartość wody w złożu zmniejsza się w wyniku parowania, które jest jeszcze wzmagane przez ciepło wytwarzane w czasie utleniania styrenu. Proces ten jest wysoce egzotermiczny i prowadzi do podgrzania powietrza, czego efektem jest zwiększenie absorpcji pary wodnej przez gaz i wysychanie złoża. W badaniach nad degradacją styrenu przez *Exophiala jeanselmei* okazało się, że wprowadzanie do biofiltra gazu o względnej wilgotności 91% przy zawartości wody w złożu biofiltra 58%, prowadzi do spadku aktywności mikroorganizmów o około 50% po 18 dniach. Proces ten spowodowany jest parowaniem, dlatego oprócz nasycania wodą gazu, konieczne jest wprowadzanie dodatkowej wody do złoża biofiltra. Dla uzyskania 96–98% efektywności degradacji styrenu (przy szybkości rozkładu $79 \text{ g} \times \text{m}^{-3} \times \text{h}^{-1}$), zawartość wody w biofiltrze powinna być nie mniejsza niż 66 % [30].

Reakcje zachodzące w organizmie żywym są reakcjami katalizowanymi przez enzymy białkowe, aktywne tylko w pewnych granicach temperatur, dlatego spadek lub wzrost temperatury powyżej pewnej granicy prowadzi do zahamowania funkcji życiowych [33–35]. Podczas hodowli i izolacji mikroorganizmów zdolnych

do degradacji węglowodorów aromatycznych, w tym również styrenu, zwykle stosuje się temperaturę w granicach 20–30°C. Jest to zakres charakterystyczny dla mezofili, i to właśnie organizmy tej grupy mają największe znaczenia w procesach biologicznej degradacji zanieczyszczeń.

Do mezofili należy większość drobnoustrojów zasiedlających środowisko naturalne, a większość procesów zachodzących w glebie jest związana z ich biochemiczną działalnością [33].

Podsumowując te dane można stwierdzić, że temperatura wpływa na kinetykę biodegradacji wpływając na bieg procesów biochemicznych, a także powodując zmiany wilgotności złoża.

W badaniach degradacji styrenu wykorzystywano m.in. hodowle szczepów *Pseudomonas putida* CA-3, *Pseudomonas putida* LW4, *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259 w temperaturze 30°C oraz *Bjerkandera adusta*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* w temperaturze 22°C [17, 24, 26, 36].

Wykazano że usuwanie styrenu przy użyciu torfu jako materiału nośnikowego, jest najbardziej efektywne przy temperaturze 20–23°C. Degradacja styrenu była możliwa również w 12°C, ale przy niskich stężeniach styrenu. W temperaturze 20–23°C zdolność absorpcyjna torfu była idealna, był on przesycony wodą i nie wymagał dodatkowego nawadniania. Po podwyższeniu temperatury do 25°C dochodziło do zmian fizycznych w budowie materiału nośnikowego. W temperaturze wyższej niż 25°C dochodziło do zmian mikroflory. Zaczęły rozwijać się drożdże, pleśnie, nicienie i inne organizmy utrudniające oczyszczanie gazu [28].

pH należy do podstawowych parametrów wpływających na rozwój mikroorganizmów. Wartość pH przy której rozwój jest najlepszy, jest różna dla poszczególnych rodzajów, gatunków, a nawet szczepów [32, 35]. Do badań nad bakteryjną degradacją styrenu prowadzonych przez Hartmana i wsp. [25] wykorzystano komórki bakterii i grzybów hodowanych na pożywkę mineralnej o odpowiednim pH. Pożywkę dla bakterii doprowadzono do pH 7. Grzyby do wzrostu wymagają niższego pH, dlatego do pożywki dodatkowo wprowadzono kwas chlorowodorowy w ilości takiej by uzyskać pH 4,5. Tym sposobem udało się wyhodować 14 szczepów bakterii tlenowych i dwa rodzaje grzybów zdolnych do degradacji styrenu.

W biofiltracji styrenu często stosowanym złożem nośnikowym jest torf. Jak wykazano w badaniach prowadzonych przez Arnolda i wsp. [28] skuteczność naturalnego torfu w usuwaniu styrenu jest nieznaczna ze względu na jego niskie pH i małą zawartość składników odżywczych, która nie sprzyja aktywności mikroorganizmów. W celu podwyższenia pH z 4 do

6,5 dodawano wapno, składniki odżywcze uzupełniano odpowiednio dobraną pożywką. Okazało się że pH ma ogromne znaczenie dla aktywności mikroorganizmów, ale dostosowanie samego pH nie gwarantuje wysokiej skuteczności filtracji. W wyniku wzrostu pH i dodatku składników odżywczych uzyskano 90% skuteczność biofiltracji. Dodatek wapna bez dodatku pożywki wpłynął na wzrost biodegradacji, jednak w znacznie mniejszym stopniu niż przy dostosowaniu obu tych parametrów. Drobnoustroje mogą wpływać na odczyn środowiska poprzez swoją działalność życiową. Początkowe pH podłoża wzrostowego jest zależne od jego składu chemicznego, ale w miarę wzrostu mikroorganizmów, mogą zachodzić zmiany pH wynikające z charakteru ich metabolizmu i fizjologii [32].

Mikrobiologiczne utlenianie pewnych związków organicznych może prowadzić do powstawania kwasów powodujących obniżenie pH złoża biofiltra. W efekcie prowadzi to do spadku lub zaniku aktywności enzymatycznej drobnoustrojów [8]. W takich przypadkach, celem stabilizacji pH, wprowadza się substancje buforujące do złoża. Podczas badań nad biofiltracją styrenu i octanu butylu, zaobserwowano spadek pH podczas hodowli szczepu *Rhodococcus* FG12 na pożywce mineralnej z dodatkiem styrenu. Było to spowodowane pojawieniem się pośrednich produktów metabolizmu styrenu o charakterze kwasów. Podczas pracy biofiltra zaszczerpionego *Rhodococcus* FG12 udało się uniknąć spadku pH stosując wapien jako związek buforujący [15]. Aby uniknąć zakwaszenia złoża biofiltra oprócz wapienia stosuje się, ziemię okrzemkową oraz inne substancje zasadowe, nawet muszle ostryg [3, 8]. Jeżeli zabiegi te nie dają efektu, konieczne jest usuwanie produktów metabolizmu na drodze przepłukiwania złoża (biotrickling) [3].

Innym, równie istotnym czynnikiem wpływającym na aktywność mikroorganizmów jest tlen. W przyrodzie spotykamy drobnoustroje charakteryzujące się różną tolerancją na ten parametr [32, 33]. Eksperymentalnie wykazano zależność metabolizmu styrenu od obecności tlenu. Hartmans i wsp. [24] wykazali że brak tlenu w zawiesinie komórek *Xanthobacter* 124X, jest czynnikiem hamującym degradację styrenu. Z badanych próbek ze styrenem usuwano tlen poprzez przepłukanie azotem, i prowadzono doświadczenie konfrontując wyniki z próbką kontrolną z tlenem. W badanych próbkach nie zaobserwowano rozkładu styrenu. Po wprowadzeniu tlenu uzyskano stopień degradacji styrenu identyczny z próbką kontrolną [24]. Podobne doświadczenie przeprowadził O'Connor i wsp. [36] z szczepem *Pseudomonas putida* CA-3. Rezultaty uzyskane przez O'Connor'a i Hartmanna potwierdzają, iż tlen jest niezbędny w metabolizmie styrenu przez wymienione wyżej szczepy. Brak

jakiegokolwiek produktu pośredniego w testowanych próbkach z azotem świadczyć może o tym, że pierwszym etapem degradacji styrenu jest jego utlenianie.

Biodegradacja może zachodzić również w warunkach beztlenowych, jednak proces ten przebiega wówczas dużo wolniej. Istnieje jednak możliwość wykorzystania mikroorganizmów beztlenowych w degradacji styrenu, o czym przekonują badania prowadzone przez Grbic-Galik i wsp. [37]. Konsorcjum mikroorganizmów izolowanych z mułu kanalizacyjnego i hodowanych w atmosferze składającej się z 30% CO₂ i 70% N₂, było zdolne do degradacji styrenu w ilości 0,1–10 mM × dm⁻¹.

Wszystkie mikroorganizmy do właściwego rozwoju wymagają źródła węgla, tlenu, azotu, wodoru, fosforu, siarki, i innych pierwiastków tworzących materię organiczną. W wyniku rozkładu styrenu i innych węglowodorów, drobnoustroje pobierają węgiel i wodór. Tlen pobierany jest z atmosfery, natomiast pozostałe pierwiastki muszą być dostarczone przez odpowiedni dobór składników podłoża. Zasada ta odnosi się zarówno do izolacji i hodowli drobnoustrojów jak i w stosunku do ich późniejszego wykorzystania w biofiltrach.

Biorąc pod uwagę ten aspekt można stwierdzić, że złoża naturalne takie jak torf czy kompost mają przewagę nad innymi, ze względu na zawartość substancji organicznych umożliwiających rozwój mikroorganizmów. Jednak jak przekonano się w badaniach nad degradacją styrenu, nie zawsze naturalny materiał ma wystarczającą ilość składników odżywczych. Aby przekonać się jaki wpływ na aktywność mikroorganizmów mają składniki odżywcze Arnold i wsp. [28] wprowadzali do materiału filtracyjnego, którym był torf, pożywkę zawierającą 10% azotu, 7% fosforu, 14% potasu, 9% siarki. Spowodowało to zmianę stosunku C:N:P z 1000:15:0.5 na 1000:40:6. W efekcie tych zmian skuteczność filtracji wzrosła o 20%. W dalszych testach wprowadzano oddzielnie siarczan, potas i wyciąg drożdżowy będący źródłem witaminy B, nie wpłynęło to jednak na dalszy wzrost skuteczności biofiltracji. Doświadczenie to wskazuje, że niedobór azotu i fosforu w największym stopniu wpływa na spadek aktywności mikroorganizmów. Istotny wniosek uzyskany w tych badaniach jest taki, że nie zawsze dany pierwiastek jest dostępny dla mikroorganizmów. Jest to zależne od formy, w której jest wprowadzany. Związki z dobrze rozpuszczalnym azotem i fosforem takie jak NH₄NO₃ i KH₂PO₄ były łatwiej przyswajane przez mikroorganizmy i wpływały na wzrost ich aktywności, jednak tylko przez stosunkowo krótki okres dwóch tygodni. Spadek aktywności po tak krótkim czasie, był prawdopodobnie spowodowany wymywaniem dobrze rozpuszczalnych związków ze złoża biofiltra.

6. Podsumowanie

W artykule przedstawiono stan badań oraz metody i urządzenia wykorzystywane w usuwaniu substancji lotnych, za szczególnym uwzględnieniem styrenu. Styren jest związkiem należącym do grupy najbardziej uciążliwych substancji obecnych w środowisku. Wpływa on niekorzystnie na zdrowie ludzi i zwierząt. Prowadzone badania wskazują, że bardzo ważne jest opracowanie skutecznych metod umożliwiających unieszkodliwianie tego typu zanieczyszczeń. Jednymi z najbardziej efektywnych wydają się metody biologiczne ze względu na ich skuteczność, wydajność oraz niski koszt w porównaniu z innymi metodami. Fakt ten wskazuje na konieczność poszukiwania i izolacji mikroorganizmów zdolnych do degradacji styrenu. Ważne jest również określenie czynników wpływających na aktywność mikroorganizmów, aby możliwe było zastosowanie wyizolowanych szczepów w różnych warunkach. Efektem końcowym powinny być informacje umożliwiające skuteczne i opłacalne zastosowanie uzyskanych szczepionek w przemysłowych systemach do oczyszczania gazów odlotowych zanieczyszczonych styrenem.

Piśmiennictwo

- Ziemiński K., Pilech-Przybylska K., Szopa J.S.: Mikrobiologiczny rozkład wybranych węglowodorów stanowiących zanieczyszczenie powietrza (w) Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa „Rozkład i Korozja Mikrobiologiczna Materiałów Technicznych”, Łódź, sesja III, s. 247–279 (2001)
- Tymczyna L., Chmielowiec-Korzeniowska A.: Biologiczne oczyszczanie powietrza wentylowanego z budynków inwentarskich. *Ekol. i Tech.* **5**, 13–16 (1996)
- Łebkowska M., Tabernaacka A.: Biotechnologiczne metody usuwania zanieczyszczeń z gazów odlotowych. *Biotechnologia*, **3**, 141–150 (2000)
- „Styren”. WHO air quality guidelines. WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark Part II, chapter 5, 12 (2000)
- Warych J.: Oczyszczanie gazów Procesy i Aparatura. WNT Warszawa, 1998, s. 269–383
- Warych J.: Biooczyszczanie Gazów Odlotowych. *Inż. Ekol.* **4**, 59–67 (2001)
- Szklarczyk M., Czermazowicz M., Adamiak W.: Biologiczne oczyszczanie gazów – stan obecny i perspektywy rozwoju. *Biotechnologia*, **1**, 109–116 (1997)
- Bezborodov A.M., Kozlyak E.I., Yakimov M.M., Utkin I.B., Rogozhin I.S.: Microbiological methods of air purification. *Biotechnologia*, **1**, 95–107 (1994)
- Wrzesińska B.: Techniki membranowe w procesach z użyciem materiałów biologicznie czynnych. *Inż. Ekol.* **4**, 69–75 (2001)
- K.C. Chen., Y.H. Lin, W.H. Chen., Y.C. Liu.: Degradation of phenol by PAA-immobilized *Candidia tropicalis*. *Enzyme and Microbial Technology*, **31**, 490–497 (2002)
- Kulig A.: Zalety i ograniczenia w zastosowaniu biofiltrów do oczyszczania gazów odlotowych z substancji zapachowych. *Biotechnika w ochronie środowiska*, Int. Symp. Bio'94 Poland, Świnoujście 25–27 maj, s. 23–30 (1994)
- Adler S. F.: „Biofiltration – a Primer”. *Environmental Protection*, April 2001, 33–41, www.aiche.org/cep/
- Egenolf B.: Biological waste gas treatment for remediation activities – Application of biofilters (case study). *Biotechnika w ochronie środowiska*, Int. Symp. Bio'94 Poland, Świnoujście 25–27 maj, s. 39–52 (1994)
- Kaczyńska T., Palica M., Tatoj P., Waluś J., Wilczek A.: Badania oporów przepływu i skuteczności dezodoryzacji trójetyloaminy na wybranych złożach naturalnych część III. *Ochr. Pow. Odpad.* **1**, 19–24 (1998)
- McGrath M.S., Nieuwland J.C., van Lith C.: Biofiltration of styrene and butylacetate at a dashboard manufacturer. *Environ. Progress*, **18** (3), 197–204 (1999)
- Zilli M., Palazzi E., Sene L., Converti A., Del Borghi M.: Toluene and styrene removal from air in biofilters. *Process Biochemistry*, **37**, 423–429 (2001)
- Braun-Lulleman A., Majcherczyk A., Huttermann A.: Degradation of styrene by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**, 150–155 (1997)
- Wieczorek A.: Studies of Biofiltration of Waste Gases Containing Toluene and Xylene, Proc. 3rd Int. Sci. Conference „Air Protection in Theory & Application, Zabrze 2000, 3rd vol. s. 257–263
- Sudoł T., Krzyśko-Łupicka T.: Porównanie stopnia biodestrukcji PCBs przez bakterie i grzyby glebowe (w) Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa „Rozkład i Korozja Mikrobiologiczna Materiałów Technicznych”, Łódź 2001, sesja III, s. 280–283.
- Bieszkiewicz E., Mycielski R., Boszczyk-Maleszak H., Wyszowska B.: Biodegradacja frakcji olejowej ścieków petrochemicznych przez bakterie izolowane z zaolejonej gleby. *Biotechnologia*, **1**, 71–77 (1997).
- Singleton P.: Bakterie w biologii, biotechnologii i medycynie. PWN, Warszawa 2000
- Barbusiński K.: Leksykon biotechnologii Środowiskowej. PWN, Warszawa 1999
- Galas E., Kwapisz E., Tarabasz-Szymańska Ł., Antczak T., Oryńska A.: Charakterystyka wybranych szczepów degradujących węglowodory ropy naftowej. *Biotechnologia*, **1**, 146–157 (1997)
- Hartmans S., Smits J.P., van der Werf M.J., Volkering F., de Bont J.A.M.: Metabolism of styrene oxide and 2-phenylethanol in the styrene-degrading *Xanthobacter* strain 124X. *Appl. Environ. Microbiol.* **11**, 2850–2855 (1989)
- Hartmans S., van der Werf M.J., de Bont J.A.M.: Bacterial degradation of styrene involving a novel flavin adenine dinucleotide-dependent styrene monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **5**, 1347–1351 (1990)
- Warhurst A.M., Clarke K., Hill R.A., Holt R.A., Fewson C.A.: Metabolism of styrene by *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259. *Appl. Environ. Microbiol.* **4**, 1137–1145 (1994)
- Junesson C., Ward O.P., Singh A.: Microbial treatment of styrene-contaminated air stream in a biofilter with high elimination capacities. *J. Industr. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 196–202 (2001)
- Arnold M., Reittu A., von Wright A., Martikainen P.J., Suihko M.L.: Bacterial degradation of styrene in waste gases using a peat filter. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 738–744 (1997)
- Tresse O., Lorrain M.J., Rho D.: Population dynamics of free-floating and attached bacteria in a styrene-degrading bio-trickling filter analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 585–590 (1998)
- Cox H.H.J., Magielsen F.J., Doddema H.J.: Influence of the water content and water activity on styrene degradation

- by *Exophiala jeanselmei* in biofilters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 851–856 (1996)
31. Sielicki M., Focht D.D., Martin J.P.: Microbial transformation of styrene and [¹⁴C]styrene in soil and enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **2**, 124–128 (1978)
32. Chmiel A.: *Biotechnologia. Podstawy mikrobiologiczne i chemiczne*. PWN, Warszawa 1991
33. Gołębiowska J.: *Mikrobiologia rolnicza*. PWRiL Warszawa 1986, s. 95–105
34. Kunicki-Goldfinger W.J.H.: *Życie bakterii*. PWN Warszawa 1994, s. 363–379
35. Szember A.: *Mikrobiologia rolnicza*. Wyd. Akademii Rolniczej, Lublin 1978, s. 95–104
36. O'Connor K., Buckley C.M., Hartmans S., Dowbson A.D.W.: Possible regulatory role for nonaromatic Carbon sources in styrene degradation by *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2** 544–548 (1995)
37. Grbić-Galić D., Churchman-Eisel N., Mraković I.: Microbial transformation of styrene by anaerobic consortia. *J. Appl. Bacteriol.* **69**, 247–260, (1990)
38. Lu C., Lin M.R., Wey I.: Removal of acrylonitrile and styrene mixtures from waste gases by trickle-bed air biofilter. *J. Hazardous Materials*, **3**, 233–245 (2002)
39. Karta BHP 41/26. PZWL, Warszawa 1989
40. Bogoczek R., Kociołek-Balawejder E.: *Technologia chemiczna organiczna surowce i półprodukty*. Wyd. Akademii Ekonomicznej, Wrocław 1992, s. 422–423
41. Grzywa E., Molenda J.: *Technologie podstawowych syntez organicznych*. WNT, Warszawa 1987, s. 103–107
42. Ropuszyński S.: *Chemia i technologia podstawowej syntezy organicznej*. PWN, Wrocław 1993, s. 398–404
43. Groggins P.H.: *Procesy jednostkowe w syntezie organicznej*. WNT, Warszawa 1961, s. 509–511
44. OPPT Chemical Fact Sheets (Styrene), EPA nr 749-F-95-019a (1994)
45. Matanoski M., Tao X.: Case-Cohort study of styrene exposure ischemic heart disease. Health Effects Institute. A Partnership of the U.S. Environmental Protection Agency and Industry. Boston, 108 (2002)
46. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR): Toxicological profile for styrene. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service 87 (1992)
47. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR): Toxicological profile for styrene. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service 1–4 (1992)
48. Johanson G, Williams C.C., Ernstgard L., Gullstrand E., Lof A., Osterman-Golkar S., Sumner S.C.J.: C-styrene: Toxicokinetics and urinary metabolites in man. Karolinska Institutet, Medical University, Stoskholm www.imn.ki.se/Division/Poster/styrenoposter.pdf
49. "Information on Styrene Research and Scientific Data", www.thunderx.com/dir/s/Styrene/index.shtml-42k
50. Raport EPA nr ARZOI-1384A, 28 June 2002.
51. „Styrene” Cas registry Number:100-42-5. www.oehha.org/air/chronic_rels/pdf100425.pdf
52. Eliminowanie zapachów w zakładach przemysłu spożywczego, zastosowanie biofiltrów *Mięso i Wędliny*, **8**, 58–61 (1999)
53. Małachowska-Jutsz A., Mrozowska J., Kozielska M., Miksch K.: Aktywność enzymatyczna w glebie skażonej związkami ropopochodnymi w procesie jej detoksykacji. *Biotechnologia*, **1**, 80–91 (1997)
54. Kiepuński J.: Zastosowanie szczepów bakteryjnych w oczyszczaniu ścieków, odpadów i grunty. *Inż. Ekol.* **4**, 89–94 (2001)
55. Łabużek S., Lipka I., Mrozik A.: Rozkład fenolu i cyjanku potasu przez bakterie z rodzaju *Pseudomonas*. *Biotechnologia*, **1**, 28–38 (1992)
56. Mrozik A., Łabużek S.: A Comparison of Biodegradation of phenol and Homologous Compounds by *Pseudomonas vesicularis* and *Staphylococcus sciuri* Strains. *Acta Microbiol. Polon.* **4**, 367–378 (2002)
57. Łabużek S., Lipka I., Mrozik A.: Rozkład fenolu i cyjanku potasu przez bakterie z rodzaju *Pseudomonas*. *Biotechnologia*, **1**, 42–49 (1992)
58. Buitron G., Gonzalez A.: Characterization of the microorganisms from an acclimated activated sludge degrading phenolic compounds. *Water Sci. Technol.* **34**, 289–294 (1996)
59. Lebkowska M.: Stan i perspektywy rozwoju metod badań toksyczności i biodegradacji. *Biotechnologia*, **1**, 141–150 (1992)
60. Barton J.W., Davison B.H., Klasson K.T., Gable C.C.: Estimation of mass transfer and kinetics in operating trickle-bed bioreactors for removal of VOCs. *Environ. Progress*, **18**, 1–5, (1999)
61. Szklarczyk M.: *Ochrona atmosfery*, Wyd. Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, Olsztyn 2001
62. Kempka J.: *Oczyszczanie gazów odlotowych z zanieczyszczeń gazowych, urządzenia i technologie*, Politechnika Wrocławska, Wrocław 1991
63. Koniecznyński J.: *Oczyszczanie gazów odlotowych*, Wyd. Politechniki Śląskiej, Gliwice 1993
64. Reij M. W., Hartmans S.: Membrane bioreactor for waste gas treatment. Materiały konferencji Biologische Abgasreinigung, Berlin-Heidelberg, VDI-Berichte, N° 1104, VDI-Verlag Düsseldorf, s. 517-519 (1994)
65. Kennes, C., Veiga, M.C. Fungal biocatalysts in the biofiltration of VOC-polluted air. *J. Biotech.* **113**, 305–319 (2004)
66. Okamoto, K., Izawa, M., Yanase, H. Isolation and application of a styrene-degrading strain of *Pseudomonas putida* to biofiltration. *J. Biosci. Bioeng.* **95**, 633–636 (2003)
67. Lorenzo, P., Alonso, S., Velasco, A., Díaz, E., García, J.L., Perera, J. Design of catabolic cassettes for styrene biodegradation. *Antonie van Leeuwenhoek, Intern. J. Gen. Molec. Microbiol.* **84**, 17–24 (2003)
68. O'Leary, N.D., O'Connor, K.E., Dobson, A.D.W. Biochemistry, genetics and physiology of microbial styrene degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 403–417 (2002)
69. Namkoong, W., Park, J.-S., VanderGheynst, J.S. Biofiltration of gasoline vapor by compost media. *Environ. Pollut.* **121**, 181–187 (2003)
70. Da Silva, M.L.B., Alvarez, P.J.J. Enhanced anaerobic biodegradation of benzene-toluene-ethylbenzene-xylene- ethanol mixtures in bioaugmented aquifer columns. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 4720–4726 (2004)
71. Prenafeta-Boldú, F.X., Vervoort, J., Grotenhuis, J.T.C., Van Groenestijn, J.W. Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) hydrocarbons by the fungus *Cladophialophora* sp. strain T1. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2660–2665 (2002)
72. Bond J.A. 1989. Review of toxicology of styrene. *CRC Crit Rev. Toxicol.* **19**, 227–249
73. Leibman K.C. 1975. Metabolism and toxicity of styrene. *Environ Health Perspect*, **11**, 115–119.
74. EPA. 1988. Drinking water criteria document for styrene. Final draft Cincinnati, OH: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Health and Environmental Assessment. ECAO-CIN-409.

POSTĘPOWANIE W DIAGNOSTYCE BAKTERYJNYCH ZAKAŻEŃ DOLNYCH DRÓG ODDECHOWYCH

Elżbieta Stefaniuk

Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego,
ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa, tel. (022) 841 33 67, e-mail: estefaniuk@cls.edu.pl

Wpłynęło w styczniu 2006 r.

1. Wstęp. 2. Etiologia zakażeń dolnych dróg oddechowych. 3. Diagnostyka laboratoryjna zakażeń dolnych dróg oddechowych. 3.1. Plwocina. 3.2. Materiały z dolnych dróg oddechowych pobierane z użyciem technik inwazyjnych. 3.3. Mocz. 3.4. Krew.
4. Podsumowanie

Bacteriological diagnostic of lower respiratory tract infections

Abstract: Infections of the lower respiratory tract, including bronchitis and pneumonia, are common causes of morbidity and mortality. The majority of the causative bacterial pathogens of lower respiratory tract infections can be detected on standard laboratory media. Sputum is most commonly used for stains and cultures, and the sample should be transported to the laboratory as soon as possible and processed immediately upon receipt. Gram-stained smears of lower respiratory tract secretions provide rapid presumptive information to guide the initial selection of antimicrobial therapy for patients with acute bacterial pneumonia. Tracheal secretions should be considered comparable to sputum for analysis by stain and culture, with application of the same requirements for minimizing contamination and expediting transport and processing. Quantative bacterial cultures are recommended for specimens obtained by protected specimen brushings (PSB) and bronchoalveolar lavage (BAL). Two approaches for quantative culture are acceptable: the serial-dilution method and the calibrated-loop method. Blood cultures are generally indicated in serious lower respiratory tract infections requiring hospitalization, such as pneumonia. New immunochromatographic urinary antigen detection assays for *Legionella pneumophila* and *Streptococcus pneumoniae* are easy and quick to perform and have relatively high sensitivities and specificities.

1. Introduction. 2. Etiology of lower respiratory tract infections. 3. Laboratory diagnostic of lower respiratory tract infections. 3.1. Sputum. 3.2. Lower respiratory tract specimens collected by invasive techniques. 3.3. Urine. 3.4. Blood. 4. Conclusions

Słowa kluczowe: materiały kliniczne, patogeny, posiew ilościowy i półilościowy, szybkie testy, zakażenia dolnych dróg oddechowych
Key words: clinical specimens, pathogens, semi-quantative and quantative, rapid tests, culture, lower respiratory tract infections

1. Wstęp

Zakażenia dolnych dróg oddechowych (zdodo) stanowią wciąż jedną z najczęstszych przyczyn zachorowalności i śmiertelności zarówno w szpitalu, jak i poza nim, bezpośrednio po chorobach układu krążenia, nowotworach oraz urazach i wypadkach, pomimo postępów w leczeniu przeciwbakteryjnym, diagnostyce zakażeń oraz bardziej skutecznych metod profilaktyki [10, 13, 18, 20]. Wnikanie drobnoustrojów do dolnych dróg oddechowych, może odbywać się: 1) drogą kropelkową, powietrzną, przez inhalację, 2) przez ciągłość, 3) drogą krwipochodną oraz 4) bezpośrednio do tkanek. Materiały kliniczne pobierane od pacjentów w procesie diagnostyczno-terapeutycznym tych zakażeń należą do najtrudniejszych do uzyskania i opracowania w laboratorium mikrobiologicznym pod względem oceny ich przydatności do badań i interpretacji uzyskanych wyników. Wiele argumentów przemawia za diagnostyką zdodo uwzględniającą zasady pobierania materiału do badań przed rozpoczęciem leczenia przeciw-

drobnoustrojowego w celu stwierdzenia obecności bakterii, jak również wiele argumentów przemawia za leczeniem zdodo opartym wyłącznie na ocenie klinicznej i podstawowych badaniach biochemicznych i obrazowych (rtg klatki piersiowej), ale są też takie, które przemawiają za leczeniem na podstawie wyników badań bakteriologicznych z użyciem „półilościowych” i „ilościowych” metod mikrobiologicznych.

2. Etiologia zakażeń dolnych dróg oddechowych

Stany zapalne dolnych dróg oddechowych mogą obejmować tchawicę, oskrzela, oskrzeliki i płuca. Schorzenia te mogą mieć postać ostrych bądź przewlekłych, a ich czynnikami etiologicznymi są przede wszystkim wirusy i bakterie. Z punktu widzenia diagnostycznego bakterie można podzielić na „typowe” i „atypowe”. „Typowe” rosną na standardowych podłożach, wzrost uzyskuje się po 18–24 godz., zakażenia przez nie wywoływane charakteryzują

się odpowiedzią kliniczną na β -laktamy. „Atypowe” bakterie wymagają specjalnych warunków hodowli i długiego czasu inkubacji (wzrost po 5–30 dniach), a w terapii obserwuje się brak w stosunku do nich skuteczności klinicznej β -laktamów. Grzybicze infekcje dróg oddechowych spotyka się rzadko, a największe ryzyko zakażenia dotyczy chorych z obniżoną odpornością [16]. W większości przypadków za pozaszpitalne zddo odpowiedzialne są wirusy oddechowe: grypy, paragrypy, pneumowirus RS, adenowirusy. Czynniki etiologiczne zapaleń płuc omówiono w tabeli I.

Etiologia szpitalnych zapaleń płuc (ang. *hospital-acquired pneumonia* – HAP) zależy od czasu pobytu chorego w szpitalu, specyfiki oddziału, prowadzonych procedur diagnostycznych i terapeutycznych [14]. U około 10% chorych czynniki etiologiczne są takie same jak w pozaszpitalnym zapaleniu płuc, zwłaszcza w pierwszych kilku dniach pobytu w szpitalu. Szpitalne zapalenie płuc może być następstwem zastosowania wspomaganego oddychania [7, 10, 13, 18], powikłaniem wielu schorzeń, które były pierwotnym powodem hospitalizacji i są najczęstszą

Tabela I

Czynniki etiologiczne zakażeń dolnych dróg oddechowych i. postaciach klinicznych zakażeń

Czynnik etiologiczny	Postać zakażenia
	Bakterie „typowe”
<i>S. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i> <i>M. catarrhalis</i> <i>S. aureus</i>	– zapalenie oskrzeli (rzadziej zaostrzenie przewlekłego zapalenia oskrzeli) – typowe zapalenie płuc – ropnie płuc u pacjentów pozaszpitalnych S. aureus – zapalenia płuc, często krwiopochodne, o ciężkim przebiegu; zapalenia płuc w czasie epidemii grypy
Pałeczki <i>Enterobacteriaceae</i> : <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Enterobacter</i> spp.	– szpitalne zapalenie płuc (szczególnie, gdy długi pobyt w szpitalu, a chorzy wentylowani) – <i>K. pneumoniae</i> jest często odpowiedzialna za martwicze płatowe zapalenie płuc zwłaszcza u pacjentów w podeszłym wieku, alkoholików i cukrzyków – ropnie płuc u pacjentów szpitalnych
Pałeczki niefermentujące: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Burkholderia cepacia</i>	– zapalenie płuc (OIOM, chorzy wentylowani, intubowani) – zaostrzenie przewlekłego zapalenia oskrzeli – w przypadku mukowiscydozy – <i>P. aeruginosa</i> i <i>B. cepacia</i> , także w połączeniu z <i>S. aureus</i>
	Bakterie „atypowe”
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i> <i>Legionella pneumophila</i>	– zapalenie oskrzeli – atypowe zapalenie płuc (śródmiażdżowe zapalenie płuc) Źródłem <i>L. pneumophila</i> zazwyczaj są zbiorniki wodne, a drobnoustroje dostają się do drzewa oskrzelowego drogą aerozolu
	Mikroflora beztlenowa
ziarenkowce: <i>Peptococcus</i> <i>Peptostreptococcus</i> pałeczki Gram-ujemne: <i>Fusobacterium</i> spp. <i>Prevotella melaninogenica</i> <i>Bacteroides ureolyticus</i>	– zakażenia przewlekłe – zachyłkowe zapalenie płuc szpitalne i pozaszpitalne – zapalenia płuc u chorych po operacjach jamy brzusznej (często są to zakażenia mieszane: flora beztlenowa z florą tlenową)
	Inne
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex	– gruźlica
<i>Mycobacterium</i> grupa MOTT	– mykobakteriozy
<i>Listeria monocytogenes</i>	– listerioza
<i>Nocardia asteroides</i>	– nokardioza
<i>Actinomyces israelii</i>	– promienica
	Wirusy
wirus grypy wirus paragrypy adenowirusy pneumowirus RS rhinowirusy	– ostre zapalenie oskrzeli – zaostrzenie przewlekłego zapalenia oskrzeli (przewlekła obturacyjna choroba płuc) – zapalenie płuc
	Grzyby
<i>Aspergillus</i> spp. <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Coccidioides immitis</i> <i>Blastomyces</i> spp. <i>Pneumocystis jirovecii</i> (dawniej <i>P. carinii</i>)	– szpitalne zapalenie płuc (głównie chorzy z wrodzonym lub nabytym niedoborem układu odpornościowego)

Tabela II

Postacie kliniczne zakażeń dolnych dróg oddechowych i. materiały kliniczne służące do diagnostyki tych zakażeń

Rodzaj zakażenia	Materiały kliniczne
Ostre zapalenie oskrzeli	– badanie popłuczyn gardła w kierunku wirusów, jeśli to konieczne
Przewlekłe zapalenie oskrzeli	– płwocina, jeśli jest odkrztuszana – aspirat z oskrzeli
Zapalenie płuc wywołane przez drobnoustroje „typowe”	– płwocina (zwykle odkrztuszana jest w dużej ilości, charakter ropny, czasami z domieszką krwi) – krew – mocz (przy podejrzeniu zakażenia <i>S. pneumoniae</i>)
Zapalenie płuc wywołane przez drobnoustroje „atypowe”	– płwocina (jeśli jest odkrztuszana, to w małej ilości, nie ma charakteru ropnego, jest klarowna) – surowica krwi do badań serologicznych – oznaczanie poziomu przeciwciał, wykrywanie „zimnych aglutynin” w zakażeniu <i>M. pneumoniae</i> – mocz (przy podejrzeniu zakażenia <i>L. pneumophila</i>) – oznaczanie specyficznych fragmentów DNA w materiale klinicznym
Zachłystowe zapalenie płuc Ropnie płuc Zgorzelińskie zapalenie płuc	– aspiraty i bioptaty płuc (diagnostyka także w kierunku bakterii beztlenowych) – krew
Swoiste zakażenia dróg oddechowych – popłuczyny oskrzelowe	– płwocina

przyczyną zgonów. Zapalenia płuc wywołane przez bakterie beztlenowe zdarzają się u chorych z ograniczoną świadomością, ze skłonnością do zachłyśnięć lub nieprawidłowo żywionych dojelitowo [6]; etiologia takich zapaleń płuc jest najczęściej mieszana. W tabeli I przedstawiono najczęstsze czynniki etiologiczne zakażeń dolnych dróg oddechowych z uwzględnieniem postaci klinicznych zakażeń.

3. Diagnostyka laboratoryjna zakażeń dolnych dróg oddechowych

Badania bakteriologiczne, rzadko są wykonywane w warunkach ambulatoryjnych, natomiast są rekomendowane u chorego leczonego w szpitalu, z zapaleniem płuc, czy ciężkimi zaostrezeniami POChP (przewlekłej obturacyjnej choroby płuc). Różnorodność materiałów klinicznych i technik wykorzystywanych do ich pozyskiwania, wymaga standaryzacji zarówno procedur przedlaboratoryjnego etapu diagnostyki zddo, jak i postępowania w laboratorium mikrobiologicznym. Materiał pochodzący z dróg oddechowych może być opracowywany z wykorzystaniem szeregu różnych metod diagnostycznych, włączając metody cytologiczne i histopatologiczne, bezpośrednie preparaty mikroskopowe barwione różnymi technikami w zależności od kierunku diagnostyki, posiewy materiału klinicznego na rutynowo stosowane bądź specjalne podłoża mikrobiologiczne (bakteryjne, grzybowe), wykrywanie antygenów testami immunofluorescencji czy też immunoenzymatycznymi (ELISA) lub metody biologii molekularnej, oparte w szczególności na reakcji PCR. Laboratorium mikrobiologiczne ma obowiązek przygotować procedury pobierania materiału klinicznego od chorego łącznie ze sposobem przygotowania pacjenta, jeśli ma to znaczenie, procedury dotyczące zabezpieczenia i transportu materiału do laboratorium. Wszystkie materiały diagnostyczne do badań mikrobiologicznych z użyciem technik hodowlanych należy pobierać we wczesnym okresie choroby, przed podaniem choremu antybiotyków lub 3–4 dni po ich odstawieniu, natomiast techniki oparte na wykrywaniu specyficznych fragmentów DNA mogą być pomocne w wykryciu czynnika etiologicznego nawet po włączeniu leczenia przeciwbakteryjnego.

W celu ustalenia etiologii zakażeń dolnych dróg oddechowych prowadzi się diagnostykę mikrobiologiczną różnych materiałów klinicznych: płwociny, materiałów z dolnych dróg oddechowych pobieranych z wykorzystaniem technik inwazyjnych (m.in. aspiraty tchawicze i przetchawicze, materiały bronchoskopowe), krwi na posiew, pełnej krwi i surowicy w celu wykrywania antygenów i DNA drobnoustrojów, moczu (wykrywanie antygenów *L. pneumophila*, *S. pneumoniae*). Ze względu na znaczną inwazyjność, a przede wszystkim wywołany u pacjenta dyskomfort, aspiraty przetchawicze nie są powszechnie stosowane.

Różne rodzaje zakażeń ddo wymagają badania różnych materiałów (Tabela II). Wybór metody zależy od możliwości danej placówki klinicznej oraz laboratorium mikrobiologicznego.

Tabela III przedstawia sposoby pobierania, warunki transportu do laboratorium mikrobiologicznego i zakres diagnostyki materiałów klinicznych mających znaczenie w diagnostyce zddo [15].

3.1. Płwocina

Płwocina uważana jest za najtrudniejszy do diagnostyki mikrobiologicznej materiał. Obok potencjalnych czynników etiologicznych zakażenia zawiera szereg drobnoustrojów fizjologicznie zasiedlających jamę ustną. Rzetelne dane dotyczące pacjenta i stały kontakt lekarza zlecającego badanie z laboratorium mikrobiologicznym mają istotne znaczenie dla oceny wstępnej i dalszej diagnostyki płwociny. Diagnostykę płwociny rozpoczyna się od oceny jakościowej materiału (ilość, barwa, konsystencja) oraz oceny mikroskopowej preparatu, barwionego metodą Grama, decydującej o dalszej diagnostyce i jej ukierunkowaniu. Sposób oceny preparatu bezpośredniego płwociny barwionego metodą Grama jest odmienny od oceny innych preparatów mikroskopowych w laboratorium mikrobiologicznym i zasługuje na omówienie.

Ocenę preparatu bezpośredniego płwociny prowadzi się na podstawie 10 kolejnych pól widzenia i obejmuje ona:

1. określenie liczby komórek nabłonkowych w polu widzenia (w powiększeniu 100-krotnym),
2. określenie liczby leukocytów w polu widzenia (w powiększeniu 100-krotnym),

Tabela III

Sposoby pobierania, warunki transportu i zakres diagnostyki materiałów klinicznych mających znaczenie w diagnostyce zakażeń dolnych dróg oddechowych

Rodzaj materiału	Sposób pobrania	Warunki transportu	Sugerowany zakres diagnostyki
Plwocina	Pojemnik jałowy	do 2 godz. w temp. pokojowej; 2–24 godz. w temp. 4°C	Zakażenia typową tlenową florą bakteryjną, zakażenia grzybicze
Aspiraty tchawicze	Pojemnik jałowy lub strzykawka aspiracyjna	do 2 godz. w temp. pokojowej; 2–24 godz. w temp. 4°C	zakażenia o etiologii beztlenowcowej, chorych z zaburzeniami odporności oraz ropniami płuc. Metoda ta nie może być stosowana u wszystkich chorych, zwłaszcza nie można jej stosować u chorych z krwiopluciem oraz z zaburzeniami układu krzepnięcia
Posiewy krwi	Butelki do hodowli krwi	temp. pokojowa	Zakażenia bakteryjne, grzybicze
Mocz	Pojemnik (nie musi być jałowy)	24 godz. w temp. pokojowej	Diagnostyka zakażeń <i>S. pneumoniae</i> i <i>L. pneumophila</i> (serogrupa I). Szybki test diagnostyczny, wykrywanie antygenów w moczu
Surowica	Probówka	24 godz. w temp. pokojowej	Oznaczanie poziomu przeciwciał (głównie diagnostyka zakażeń bakteriami „atypowymi”, grzybicze i wirusowe)
Popłuczyny oskrzelowe – BW	Pojemnik jałowy lub strzykawka	do 2 godz. w temp. pokojowej*; 2–24 godz. w temp. 4°C	Selektywne podłoża bakteriologiczne i techniki barwienia preparatów mikroskopowych: prątki, grzyby; Testy immunofluorescencji w kierunku <i>L. pneumophila</i> i <i>P. jirovecii</i>
Szczoteczki oskrzelowe	Pojemnik jałowy lub strzykawka z kilkoma ml jałowej soli fizjologicznej (jeśli zachodzi konieczność badań cytologicznych, dodać środek utrwalający)	do 2 godz. w temp. pokojowej*; 2–24 godz. w temp. 4°C (cytologia, środek utrwalający – warunki nieokreślone)	Przydatna tylko w bakteryjnym zapaleniu płuc Posiew ilościowy i preparat mikroskopowy
Biopsja szczoteczkowa – PSB	Jałowa strzykawka z 1 ml soli fizjologicznej	do 2 godz. w temp. pokojowej*; 2–24 godz. w temp. 4°C	Przydatna tylko w bakteryjnym zapaleniu płuc Posiew ilościowy i preparat mikroskopowy
Płukanie oskrzelikowo-pęcherzykowe – BAL	Pojemnik jałowy lub strzykawka	do 2 godz. w temp. pokojowej*; 2–24 godz. w temp. 4°C	Przydatne do wszystkich testów w kierunku drobnoustrojów oportunistycznych oraz u pacjentów z respiratorowym zapaleniem płuc. Posiew ilościowy; preparat i posiew w kierunku <i>Mycobacterium</i> spp. i grzybów; Testy immunofluorescencji i hodowla w kierunku wirusów; Testy immunofluorescencji w kierunku <i>P. jirovecii</i> ; Testy immunofluorescencji i hodowla w kierunku <i>L. pneumophila</i>
Biopsja przezoskrzelowa TBB	Pojemnik jałowy z wilgotną gazą na dnie (jeśli zachodzi konieczność badań histologicznych, dodać formalinę)	do 2 godz. w temp. pokojowej*; 2–24 godz. w temp. 4°C (histologia, formalina – warunki nieokreślone)	Przydatne do diagnostyki procesów rozrostowych, tkanek sarkoidalnych. Ograniczona rola w zapaleniu płuc Badania histopatologiczne w diagnostyce nowotworów, chorób nieinfekcyjnych; pomocne w diagnostyce <i>Pneumocystis</i> i <i>M. tuberculosis</i>

* temperatura pokojowa – 15–25°C

3. ocenę półilościową liczby komórek bakteryjnych i ich morfologii (w powiększeniu 1000-krotnym).

Plwocina zawierająca >25 leukocytów i <10 komórek nabłonkowych w polu widzenia powinna zostać zakwalifikowana do dalszego badania mikrobiologicznego [15].

Ocenę półilościową liczby komórek bakteryjnych poszczególnych grup drobnoustrojów (pałeczki Gram-ujemne, ziarenkowce Gram-dodatnie) przedstawiono w tabeli IV.

Ocena liczby i morfologii bakterii w preparacie bezpośrednim pomocna jest w określeniu dominującego czynnika etiologicznego. Należy zwrócić uwagę na obecność drobnoustrojów wewnątrzkomórkowych, obecność flory grzybiczej oraz obecność obfitej flory mieszanej, wskazującą na florę jamy ustnej. Również, jeśli stosunek liczby komórek nabłonkowych do liczby leukocytów wielojądrzastych wynosi około 1:1, należy podejrzewać, że jest to przede wszystkim próbka śliny. Materiał należy

Tabela IV
Kryteria oceny półilościowej liczby komórek bakteryjnych w preparacie bezpośrednim płwociny

Ocena punktowa	Liczba komórek bakteryjnych w polu widzenia*
(+)	1 komórka bakteryjna co kilka pól widzenia
(++)	do 10 komórek bakteryjnych co kilka pól widzenia
(+++)	do 10 komórek bakteryjnych w każdym polu widzenia
(++++)	powyżej 10 komórek bakteryjnych w każdym polu widzenia

* – ocena dotyczy osobno każdego rodzaju komórek (np. ziarenkowce Gram-dodatnie lub Gram-ujemne, pałeczki Gram-ujemne, itp.)

Tabela V
Kryteria oceny półilościowej liczby kolonii bakteryjnych danego typu wyrosłych na podłożach agarowych

Ocena punktowa	Ocena opisowa	Charakter wzrostu
(+)	wzrost skąpy	wzrost tylko w pierwszej ćwiartce płytki
(++)	wzrost umiarkowany	wzrost w pierwszej i drugiej ćwiartce płytki
(+++)	Wzrost obfity	wzrost w pierwszej, drugiej i trzeciej ćwiartce płytki
(++++)		wzrost na całej powierzchni podłoża

bezwzględnie opracować również wtedy, gdy w preparacie nieobecne są komórki nabłonkowe przy obecności małej liczby krwinek białych, bądź też, jeśli w preparacie nie stwierdza się występowania żadnych komórek (tzw. pusty preparat). Należy odnotować występowanie w badanym materiale dużej ilości śluzu. Materiał, w którego preparacie bezpośrednim, barwionym metoda Grama, widoczne są cienkie, rozgałęziające się, filamentacyjne laseczki, nieregularnie wybarwione, może zawierać szczepy *Nocardia* spp., których hodowla wymaga specyficznych podłoży i warunków wzrostu.

Opracowanie mikrobiologiczne płwociny. Zakwalifikowaną jako przydatną do dalszego badania płwocinę, w razie potrzeby, należy poddać upłynnieniu. W tym celu dodać do naczynia z płwociną 2–5 kropli (w zależności od ilości i gęstości płwociny) preparatu mukolitycznego, delikatnie wymieszać. Płwocinę należy posiać (posiew redukcyjny, na całej powierzchni podłoża agarowego) na szereg podłoży bakteriologicznych: podłoże agarowe Columbia z 5% krwią baranią, podłoże czekoladowe z bacytracyną, podłoże agarowe McConkey'a, EMB lub Levine'a, podłoże Sabouraud w przypadku podejrzenia zakażenia grzybiczego, pozwalających uzyskać wzrost wszystkich drobnoustrojów biorących udział w patogenie zddo, które następnie inkubuje się w określonym czasie oraz w odpowiednich warunkach temperaturowych i atmosferycznych. Płwocinę pochodzącą od pacjentów z mukowiscydozą, w celu szybkiej izolacji i identyfikacji czynnika etiologicznego, należy posiać na podłoże wybiórcze lub różnicująco-wybiórcze: dla pałeczek *Pseudomonas* – podłoże agarowe z cetrimidem, dla pałeczek *Burkholderia cepacia* – podłoże dla *B. cepacia*, zawierające poza składnikami odżywczymi, sole żółci, barwniki – fiolet krystaliczny i czerwien fenolową oraz antybiotyki – polimyksynę B, gentamicynę i tikarcylinę. Należy pamiętać, że płwocina nie służy do diagnostyki zakażeń o etiologii flory beztlenowej. Po zakończeniu etapu inkubacji, należy określić liczbę i typ wyrosłych kolonii. Liczbę kolonii danego typu ocenia się w sposób półilościowy (Tabela V):

W przypadku uzyskania hodowli jednego typu kolonii, fakt ten należy zanotować. Kolonie spełniające kryterium „dominującego wzrostu” należy wyizolować, a następnie po uzyskaniu czystej, homogennej hodowli, należy dokonać identyfikacji

drobnoustroju. Przeglądu płytek z hodowlą należy dokonywać zawsze w oparciu o wynik oceny preparatu bezpośredniego płwociny. Identyfikowany czynnik etiologiczny powinien odpowiadać dominującej florze opisanej w preparacie mikroskopowym barwionym metodą Grama.

Jeśli drobnoustroj identyfikowany jako potencjalny czynnik etiologiczny w hodowli, nie jest drobnoustrojem dominującym w preparacie mikroskopowym, należy go opracowywać tylko wtedy, gdy stanowi on dominantę w hodowli. Jeśli w hodowli obecne są więcej niż trzy drobnoustroje, mogące pełnić rolę czynników etiologicznych zddo, należy hodowlę opisać jako mieszaną hodowlę wielu drobnoustrojów. W przypadku, gdy więcej niż jeden drobnoustroj w hodowli spełnia kryterium dominującego w preparacie mikroskopowym (np. w preparacie – Gram-ujemne pałeczki, w hodowli wzrost *E. coli* i *K. pneumoniae*), oba organizmy należy identyfikować i poddać ocenie lekowrażliwości. Grzybów występujących w postaci czystej lub dominującej kultury, nie należy identyfikować bez wcześniejszej konsultacji z lekarzem prowadzącym, ale należy mieć na uwadze fakt, że czysta lub dominująca hodowla grzybów może mieć znaczenie kliniczne. Zalecane jest dwukrotne wykonanie mikrobiologicznego badania płwociny przy podejrzeniu zakażenia grzybiczego ddo.

3.2. Materiały z dolnych dróg oddechowych pobierane z użyciem technik inwazyjnych

Do potwierdzenia lub wykluczenia zapalenia płuc oraz ustalenia czynnika etiologicznego zalecane jest użycie jednej z trzech rekomendowanych przez American Thoracic Society [3] metod pobierania materiału: aspirat z tchawicy, BAL (bronchoalveolar lavage – płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe) i PBS (protective specimen brush – biopsja szczoteczkowa).

3.3.1. Ocena półilościowa

Materiały pobrane metodą inwazyjnymi można **opracować półilościowo**, zgodnie z procedurą obowiązującą dla płwociny, z modyfikacją polegającą na dołączeniu odpowiedniego podłoża bulionowego (z tioglikolanem sodu, podłoża Schaedlera, itp.).

Roztwór materiału uwolnionego ze szczoteczek posiać na szereg podłoży bakteriologicznych: podłoże bulionowe z tioglikolanem sodu. Wydzielinę pobraną drogą płukania oskrzelikowo-pęcherzykowego wirować przy 3750 obr/min. w czasie 20 min., a następnie usunąć supernatant. Osad poddać intensywnemu wytrząsaniu, po czym posiać na szereg podłoży bakteriologicznych: podłoże agarowe Columbia z 5% krwią baranią, podłoże czekoladowe, podłoże agarowe McConkey'a, podłoże bulionowe z tioglikolanem sodu. Istotna jest również ocena preparatu bezpośredniego z materiału, wykonanego przed odwirowaniem, pod kątem obecności komórek nabłonkowych, których ilość powyżej 1% może świadczyć o kontaminacji materiału wydzieliną z nosogardzieli. Barwienie leukocytów wielojądrowych i makrofagów metodą Grama i dokładna ocena wyglądu wszystkich stwierdzonych bakterii poprawia skuteczność diagnostyczną, pod warunkiem, że jednocześnie ocenia się wyniki posiewów.

Materiał pobrany drogą aspiracji przez tchawicę jest najlepszy do posiewu w każdym kierunku, czyli bakterii tlenowych, mikroaerofilnych i beztlenowych i należy ten fakt uwzględnić w doborze podłoży bakteriologicznych oraz ustalania warunków wzrostu. W posiewach aspiratu z tchawicy zawsze się stwierdza większą liczbę drobnoustrojów niż w ilościowych posiewach materiału pobranego metodami inwazyjnymi. Laboratoria podają wyniki w różny sposób; określają wzrost półilościowo za pomocą „+”, podają wyniki, opisując wzrost jako skąpy, umiarkowany lub obfity, (patrz: ocena wzrostu posiewu płwociny), bądź w sposób opisowy zgodnie ze schematem podanym poniżej w tabeli VI [2].

3.2.2. Posiew ilościowy materiału pobranego metodą biopsji szczoteczkowej (PSB) i płukania oskrzelikowo-pęcherzykowego (BAL)

W celu zapewnienia prawidłowej diagnostyki, szczoteczki oskrzelowe należy umieścić w 1 ml jałowej soli fizjologicznej lub w 1 ml BHI, a wydzielinę pobraną drogą płukania oskrzelikowo-pęcherzykowego (BAL) w ilości 1ml, a następnie postępować zgodnie z poniższymi wytycznymi [3, 4, 11].

Wyposażenie niezbędne do wykonania badania:

- i. z użyciem pipety kalibrowanej: pipeta 100 µl z jałowymi końcówkami, dwie probówki zawierające 5 ml jałowej soli fizjologicznej bądź odpowiedniego podłoża bulionowego
- ii. z użyciem miarowych ezy: eza 0,001 ml (1 µl) oraz 0,01 ml (10 µl)

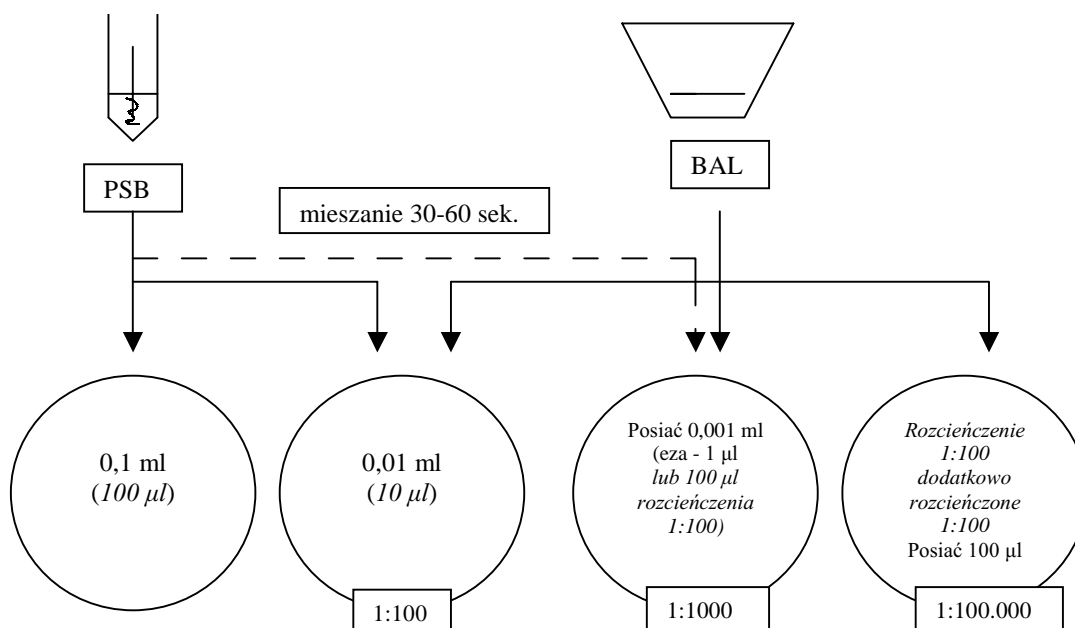
- iii. płytki Petriego z podłożem agarowym (podłoże agarowe Columbia z 5% krwią baranią, podłoże czekoladowe (bez bacytracyny), podłoże agarowe McConkey'a)
- iv. ciepłarka temp. 35°C – warunki inkubacji – tlenowe oraz 5% CO₂

1. Pobrany materiał energicznie wymieszać (wytrząsanie) w czasie 30–60 sek.
2. Wykonanie posiewów na podłoża agarowe zgodnie z rys. 1. metodą z użyciem miarowej pipety lub metoda z użyciem ezy miarowej.
3. Metoda z użyciem miarowej pipety
 - a. Nanieść 100 µl materiału pobranego metodą PSB na każdą płytkę podpisaną „x 10” („rozcieńczenie 10-krotne). Każdą wyrosłą kolonię z tego rozcieńczenia traktujemy jako 10 CFU/ml.
 - b. Nanieść 10 µl materiału pobranego metodą PSB lub BAL na każdą płytkę podpisaną „x 100” („rozcieńczenie 100-krotne). Każdą wyrosłą kolonię z tego rozcieńczenia traktujemy jako 100 CFU/ml.
 - c. Dla obu materiałów (pobranym metodą BAL i PBS) należy wykonać:
 - i. Podpisać jedną z przygotowanych jałowych probówek z 5 ml soli fizjologicznej „1:100”;
 - ii. Przenieść 50 µl nierozcieńczonego materiału do probówki podpisanej „1:100”. Energicznie wytrząsać;
 - iii. Nanieść 100 µl rozcieńczenia „1:100” na każdą płytkę podpisaną „x 10³”. Każdą wyrosłą kolonię na tej płytce traktujemy jako 10³ CFU/ml;
 - d. Tylko dla wydzieliny uzyskanej metodą BAL należy wykonać:
 - i. Drugą z przygotowanych jałowych probówek z bulionem podpisać „1:10.000”;
 - ii. Przenieść 50 µl wcześniej przygotowanego rozcieńczenia „1:100” (pkt. 5.c.ii.) do probówki podpisanej „1:10.000”. Energicznie wytrząsać;
 - iii. Nanieść 100 µl rozcieńczenia „1:10.000” na każdą płytkę podpisaną „x 10⁵”. Każdą wyrosłą kolonię na tej płytce traktujemy jako 10⁵ CFU/ml.
 - e. Naniesiony na podłoża agarowe materiał rozprowadzić po całej powierzchni podłoża przy pomocy jałowej bagietki szklanej (tzw. głaszczki), bądź przy pomocy jałowej ezy.
4. Metoda z użyciem ezy miarowej:
 - a. Wydzielina pobrana metodą PSB:
 - i. Wytrząsać przez 30–60 sek.;

Tabela VI

Ocena półilościowa wzrostu drobnoustrojów z materiału pobranego metodą biopsji szczoteczkowej (PSB) i płukania oskrzelikowo-pęcherzykowego (BAL) na podłożach mikrobiologicznych

Opisowa ocena półilościowa	Liczba wyrosłych kolonii
Brak wzrostu drobnoustrojów	brak wzrostu drobnoustrojów na podłożach stałych i w podłożu bulionowym
Pojedyncze kolonie	wzrost 1–2 kolonii na płytce z podłożem stałym
Nieliczne kolonie	wzrost 3–10 kolonii na płytce z podłożem
Liczne kolonie	wzrost powyżej 10 kolonii na płytce, gdy są one obecne w I-szym kwadrancie podłoża
Wzrost obfity	wzrost kolonii bakteryjnych w I-szym i II-gim kwadrancie podłoża
Obecność drobnoustroju tylko w preparacie mikroskopowym wykonanym z bulionu – barwienie metodą Grama wzrostu w bulionie	drobnoustroje widoczne w preparacie mikroskopowym przy równoczesnym braku
Drobnoustroj izolowany tylko z hodowli na podłożu płynnym	brak wzrostu drobnoustrojów na podłożach stałych



Rys. 1. Metoda posiewu ilościowego. Stężenia zaznaczone kursywą
BAL – płukanie oskrzelikowo-pęcherzykowe; PSB – biopsja szczoteczkowa

- ii. Nanieść 100 µl materiału na każdą płytkę podpisaną „x 10” („rozcieńczenie 10-krotne). Każdą wyrosłą kolonię z tego rozcieńczenia traktujemy jako 10 CFU/ml;
- iii. Używając ezy 1:100 nanieść 10 µl na każdą płytkę podpisaną „x 100” („rozcieńczenie 100-krotne). Każdą wyrosłą kolonię z tego rozcieńczenia traktujemy jako 100 CFU/ml;
- b. Wydzielina pobrana metodą BAL:
 - i. Wytrząsac przez 30–60 sek.;
 - ii. Używając ezy 1:100 nanieść 10 µl na każdą płytkę podpisaną „x 100” („rozcieńczenie 100-krotne). Każdą wyrosłą kolonię z tego rozcieńczenia traktujemy jako 100 CFU/ml;
 - iii. Używając ezy 1:1.000 nanieść 1 µl na każdą płytkę podpisaną „x 1.000” („rozcieńczenie 100-krotne). Każdą wyrosłą kolonię z tego rozcieńczenia traktujemy jako 1.000 CFU/ml;
- c. Naniesiony na podłoża agarowe materiał rozprowadzić po całej powierzchni podłoża przy pomocy jałowej bagietki szklanej (tzw. głaszczki), bądź przy pomocy jałowej ezy.
5. Podłoża należy inkubować z zachowaniem odpowiednich warunków: podłoża McConkey’a – warunki tlenowe, temp. 35–37°C, 18–24 godz.; podłoża Columbia agar z 5% krwi baraniej i podłoża czekoladowe – 24–48 godz., temp. 35–37°C, 5–10% CO₂.
6. Bezpośredni preparat mikroskopowy z wydzieliny BAL należy wykonać po uprzednim odwirowaniu materiału. Wydzielinę pobraną drogą płukania oskrzelikowo-pęcherzykowego wirować przy 3750 obr/min. w czasie 20 min., a następnie usunąć supernatant. Osad służy także do hodowli wirusów, mykobakterii, *Legionella* spp., grzybów oraz preparatu w kierunku grzybów, wirusów, *Pneumocystis jirovecii*.
7. Ocena ilościowa wzrostu drobnoustrojów na podłożach. Obliczamy liczbę kolonii bakteryjnych wyrosłych z danego rozcieńczenia, uwzględniając każdorazowo współczynnik rozcieńczenia. (np. wzrost 40 kolonii na płytce podpisanej „x 1.000” oznacza miano: 40×10^3 /ml lub 4×10^4 /ml.
8. Każdy rodzaj kolonii pod względem morfologii, należy liczyć indywidualnie.

9. Jeśli liczba kolonii na płytce jest niepoliczalna, miano wyrosłych kolonii oznaczamy jako wyższe od najwyższego rozcieńczenia.
10. W przypadku wydzieliny z BAL, liczbę wyrosłych kolonii mniejszą niż 10⁴ należy traktować jako kolonizację.
11. W przypadku wydzieliny z PSB, liczbę wyrosłych kolonii mniejszą niż 10³ należy traktować jako kolonizację.

Drobnoustroje uznane za czynnik etiologiczny zakażenia zawsze należy identyfikować do poziomu gatunku, a następnie oznaczyć lekowrażliwość z uwzględnieniem wykrytych mechanizmów oporności, wykorzystując różne metody dostępne w laboratoriach [17]. Oznaczenia te należy wykonywać w oparciu o lokalne procedury, zgodne z zaleceniami Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów [9].

Interpretacja oceny ilościowej. Do rozpoznania HAP i ustalenia czynnika etiologicznego konieczne jest stwierdzenie wzrostu przekraczającego określoną wartość progową różną dla poszczególnych metod. Jest to istotne, ponieważ zapobiega to nadmiernemu i niepotrzebnemu stosowaniu antybiotyków. Zakłada się, że mniejszy wzrost jest spowodowany kolonizacją lub zanieczyszczeniem. Wykazano przydatność posiewów ilościowych do potwierdzenia zapalenia płuc, zwłaszcza u chorych z małym lub trudnym do oszacowania klinicznym podejrzeniem zakażenia [1,8]. BAL jest metodą pobierania materiału używaną w diagnostyce szpitalnych zapaleń płuc od 1988 roku, jednak w dalszy ciągu nie ma zadowalającej standaryzacji. Odmiennosć w wielkości używanych bronchoskopów, nierównomierny rozkład ognisk zapalnych w płucach oraz brak precyzyjnych zaleceń mówiących o objętości używanej do płukania powodują, że wartość diagnostyczna uzyskanego materiału jest niejednolita zwłaszcza, jeżeli ma służyć ocenie ilościowej. W badaniach BAL za próg diagnostyczny przyjmuje się wartość 10⁴–10⁵ kolonii/ml. Czulość tej metody wynosi 73±18%, a swoistość średnio 82±19% [19]. W dużej meta-analizie oceniającej walidację metod bronchoskopowych stwierdzono, że punkt odcięcia na poziomie 10⁴ kolonii/ml w ocenie ilościowej BAL-u jest prawdziwy i koreluje z objawami klinicznymi pod warunkiem użycia do

płukania oskrzelowo pęcherzykowego objętości ≥ 140 ml soli fizjologicznej. Jeżeli ze względu na stan chorego nie jest to możliwe, zaleca się pobranie aspiratu z tchawicy lub PBS.

Próg diagnostyczny w ilościowych posiewach próbek materiału pobranego za pomocą PSB wynosi $\geq 10^3$ kolonii/ml. Jakość takiego materiału jest trudna do oceny, a powtarzalność nie jest doskonała – w porównaniu dwóch próbek pobranych w tym samym ośrodku u tego samego chorego nawet 25% wypada po innej stronie progu diagnostycznego niż w poprzednim badaniu. Swoistość PSB w wykrywaniu zapalenia płuc (średnio $90 \pm 15\%$) jest większa niż czułość (średnio $66 \pm 19\%$), a dodatni wynik badania zwiększa prawdopodobieństwo istnienia zapalenia płuc [12].

Aspirat z tchawicy jest wartościowym materiałem, łatwym do pobrania przy łóżku chorego i nieobciążającym pacjenta ze znaczną niewydolnością oddechową. Zaleca się podanie od 5–20 ml soli fizjologicznej, a następnie odessanie ok. 1 ml wydzieliny (nie mniej). Próg diagnostyczny dla tej metody wynosi $\geq 10^6$ kolonii/ml, czułość metody $76 \pm 9\%$, swoistość $75 \pm 28\%$.

Próg diagnostyczny służący do odróżnienia zakażenia od kolonizacji różni się w zależności od zastosowanej metody i niekiedy również od klinicznego prawdopodobieństwa zakażenia. U chorych, u których zmodyfikowano antybiotykoterapię, i u chorych z wysokim klinicznym prawdopodobieństwem zakażenia, próg diagnostyczny można obniżyć.

W czasie badania bronchoskopowego istnieje możliwość makroskopowej oceny krtani, tchawicy i drzewa oskrzelowego: stanu błony śluzowej oskrzeli z uwzględnieniem stopnia jej zaczerwienienia, występowania obrzęku oraz obecności wydzieliny. W tym celu używa się giętkiej rurki (bronchoskopu) z układem optycznym na końcu. Na końcu bronchoskopu zamontowane jest źródło światła, które umożliwi lekarzowi oglądać większe drogi oddechowe (oskrzela). Bronchoskopia umożliwia lekarzowi postawienie diagnozy i leczenie niektórych schorzeń. Giętki bronchoskop może być zastosowany w celu usunięcia wydzieliny, krwi, ropy oraz ciała obcych, do podawania leków bezpośrednio do oskrzeli i do określania miejsca krwawienia. U pacjentów nieintubowanych bronchoskop może być wprowadzany poprzez jamę ustną lub nos. U pacjentów ze wspomaganym oddychaniem, bronchoskop należy wprowadzić przez rurę intubacyjną. Wskazaniem do badania objęci są chorzy z ropniem płuca i z rozstrzeniami oskrzeli. Podczas drenażu ropnia bronchoskopem może dojść do nagłego udrożnienia zwężonego oskrzela i zalania treścią ropną całego drzewa oskrzelowego. W przypadku chorych z rozstrzeniami oskrzeli, bronchoskopia jest nie tylko zabiegiem diagnostycznym, ale także terapeutycznym. Pomimo wypierania bronchoskopii z diagnostyki rozstrzeni oskrzeli przez tomografię komputerową wysokiej rozdzielczości (HRCT), bronchoskopia jest jedynym badaniem pozwalającym na pobranie materiału klinicznego do diagnostyki mikrobiologicznej i jednocześnie usuwanie nadmiernej ilości zalegającej w dno wydzieliny. Pacjent przynajmniej 4 godziny przed badaniem nie powinien jeść ani pić. Po bronchoskopii powinien pozostać pod obserwacją przez kilka godzin. Jeśli badanie objęło biopsję tkanki płucnej, po badaniu należy wykonać prześwietlenie klatki piersiowej, celem wykluczenia ewentualnych powikłań.

Płukanie oskrzelikowo-pęcherzykowe jest badaniem, dzięki któremu lekarz może uzyskać materiał do badania z drobnych dróg oddechowych. Po wprowadzeniu bronchoskopu do małego oskrzela, do kanału biopsyjnego bronchoskopu należy wstrzyknąć odpowiednią ilość jałowego 0,85% roztworu chlorku sodu, a następnie ostrożnie odessać płyn do przygotowanego wcześniej jałowego pojemnika. Przestrzeganie zasad pobierania próbek materiału do badania, pozwoli uzyskać wzrost flory mikroaerofilnej i beztlenowej, często występującej w ropniach bakteryjnej.

Przezoskrzelowa biopsja płuca (TBB) pozwala na uzyskanie tkanki płucnej przez ścianę oskrzela w przebiegu śródmiąższo-

wych chorób płuc. Tkanę płucną podejrzanego obszaru pobiera się przy pomocy instrumentu biopsyjnego wsuwanego przez kanał bronchoskopu. Chociaż przezoskrzelowa biopsja płuca niesie ze sobą ryzyko powikłań, często dostarcza dodatkowych informacji diagnostycznych i pozwala na uniknięcie większej operacji chirurgicznej. Wykazanie w materiale obecności komórek zapalnych, głównie granulocytów obojętnochłonnych, jednoznacznie przemawia za toczącym się procesem zapalnym. Przeciwwskazaniem do przezoskrzelowej biopsji płuca jest nadciśnienie płucne, rozedma płuc, pęcherze rozedmowe, podejrzenie wad naczyniowych w płucach oraz niewydolność nerek.

3.3. Mocz

Na rynku polskim dostępne są szybkie, immunochromatyczne testy diagnostyczne, pozwalające wykryć w moczu pacjenta antygeny *Streptococcus pneumoniae* i *Legionella pneumophila* serogrupy 1: Binax NOW® *Streptococcus pneumoniae* Antigen Test oraz Binax NOW® *Legionella* Urinary Antigen Test (Binax, INC. Portland, USA; www.binax.com). Dystrybutorem testów w naszym kraju jest firma Argenta Oxoid z siedzibą w Poznaniu.

Oba testy są łatwe w użyciu, możliwe do wykonania bezpośrednio w gabinecie lekarza pierwszego kontaktu. Wynik uzyskuje się już po 15 minutach, co w znaczący sposób wpływa na szybkość podjęcia decyzji odnośnie terapii.

3.3.1. Binax NOW® *Legionella* Urinary Antigen Test

Test przeznaczony jest do poszukiwania antygeny *L. pneumophila* serogrupy 1 wyłącznie w moczu. Nie należy stosować tego testu do innych materiałów takich jak płwocina, popłuczyny pęcherzykowo-oskrzelowe, krew, czy też materiały środowiskowe.

Zasada testu: Błona nitrocelulozowa testu opłaszczona jest 1) króliczymi przeciwciałami p/*L. pneumophila* serogrupy 1 typu ludzkiego (pole diagnostyczne) oraz 2) anty-króliczymi koźmi przeciwciałami stanowiącymi wewnętrzną kontrolę pozytywną. Oba przeciwciała sprzężone są z barwnikiem, który podczas wykonywania testu uaktywnia się odczynnikami fosforanowo-cytrynianowym z Tween 20 i azydkiem.

Wykonanie testu:

1. Materiał przeznaczony do badania doprowadzić do temperatury pokojowej, delikatnie wymieszać.
2. Wymazówkę znajdującą się w zestawie testu, zanurzyć w pojemniku z badanym materiałem, tak, aby „główka” wymazówki w całości znajdowała się w materiale, a następnie wykonać nią kilka ruchów obrotowych.
3. Osaczoną o ściankę pojemnika wymazówkę umieścić w odpowiednim okienku testu.
4. Następnie trzymając pionowo otworem w dół buteleczkę z odczynnikami wywołującym reakcją barwną nanieść 2 krople odczynnika do okienka.
5. Wynik testu otrzymuje się po 15 minutach w postaci barwnych (różowo-czerwonych) prążków widocznych w okienku testu.
 - a. Górny prążek jest dodatnim testem kontrolnym. W dolnej części okna pojawia się drugi prążek o zabarwieniu różowo-czerwonym, świadczący o dodatnim wyniku testu.
 - b. Brak prążka dolnego (dla badanego materiału) przy obecności prążka kontrolnego świadczy o braku antygeny *L. pneumophila* serogrupy 1 w badanym moczu.
 - c. Brak pozytywnej kontroli (górnego prążka) bez względu na brak czy obecność prążka dolnego, świadczy o popełnionym błędzie i wymaga ponownego wykonania testu.

Test charakteryzuje się nieco lepszymi parametrami w porównaniu z testem Binax NOW® *Streptococcus pneumoniae* Antigen Test dla moczu, a jego specyficzność i czułość utrzymuje się na poziomie 95%; jako metodę odniesienia zastosowano

metodę hodowli drobnoustroju z materiału badanego. Antygen *L. pneumophila* serogrupa 1 wykrywany jest przy pomocy testu zarówno we wczesnej fazie zakażenia (już w trzecim dniu od wystąpienia pierwszych objawów), jak i fazie końcowej. Test nie wykrywa obecności antygenów innych serogrup niż serogrupa 1 *L. pneumophila*. Należy pamiętać, iż negatywny wynik testu nie wyklucza jednoznacznie możliwości zakażenia *L. pneumophila* serogrupy 1. Metoda hodowli jest metodą referencyjną do ustalania zapalenia płuc o etiologii innej niż *L. pneumophila* serogrupa 1 oraz *L. pneumophila* serogrupy 1 w przypadku, gdy antygeny nie są wykrywane w moczu.

Test dostępny jest w opakowaniach pozwalających wykonać 12 oraz 24 oznaczeń. Producent przygotował w swojej ofercie testy kontrolne, zarówno dodatnie, jak i ujemne, w postaci specjalnych wymazówek – **Binax NOW® Legionella Urinary Antigen Control Swab Pack** (zestaw zawiera po 5 testów dodatnich i ujemnych).

3.3.2. Binax NOW® Streptococcus pneumoniae Antigen Test

Zasada testu opiera się na reakcji immunochromatycznej pozwalającej wykryć antygen otoczki polisacharydowej *S. pneumoniae* w moczu (diagnostyka pneumokokowego zapalenia płuc), a także w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjenta (do diagnostyki zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych). Mocz należy pobrać do odpowiedniego pojemnika. W ciągu 24 godzin od pobrania może być przechowywany w temperaturze 15–30°C, temp. 2–8°C umożliwia wykonanie testu w ciągu 14 dni, zaś zamrożenie w temp. (–10)–(–20)°C w czasie dłuższym niż 2 tygodnie od pobrania.

Płyn mózgowo-rdzeniowy należy pobrać zgodnie ze standardowymi procedurami, wykonanie testu w ciągu 24 godz. zezwala na przechowywanie materiału w temp. 15–30°C, zas obniżenie temperatury do 2–8°C lub zamrożenie w (–10)–(–20)°C umożliwia wykonanie testu w ciągu 7 dni od nakłucia. Zasada wykonania testu jest spójna z zasadą testu Binax NOW® Legionella Urinary Antigen Test. Czułość i specyficzność testu wykrywającego antygen *S. pneumoniae* w moczu wynosi odpowiednio 86% i 94%. W przypadku diagnostyki zakażenia ośrodkowego układu nerwowego czułość i specyficzność testu plasują się na poziomach odpowiednio 97% i 99%. Zewnętrzne testy kontrolne zawiera zestaw Binax NOW® Streptococcus pneumoniae Urinary Antigen Control Swab Pack.

3.4. Krew

Wiele typów zakażeń dolnych dróg oddechowych może przebiegać z wysiewem drobnoustrojów z ogniska zakażenia do krwi. Krew jest podstawowym, ważnym materiałem klinicznym w diagnostyce stanów zagrażających życiu pacjenta. W przypadku posiewów krwi konieczne jest pobranie, co najmniej dwóch, ale nie więcej niż czterech, próbek krwi z oddzielnego nakłucia, w trakcie kolejnych septycznych epizodów. Diagnostyka krwi jest trudna, wymaga dobrego przygotowania pracowni mikrobiologicznej zarówno pod kątem sprzętu, podłoży i testów mikrobiologicznych, jak też, jeśli nie przede wszystkim, dużej wiedzy mikrobiologów. Krytyczną sprawą jest nie tylko czas pobrania i liczba próbek, ale także objętość krwi uzyskana do każdego badania. Istnieje wiele podłoży, zawierających substancje neutralizujące antybiotyki i hamujące działanie komórek fagocytycznych, a także powodujących lizę komórek celem uwolnienia drobnoustrojów wewnątrzkomórkowych. Aby usprawnić diagnostykę krwi oraz zwiększyć możliwość wyhodowań patogenów z tego materiału, a tym samym przyspieszyć otrzymanie wyniku, wprowadzono do diagnostyki systemy automatyczne dające sygnał w momencie namnażania drobnoustrojów. Diagnostyka mikrobiologiczna zakażeń krwi będzie tematem osobnej pracy

4. Wnioski

Zapalenie płuc, zarówno pozaszpitalne, jak i szpitalne, jest chorobą o dużej śmiertelności. Możliwości diagnostyki zapaleń płuc są zróżnicowane w zależności od ośrodka, stanu pacjenta oraz rodzaju czynnika etiologicznego zakażenia. Zarówno ocena kliniczna pacjenta, jak i diagnostyka laboratoryjna mają istotne znaczenie w terapii zakażeń dolnych dróg oddechowych i dlatego też standaryzacja postępowania personelu zaangażowanego na poszczególnych etapach procesu diagnostyczno-terapeutycznego powinna być poparta gruntowną, stale aktualizowaną wiedzą. Ważnym zadaniem dla laboratoriów mikrobiologicznych jest ujednolicenie w skali całego kraju sposobu opracowywania i oceny wszystkich materiałów klinicznych, a w szczególności materiałów z dolnych dróg oddechowych.

Piśmiennictwo

1. Baker A.M., Bowton D.L., Haponik E.F.: Decision making in nosocomial pneumonia: an analytic approach to the interpretation of quantitative bronchoscopic cultures. *Chest*, **107**, 85–95 (1995)
2. Barlett J.G.: The technique of transtracheal aspiration. *J. Crit. Illn.* **1**, 43–49 (1986)
3. Baselski V.S., El-Torky M., Coalson J.J., Griffin J.P.: The standarization of criteria for processing and interpreting laboratory specimens in parients with suspected ventilator-associated pneumonia. *Chest*, **102**, 571S–579S (1992)
4. Baselski V.S., Wunderink R.G.: Bronchoscopic diagnosis of pneumonia. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**, 533–558 (1994)
5. Cosentini R., Tarsia P., Blasi F., Roma E., Allegra L. Community-acquired pneumonia: role of atypical organisms. *Monaldi Arch. Chest Dis.* **56**, 527–534 (2001)
6. Dore P., Robert R., Grollier G., Eau J., Lanquetot H., Charriere J.M., Fauchere J.L. : Incidence of anaerobes in ventilator-associated pneumonia with use of protected specimen brush. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **153**, 1292–1298 (1996)
7. Fagon J.Y., Chastre J., Hance A.J., Montravers P., Novara A., Gibert C. : Nosocomial pneumonia in ventilated patients: a cohort study evaluating attributable mortality and hospital stay. *Am. J. Med.* **94**, 281–289 (1994)
8. Heyland D.K., Cook D.J., Marshall J., Heule M., Guslits B., Lang J., Jaeschke R.: Canadian Critical Care Trials Group: The clinical utility of invasive diagnostic techniques in the setting of ventilator-associated pneumonia. *Chest*, **115**, 1076–1084 (1999)
9. Hryniewicz W., Sulikowska A., Szczypa K., Gniadkowski M., Skoczyńska A.: Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki. *Post. Mikrobiol.* **44**, 175–192 (2005)
10. Hutt E., Kramer A.M.: Evidence-based guidelines for management of nursing home-acquired pneumonia. *J. Fam. Pract.* **51**, 709–716 (2002)
11. Jacobs J.A., De Brauwier E.I.G.B., Cornellisen E.I.M., Drent M.: Accuracy and precision of quantative calibrated loops in transfer of bronchoalveolar lavage fluid. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2117–2121 (2000)
12. Marquette C.H., Herengt F., Mathieu D., Saulnier F., Courcol R., Ramon P. : Diagnosis of pneumonia in mechanically ventilated patients : repeatability of the protected specimen brush. *Am. Rev. Respir. Dis.* **147**, 211–214 (1993)
13. Niederman M.S.: Guidelines for the management of respiratory infection: why do we need them, how should they be can they be useful? *Curr. Opin. Pulm. Med.* **1**, 161–165 (1996)

14. Niederman M.S., Craven D.E., Bonten M.J., Chastre J., Craig W.A., Fagon J.-Y., Hall J., Jacoby G.A., Kollef M.H., Luna C.M., Mandell L.A., Torres A., Wunderink R.G.: Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am. J. Resp. Critical Care Med.* **171**, 388–416 (2005)
15. Sharp S.E., Robinson A., Saubolle M., Santa Cruz M., Carrol K., Baselski V.: Lower respiratory tract infections (w:) Cumulative Techniques and Procedures in Clinical Microbiology. ASM Press, Washington, D.C. **7B**, 9–11 (2004)
16. Shelhamer J.H., Toews G.B., Masur H., Suffredini A.F., Pizzo P.A., Walsh T.J., Henderson D.K.: Respiratory disease in the immunosuppressed patient. *Ann. Intern. Med.* **117**, 415–431 (1992)
17. Stefaniuk E., Hryniewicz W.: Zastosowanie systemów automatycznych we współczesnej diagnostyce mikrobiologicznej. *Nowa Klinika*, **11**, 756–762 (2004)
18. Tablan O.C., Anderson L.J., Besser R., Bridges C., Hajjeh R.: Healthcare infection Control Practices Advisory Committee, Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for preventing health-care-associated pneumonia, 2003.: Recommendations of the CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. *MMWR Recomm. Rep.* **53**, 1–36 (2004)
19. Torres A., El-Elbiary M.: Bronchoscopic BAL in the diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Chest*, **117**, 198S–202S (2000)
20. Zieliński J., Górecka D., Śliwiński P.: Przewlekła obturacyjna choroba płuc. Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa 1999



**CENTRALNA KOMISJA
DO SPRAW STOPNI I TYTUŁÓW**

Pałac Kultury i Nauki
00-901 Warszawa

Nr BCK – Org. - 12 / 2006

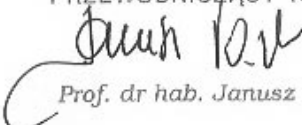
Warszawa, 17 stycznia 2006 r.
tel. 022 826-82-38; tel./ fax. 022 620-33-24
e-mail: bck@pan.pl

Pan
Prof. dr hab. Marek Niemiałtowski
Przewodniczący
Komitetu Mikrobiologii
Polskiej Akademii Nauk

Szanowny Panie Profesorze,

w związku z pismem Pana Profesora z dnia 2 stycznia br. uprzejmie informuję, że uchwała Centralnej Komisji do Spraw Stopni i Tytułów w sprawie określenia dziedzin nauki i dziedzin sztuki oraz dyscyplin naukowych i artystycznych, w której mikrobiologia jest wydzieloną dyscypliną w dziedzinie nauk biologicznych, została opublikowana w dniu 12 grudnia 2005 r. w Monitorze Polskim nr 79 pod poz. 1120.

Z wyrazami szacunku
PRZEWODNICZĄCY KOMISJI


Prof. dr hab. Jarusz Tazbir

KOMITET MIKROBIOLOGII PAN

Przewodniczący: prof.dr hab. Marek Niemiałtowski
Tel: +22-59-360 60; Tel/fax: + 22-59-360 66
e-mail: niemialtow@alpha.sggw.waw.pl; niemialtowski@yahoo.com

Adres do korespondencji:
Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW
ul.Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

1 marca 2006

Pan
prof.dr hab. Jerzy Hrebenda
Redaktor Naczelny „Postępów Mikrobiologii”
Warszawa

Szanowny Panie Profesorze,

w nawiązaniu do pisma Pani prof.dr hab. Wiesławy Rudnickiej i stanowiska Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego opublikowanego w „Postęпах Mikrobiologii” w 2004 r. (43, 1), a dotyczącego utworzenia w Centralnej Komisji do Spraw Stopni i Tytułów dyscypliny mikrobiologia wydzielonej w ramach dziedziny nauk biologicznych uprzejmie informuję Pana Redaktora oraz środowisko mikrobiologów polskich, że na podstawie uchwały Centralnej Komisji do Spraw Stopni i Tytułów z dnia 24 października 2005 r. w sprawie określenia dziedzin nauki i dziedzin sztuki oraz dyscyplin naukowych i artystycznych mikrobiologia została wydzielona jako dyscyplina w dziedzinie nauk biologicznych (wraz z biochemią, biofizyką, biologią, biotechnologią i ekologią) – w załączeniu pismo z dnia 17 stycznia 2006 r. skierowane do mnie przez Pana prof. dr. hab. Janusza Tazbira, przewodniczącego Centralnej Komisji do Spraw Stopni i Tytułów.

Dziękuję tym wszystkim PT mikrobiologom polskim, którzy skutecznie wsparli inicjatywę Komitetu Mikrobiologii PAN (KM PAN), a szczególne podziękowania za wkład pracy i zaangażowanie w przedmiotową sprawę przekazuję dla wiceprzewodniczącego komitetu Pani prof.dr hab. Wiesławy Rudnickiej oraz Dziekana Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego Pana prof. dr. hab. Antoniego Różalskiego. Za poparcie wniosku KM PAN i pozytywną decyzję dziękuję przewodniczącemu Centralnej Komisji do Spraw Stopni i Tytułów Panu prof. dr. hab. Januszowi Tazbirowi, sekretarzowi komisji Panu prof.dr.hab. Osmanowi Achmatowiczowi oraz przewodniczącemu Sekcji Nauk Biologicznych, Rolniczych i Leśnych w/w komisji Panu prof. dr. hab. Andrzejowi Dubasowi.

*Z wyrazami szacunku,
prof. dr hab. Marek Niemiałtowski*

INFORMACJA DLA AUTORÓW

Postępy Mikrobiologii zamieszczają artykuły przeglądowe ze wszystkich dziedzin mikrobiologii nie drukowane w innych czasopismach oraz w dziale Nowości Wydawniczych recenzje nowych książek z zakresu mikrobiologii i nauk pokrewnych, które ukazują się w Polsce. Artykuły drukowane w *Postęпах Mikrobiologii* nie mogą być bez zgody Redakcji publikowane w innych periodykach.

1. Sposób przygotowania manuskryptu.

1.1. Tekst

Prace należy przysłać do Sekretariatu Redakcji w postaci elektronicznego zapisu tekstu w edytorze Microsoft Word dowolnej edycji w wersji PL na dyskietkach komputerowych (3,5" 1,44 MB). Do dyskietki powinny być dołączone 2 egz. tekstu artykułu całkowicie zgodnego z zapisem elektronicznym. Objętość pracy nie powinna przekraczać wraz z piśmiennictwem i ilustracjami 30 stron maszynopisu. Maszynopis powinien być jednostronny (wielkość czcionki 12, odstęp pomiędzy wierszami 1,5), z numeracją stron. Po tytułach wydzielonych nie należy stawiać kropek.

Na oddzielnej stronie (strona tytułowa) należy podać tytuł pracy, pod nim w pełnym brzmieniu imiona i nazwiska autorów, spis treści (tytuły poszczególnych rozdziałów) oraz kilka (nie więcej jak pięć) słów kluczowych (keywords). Tytuł pracy i spis treści należy powtórzyć w języku angielskim. Słowa kluczowe mogą bądź nie pojawiać się w tytule pracy – należy je podać w porządku alfabetycznym. Praca powinna kończyć się krótkim podsumowaniem, zawierającym najistotniejsze elementy treści. Na oddzielnej stronie należy dołączyć krótkie streszczenie pracy w języku angielskim (maksymalnie 250 słów). Tekst pracy powinien być zgodny z zaleceniami szczegółowymi Redakcji.

Przesłane do redakcji prace winny być napisane poprawną polszczyzną. Redakcja rekomenduje P.T. Autorom **Słownik Poprawnej Polszczyzny** (red. Witold Doroszewski, Halina Kurkowska, Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa, 1998) jako pomoc w redagowaniu tekstu. Jakkolwiek *Postępy Mikrobiologii* są polskojęzyczne, nie wyklucza się druku prac, napisanych po angielsku.

1.2. Ilustracje

Tabele i rysunki (po dwa egz., o rozmiarze nie przekraczającym 26,5 cm × 18 cm) winny być wykonane starannie (dokładnie krycie) czarnym tuszem na kalce technicznej lub w formie wydruku z drukarki laserowej lub atramentowej. Fotografie (po dwa egz.) należy sporządzać na błyszczącym papierze, najlepiej w formacie 13 cm × 18 cm. Materiały te należy załączyć oddzielnie. Nie należy pozostawiać w maszynopisach wolnych miejsc na rysunki i zdjęcia, a tylko na kopii zaznaczyć miejsce, w którym powinny być umieszczone, np. tab. 1, rys. 1. Liczbę rysunków i tabel należy ograniczyć do istotnie niezbędnej ilości. Te same wskazówki odnoszą się do pojedynczych wzorów chemicznych. Każda tabela powinna być oznaczona kolejnym numerem rzymskim oraz mieć nagłówek opisujący jej treść. Na osobnej kartce należy załą-

czyć spis z objaśnieniami jakie powinny się znaleźć pod rysunkami lub z uwagą "objaśnienia w tekście". Podpisy pod wykresami, rysunkami, zdjęciami należy umieścić na osobnej stronie.

1.3. Piśmiennictwo

Cytowaną literaturę (Piśmiennictwo) należy wpisać oddzielnie jako ostatnie strony maszynopisu, wymieniając pozycje w kolejności alfabetycznej. W wykazie powinny być podane kolejno: liczba porządkowa, nazwisko autora, pierwsze litery imion, nazwiska współautorów pracy i pierwsze litery ich imion (w kolejności podanej w cytowanej pracy), pełny tytuł cytowanej pracy, skrócony tytuł czasopisma, tom, strona, i rok wydania (w nawiasach).

Dla cytowanych wydawnictw nieperiodycznych należy podać kolejno: nazwisko i pierwsze litery imion autora, lub współautorów, tytuł dzieła, wydawnictwo, miejsce i rok wydania. W przypadku odwoływania się do artykułu w pracy zbiorowej należy dodatkowo podać tytuł tej pracy oraz nazwisko jej redaktora, wydawnictwo, miejsce wydania, rok, tom oraz na końcu stronę, np. Portnoy D. A., Sun A. N., Bielecki J. E., Escape from the phagosome and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* (w) *Microbial Adhesion and Invasion*, red. M. Hook, L. Świtalski, Springer Verlag, New York, 1991, s. 86.

W przypadku gdy liczba współautorów pracy przekracza 10, należy podać nazwiska i inicjały pierwszego oraz ostatniego współautora a następnie dodać uwagę i wsp. np. Tomb J.F., J.C. Venter i wsp.: The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, **338**, 539–543 (1997)

(wyżej cytowana praca jest dziełem 42 autorów)

Powolywanie się w tekście na pozycje cytowanej literatury następuje przez wymienienie liczby porządkowej w nawiasach np. (10). Ilość cytowań w piśmiennictwie nie może przekraczać 100 pozycji.

1.3.1. Piśmiennictwo danych cytowanych z sieci internetowej

Warunkiem koniecznym przy użyciu informacji ze strony internetowej jest sprawdzenie i aktualizacja zapisu informacyjnego na stronie WEB w dniu wysyłania maszynopisu. W przypadku niewłaściwego adresu i niemożliwości odtworzenia informacji z sieci komputerowej, prace będą zwracane autorom. Cytowanie informacji publikowanej na stronach sieci internetowej powinno wyglądać następująco:

14. XYZ Website 14 listopada 2004 roku (online), nazwisko wydawcy, jeśli jest znane, <http://cbx.iou.pgr>. (10 Października 2004 roku, data ostatniego sprawdzenia adresu). Cytowanie książek powinno zawierać szczegółowe dane o wydawnictwie. Cytacje prac oryginalnych przesyłanych poprzez sieć komputerową powinna zawierać następujące dane:

Nazwisko autora, inicjały imion, data przyjęcia pracy, tytuł pracy. Nazwa czasopisma, numer: strony (jeśli są dostępne) (online), adres internetowy, data potwierdzenia ważności adresu.

1.3.2. Elektroniczne wersje ilustracji

Redakcja *Postępów Mikrobiologii* akceptuje ilustracje zachowane w formacie TIFF lub EPS. Wszystkie grafiki należy przysyłać w 100% wymiarze bez konieczności skalowania. Minimalna rozdzielczość stosowana w ilustracjach powinna wynosić 300 dpi dla zdjęć szarych i kolorowych, 600 dpi dla liter i 1200 dpi dla linii w wykresach. Grafiki kolorowe należy zachowywać w formacie CMYK. Dane są przyjmowane na standardowych mediach takich jak dyskietki 3,5 cala, CD lub DVD-ROM. Przesłane dyski lub dyskietki nie będą zwracane autorom. Zalecana przez redakcję kompresja informacji to **ZIP** lub **RAR**. W celu szczegółowej informacji proszę wysłać zapytanie przez e-mail na adres jbielecki@biol.uw.edu.pl.

2. Prawo autorskie

W przypadku reprodukcji w pracy cudzych rysunków lub tabel – nawet w formie zmodyfikowanej – bądź cytowania fragmentów cudzego tekstu, Autorzy *Postępów Mikrobiologii* przed przysłaniem tych materiałów do Redakcji są zobowiązani do uzyskania pisemnej zgody od Autorów oryginalnych prac i Wydawnictwa (z której materiały te pochodzą) na ich reprodukcję. Cytowany tekst powinien być wyraźnie oznaczony w odpowiednim miejscu manuskryptu, zaś u dołu strony powinna być zamieszczona informacja dotycząca pochodzenia cytatu oraz uzyskanej zgody na przedruk. Zaświadczenia wraz z informacją którego rysunku, tabeli lub cytatu dotyczą, należy przesyłać wraz z manuskrytem przeznaczoną do publikacji pracy. Uprzejmie zawiadamiamy, iż od 3-ciego zeszytu *PM* (2001 r.) Autorów naszego Pisma obowiązywać będzie składanie wraz z manuskrytem **oświadczenia dotyczącego praw autorskich**.

3. Zalecenia szczegółowe*

3.1. Nazewnictwo drobnoustrojów

Należy stosować dwuczłonowe nazwy zawierające nazwę rodzajową oraz gatunkową (np. *Escherichia coli*). Nazwy rodzajowe mogą być użyte same tj. bez nazwy gatunkowej, natomiast nie można użyć samych tylko nazw gatunkowych. Gdy w pracy podaje się pierwszy raz nazwę gatunku, musi ona składać się z pełnych wyrazów, przy ponownym użyciu tej nazwy, podaje się tylko pierwszą literę nazwy rodzajowej (zawsze dużą) oraz nazwę gatunkową w pełnym brzmieniu np. *E. coli*. Nazwy gatunku, rodziny, rzędu, klasy, działu oraz królestwa należy pisać kursywą. Informacje szczegółowe dotyczące pisowni oraz prawidłowego nazewnictwa (zgodnego z wymogami współczesnej systematyki) – przyjęte przez Redakcję *Postępów Mikrobiologii*, za instrukcją ASM – można znaleźć w **Instructions to Authors, J. Bacteriol. Jan. 1999**.

Zgodnie z propozycjami WHO – Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* („Antigenic Formulas of the *Salmonella* Serovars” (M. Y. Popoff and L. Le Minor, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France, 1997) and „Identification and Serotyping of *Salmonella* and an Update of the Kaufmann-White Scheme” (A. C. McWhorter-Murlin and F.W. Hickman-Brenner, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.)) do rodzaju *Salmonella* należą tylko dwa gatunki tj. *S. enterica* i *S. bongori* – pierwszy z nich podzielony został na 6 podgatunków. Stosowane dotychczas zwyczajowe nazwy, nie posiadające statusu taksonomicznego, takie jak **serotyp**, **typ serologiczny**, zostały zastąpione nazwą **serowaru** (w oryginalne **serovar**, sv.). Nazwę serowaru należy pisać dużą literą prostym pismem

* fragmenty instrukcji dla autorów czasopism wydawanych przez American Society for Microbiology – wykorzystywanie w *PM*. za zgodą Journals Departments ASM.)

(np. Typhi, Paratyphi B, Typhimurium itp.). Zgodnie z powyższym, nazwę pierwszego podgatunku rodzaju *Salmonella* można zapisać: *S. enterica* subsp. *enterica* sv. Typhimurium lub *Salmonella* subsp. I. sv. Typhimurium, bądź po prostu, *Salmonella* Typhimurium.

3. 2. Nomenklatura genetyczna

Właściwości genetyczne szczepu opisywane są w terminach fenotypu oraz genotypu. Fenotyp opisuje obserwowane właściwości organizmu. Genotyp określa genetyczną strukturę organizmu, zwykle odnosi się do szczepu dzikiego. Ww. określenia są bliżej objaśnione w pracy Demerec i wsp. *Genetics* **54** 61:76,1966.

- Fenotypowe określenie właściwości organizmu stosuje się gdy zmutowane loci nie zostały zidentyfikowane oraz zmapowane. Może być także użyte w przypadku, gdy identyfikuje się produkt genu np. białko OmpA. Zapis fenotypu zasadniczo składa się z trzech liter, nie można ich pisać kursywą, pierwsza litera powinna być zawsze dużą literą. Preferuje się użycie liczb rzymskich lub arabskich dla oznaczania bliźniaczych fenotypów np. Pol1, Pol2, Pol3 itd. Typ dziki można zapisać dodatkowym oznaczeniem *plus* (Pol⁺); w odróżnieniu do tego oznaczenie *minus* określać będzie fenotyp mutant (Pol⁻). Czasami pewne charakterystyczne właściwości organizmu można zapisać używając liter np. (Str^S).
- Genotypowe oznaczenia są podobne do fenotypowych – w obu przypadkach stosuje się zestaw trzech liter; genotyp pisze się zawsze małymi literami oraz kursywą (np. *ara*, *his*, *rps*). Promotor, terminator oraz operator oznacza się literami *p*, *t* oraz *o* (np. *lacZp*, *lacZt*, *lacZo*; Bachman i Low; *Microbiol. Rev.* **44**, 1–56, 1980).
- Typ dziki alleli można zaznaczyć wpisując dodatkowe oznaczenie *plus* nad oznaczeniem genu np. *ara*⁺, *his*⁺, nie oznacza się natomiast zmutowanych alleli znakiem *minus*.
- Miejsca mutacji oznacza się poprzez wstawianie liczby kolejnych izolacji (liczby alleli) po symbolu zmutowanego locus (np. *araA1*, *araA2* itp.). W przypadku, gdy tylko jedno takie locus istnieje, lub gdy nie wiadomo w którym kolejnym locus mutacja powstała – po oznaczeniu genu wstawia się myślnik w miejscu dużej litery oznaczającej locus, zaś dalej podaje się liczbę izolacji (np. *ara*-23).
- Zapis genotypu może być wzbogacony innymi oznaczeniami jak *plus*, dla typu dzikiego czy *minus* dla mutant – można wprowadzić oznaczenia określające mutacje jak np. mutacja Amber (Am), mutant termowrażliwy (Ts), mutant konstytutywny (Con), mutant wrażliwy na niskie temperatury (Cs), białko hybrydowe (Hyb) np. *araA230*(Am), *his D21*(Ts). Wprowadzanie innych wzbogaceń powinno być poprzedzone w tekście odpowiednim wyjaśnieniem.
- Dodatkowe oznaczenia mogą też być użyte w przypadku konieczności rozróżnienia tego samego genu znajdującego się w różnych organizmach lub szczepach tego samego gatunku np. *his*_{*E.coli*} lub *his*_{*K-12*}. Dodatkowe oznaczenia stosuje się również dla rozróżnienia pomiędzy genetycznymi elementami o tej samej nazwie np. promotory operonu *gln*; *glnA*₁ i *glnA*₂.
- Delecję oznacza się symbolem, D usytuowanym przed zdelejonowanym genem lub regionem np. D *trpA432*, D (*aroP-aceE*)419, lub D *his(dhuA hisJ hisQ)*1256. Fuzję genów *ara* i *lac* można przedstawić w ten sam sposób – F (*ara-lac*)1256. Podobnie F (*araB*' -*lacZ*⁺)(Hyb) oznacza, że fuzja nastąpiła pomiędzy genami *araB* a *lacZ*. Inwersja jest oznaczana następująco IN (*rrnD-rrnE*)1. Insercję genu *his E. coli* do plazmidu pSC101 w pozycji 0 zasad (Okb) zapisuje się następująco pSC101 W (Okb::K-12*hisB*)4. Oznaczenie obecności episomu polega na podaniu jego symboli w nawiasie po nazwie szczepu rodzicielskiego np. W3110/F' 8(*gal*⁺).

3.3. Skróty nazw chemicznych

Nie wymagają dodatkowych wyjaśnień skróty nazw, takich jak:

- nazwy miar i wag regulowanych przez *Systeme International de Unites* (SI), ogólnie akcetowane jednostki takie jak bp, kb, Da, masa cząst., m. cząst.
- skróty nazw chemicznych takich jak: DNA, cDNA, RNA, cRNA, RNaza, DNaza, rRNA, mRNA, tRNA; AMP, ADP, ATP, dATP, ddATP, GTP itp.,
- ATPaza, dGTPaza itp. NAD⁺, NADH, NADPH, NADP⁺, poly(A), poly(dT) itp.,
- nazwy powszechnie stosowanych technik biologii molekularnej np. PCR, SDS-PAGE, nazwy ogólnie znanych linii komórkowych np. HeLa, J774
- nazwy jednostek biologicznych; PFU (jednostka formowania łysek), CFU (jednostka formowania kolonii), MIC (minimalne stężenie hamujące wzrost), itp.

Nowe zasady kształtowania nomenklatury endonukleaz restrykcyjnych oraz metylotransferaz zostały opublikowane w *Nucleic Acids Research* 2003, **31**: 1805–1812. Przy pisaniu prac prosimy o korzystanie z zawartych tam informacji.

3.4. Pisownia danych numerycznych

Standardowe jednostki metryczne są stosowane dla określania długości, wagi i objętości. W przypadku przedstawiania tych wartości oraz molarności należy stosować przedrostki m, μ , n oraz p dla wartości 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} oraz 10^{-12} . Temperaturę należy przedstawiać tylko w stopniach Celsjusza np. 37°C.

3.5. Pisownia substancji znakowanych izotopami

Jeśli wyznakowana jest pojedyncza cząsteczka w związku chemicznym należy nazwę tego związku zapisać w następujący sposób $^{14}\text{C}_2$, $^3\text{H}_2\text{O}$, $\text{H}_2^{35}\text{SO}_4$. Taki sam sposób zapisu stosuje się

gdy radioaktywna cząsteczka nie występuje w naturalnej formie wyznakowanego związku np. ^{32}S -ATP lub gdy symbol izotopu związany jest z niespecyficzną nazwą związku np. ^{14}C aminokwasy, ^3H -liganty itp. W przypadku niektórych specyficznych związków chemicznych można stosować nawiasy kwadratowe obejmujące symbole radioaktywnej cząsteczki przed nazwą chemiczną związku np. [^{14}C] mocznik, L-[metylo- ^{14}C] metionina, [$g^{-32}\text{P}$] ATP.

4. Uwagi dodatkowe

Redakcja zastrzega sobie możliwość dokonywania skrótów i poprawek nie wpływających na treść pracy. W przypadku konieczności wprowadzenia zmian w treści odsyła się autorowi jeden egzemplarz pracy oraz dyskietkę w celu dokonania poprawek. Adresy instytucji, w których pracują autorzy (adres pocztowy oraz e-mail) należy podawać w maszynopisie pracy po piśmiennictwie. Prace nie odpowiadające wymaganiom Redakcji będą odsyłane autorom bez rozpatrzenia merytorycznego. W razie nie przyjęcia pracy do druku Redakcja zwraca dyskietkę oraz jeden egzemplarz wydruku, drugi zatrzymuje u siebie. Za datę wpływu przyjmuje się dzień otrzymania pracy w formie zgodnej z instrukcją dla autorów. Autorzy otrzymują bezpłatnie 15 odbitek pracy. Za prace opublikowane w *Postęпах Mikrobiologii* nie przewiduje się honorariów autorskich. Prace należy nadsyłać na adres sekretarza naukowego redakcji:

Dr Bohdan Jerzy Starościk
Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej
Akademia Medyczna
ul. Oczki 3
02-007 Warszawa
tel. (22) 628-08-22 lub 621-13-51

Oświadczenie dotyczące praw Autorskich

1.
(nazwisko/a i imię/ona autora/ów – proszę podkreślić autora korespondencyjnego)

Adres Autorów:

Tytuł pracy:

2. Oświadczenie (proszę wypełnić a lub b)

- (a) Oświadczam, iż w mojej/naszej pracy przeznaczone do opublikowania rysunki oraz tabele, są oryginalne tzn. zostały wymyślone i zaprojektowane przez autorów przedkładanego Redakcji manuskryptu. W pracy nie ma cytatów z obcej publikacji.

.....
(miejsce i data)

.....
(podpis korespondencyjnego autora)

- (b) Oświadczam, iż uzyskałem/liśmy zgodę Autorów na reprodukcję rysunków nr:, zamieszczonych w*

Oświadczam, iż uzyskałem/liśmy zgodę Autorów na reprodukcję tabel nr:, zamieszczonych w*

Oświadczam, iż uzyskałem/liśmy zgodę Wydawnictwa na reprodukcję rysunków nr:, zamieszczonych w*:

Oświadczam, iż uzyskałem/liśmy zgodę Wydawnictwa na reprodukcję tabel nr:, zamieszczonych w*:

(* podać bibliografie prac oryginalnych, z których reprodukowane będą rysunki lub tabele)

Do Oświadczenia załączam oryginalne zezwolenia reprodukcji w liczbie:, Rysunków:, tabel:, cytowanego tekstu:

.....
(miejsce i data)

.....
(podpis korespondencyjnego autora)

INSTRUKCJA DLA AUTORÓW PRAC PUBLIKOWANYCH W SUPLEMENTACH DO KWARTALNIKA POSTĘPY MIKROBIOLOGII

W celu ułatwienia publikowania w jednym miejscu artykułów o podobnej problematyce, *Postępy Mikrobiologii* wydawać będą w formie suplementów, następujące prace naukowe:

1. Referaty z sesji plenarnych Zjazdów naukowych, Konferencji naukowych oraz Sympozjów organizowanych staraniem Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów oraz Komitetu Mikrobiologii Polskiej Akademii Nauk. Manuskrypt pojedynczego referatu nie powinien przekraczać 25-ciu stron i powinien być przygotowany wg Informacji dla Autorów *Postępów Mikrobiologii*. Całość materiałów przygotowanych do jednego suplementu nie może przekraczać 150 stron maszynopisu.
2. Streszczenia przyjętych przez organizatorów referatów oraz doniesień prezentowanych na ww. Zjazdach naukowych, Konferencjach oraz Sympozjach. Streszczenie nie powinno przekraczać jednej strony maszynopisu i kończyć się nie więcej jak trzema pozycjami cytowanego piśmiennictwa.

W suplementcie nie będą publikowane oryginalne prace doświadczalne prezentowane na ww. Zjazdach naukowych. Prace te po odpowiednim przygotowaniu, zgodnie z instrukcją dla autorów, można przysyłać do Redakcji *Polish Journal of Microbiology (Acta Microbiologica Polonica)* lub innego czasopisma naukowego.

Autorzy lub zamawiający suplement ponoszą pełny koszt jego opracowania oraz wydania. Możliwy jest druk czterech suplementów rocznie. Ponieważ materiały przeznaczone do suplementu nie są opracowywane oraz nie podlegają ocenie Zespołu Redakcyjnego *Postępów Mikrobiologii*, zamawiający suplement, tj. osoba upoważniona przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów lub Komitet Mikrobiologii PAN, bierze całkowitą odpowiedzialność za redakcję oraz wartość merytoryczną suplementu. Wydanie suplementu powinno być poprzedzone jego akceptacją przez Zespół Redakcyjny *Postępów Mikrobiologii*.

Oferta Reklamy

Postępy Mikrobiologii udostępnią w każdym numerze kilka stron (łącznie z wewnętrznymi stronami okładek) **reklamie**.

Pismo nasze dociera co kwartał do kilku tysięcy odbiorców. Są wśród nich specjaliści różnych dziedzin mikrobiologii, pracujący jako nauczyciele Wyższych Uczelni Szkół Średnich, pracownicy naukowcy Instytutów Badawczych, biotechnolodzy oraz lekarze. Dużą grupę naszego pisma stanowią studenci.

Cena ogłoszenia czarno-białego wewnątrz numeru wynosi:

1/2 strony 250,- zł

cała strona 500,- zł

Proponujemy również ogłoszenia kolorowe – cena do uzgodnienia.

Texty opracowanych graficznie reklam proszę składać na adres Redakcji *Postępów Mikrobiologii*, 02-007 Warszawa, ul. Oczuki 3, tel. 628 08 22.

Spis treści

Anna Jadwiga Podhajska (1938–2006)	3
M. Włodarczyk, D. Giersz – Plazmidy liniowe u bakterii	5
A. Mroziak, K. Hupert-Kocurek, S. Łabużek – Lipazy bakterii rodzajów <i>Pseudomonas</i> i <i>Burkholderia</i> oraz ich wykorzystanie w biotechnologii	19
M. Karaś, W. Drożański, R. Russa – Peptydoglikan Gram-ujemnych pałecz- kowatych bakterii	27
K. Garbacz, J. Galiński – Atypowe szczepy gronkowca złocistego (<i>Staphylo- coccus aureus</i>) nie posiadające koagulazy lub czynnika zlepnego (CF)	39
G. Madajczak – Aktywacja apoptozy makrofagów przez pałeczki <i>Salmonella</i>	45
K. Przybulewska, A. Wieczorek – Wykorzystanie procesów biodegradacji styrenu do oczyszczania gazów odlotowych	51
Informacje, komunikaty, recenzje	67
E. Stefaniuk – Postępowanie w diagnostyce bakteryjnych zakażeń dolnych dróg oddechowych	67

Contents

Anna Jadwiga Podhajska (1938–2006)	3
M. Włodarczyk, D. Giersz – Linear plasmids in bacteria	5
A. Mroziak, K. Hupert-Kocurek, S. Łabużek – Lipases of genera <i>Pseudomonas</i> and <i>Burkholderia</i> and their applications in biotechnology	19
M. Karaś, W. Drożański, R. Russa – Peptidoglycan rod shape Gram-negative bacteria	27
K. Garbacz, J. Galiński – Atypical <i>Staphylococcus aureus</i> strains defective in coagulase or clumping factor (CF)	39
G. Madajczak – Macrophages apoptosis activation by <i>Salmonella</i> rods	45
K. Przybulewska, A. Wieczorek – Utilization of biodegradation of styrene for a waste gases treatment	51
Information, new reports, book reviews	67
E. Stefaniuk – Bacteriological diagnostic of lower respiratory tract infections	67

