

Zeszyt Studentów Biotechnologii

ACTA MYGENICA

numer 13

Kraków, marzec 2018

Zespół redakcyjny

Kinga Pajdzik
Artur Blat
Kajetan Sawa
Katarzyna Radoń
Agnieszka Seretny
Paweł Wydorski

Okładka

Wczesne etapy zakażenia permissywanej linii komórkowej CrFK wirusem kociej opryszczki typu I (FHV-1). Kanał czerwony: F-aktyna (falloidyna), kanał niebieski: jądro komórkowe (DAPI), kanał zielony: FHV-1.

Autorzy zdjęcia: Aleksandra Synowiec i Irma Gryniuk, wykonano w Zakładzie Biofizyki Molekularnej i Międzyfazowej, Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej, Uniwersytet Jagielloński

Skład

Dobrochna Dolicka
Julia Sadowska
Michał Nodzyński
Kinga Pajdzik
Paweł Wydorski

Korekta

Zespół redakcyjny

Wydawca

KNSB Mygen

Nakład: 500 szt.

Za nieocenione wsparcie merytoryczne dziękujemy dr hab. Ibeth Guevara-Lora, dr hab. Sylwii Kędrackiej-Krok oraz mgr Edycie Żyle.

Kontakt

kinga.pajdzik@gmail.com

ISSN 1899-5535

Sfinansowane przez



RADA KÓŁ NAUKOWYCH
UNIwersYTETU
JAGIELLOŃSKIEGO

Od redakcji

DRODZY CZYTELNICY!

Witamy Was na łamach trzynastego już numeru naszych Zeszytów Naukowych. W tym roku mija 20 lat od założenia KNSB Mygen i z tej okazji zachęcamy do zapoznania się z nadesłanymi do nas wspomnieniami dawnych członków Koła. W tym numerze zaznajomicie się również z działalnością Koła w ostatnim semestrze i relacją z Międzynarodowej Konferencji Nauk Przyrodniczych i Medycznych w Lublinie. Czytelnicy spragnieni nowości ze świata nauki znajdą informacje na temat roli enzymu Dicer w obrobie przed wirusami, nowo poznanych właściwościach czerwonego wina oraz pewnych ograniczeniach związanych ze stosowaniem terapii opartych na CRISPR. W szczególności zachęcamy do zapoznania się z opublikowanymi na łamach tego numeru artykułami.

Życzymy miłej lektury!

ZESPÓŁ REDAKCYJNY

THE VIITH INTERCOLLEGIATE BIOTECHNOLOGY SYMPOSIUM "Symbioza"

Siódma edycja Międzyuczelnianego Sympozjum Biotechnologicznego odbędzie się w tym roku na terenie **Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego** w dniach **11-13 maja 2018**.

W tym roku Sympozjum kierowane jest do młodych naukowców z całego świata, którzy chcą poszerzać swoją wiedzę z zakresu bio-nauki. Podczas konferencji uczestnicy będą mogli podzielić się swoimi wynikami badań w formie wystąpienia publicznego, posteru lub zapisać się na sympozjum jako bierni uczestnicy. Co więcej, MSB jest wyjątkową okazją do poznania ciekawych ludzi, a także daje możliwość wzięcia udziału w wykładach prowadzonych przez naukowców z europejskich instytucji naukowych. W tym roku swoją obecnością zaszczyca nas m.in.: prof. Ezio Ricca (University of Naples Federico II, Italy), prof. Urszula Wojda (Nencki Institute of Experimental Biology, Poland), dr Balca Mardin (BioMed X Innovation Center, Germany), dr Donato Giovannelli (The Earth-Life Science Institute, Tokyo & Rutgers University, USA), dr Stefano Ferrari (University of Zurich, Switzerland) oraz dr Anna Burdzińska (Medical University of Warsaw, Poland). Ponadto gorąco zachęcamy do uczestnictwa w nieoficjalnym programie przygotowanym przez członków Warszawskiego Stowarzyszenia Biotechnologicznego, który jest doskonałą okazją do poznania pozostałych uczestników oraz zwiedzenia pięknej stolicy Polski!

Serdecznie zapraszamy!

11-13th of May 2018

The Faculty of Biology, University of Warsaw,
Poland



**Koło Naukowe
Studentów Biotechnologii „Mygen”
działające przy Uniwersytecie
Jagiellońskim
serdecznie zaprasza studentów
oraz doktorantów na**

IV Ogólnopolską Konferencję Genetyczną



Zaproszenie skierowane jest do młodych badaczy i pasjonatów kierunków przyrodniczych interesujących się różnymi dziedzinami genetyki, zarówno prowadzących własne badania jak i dopiero zaczynających swoją przygodę z nauką. Oprócz wystąpień uczestników konferencji odbędą się także wykłady zaproszonych gości – wybitnych naukowców o znaczącym dorobku naukowym w dziedzinie genetyki.

W tym roku konferencja będzie poszerzona o dzień w **języku angielskim**. W związku z tym, wszystkie sesje wykładowe i posterowe drugiego dnia konferencji (sobota) odbędą się po angielsku.

**Konferencja odbędzie się w dniach 20 - 22 kwietnia
2018r. w Krakowie**

w Instytucie Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego
przy ul. Gronostajowej 9.

www.genomica.pl

Masz pytanie? Napisz do nas!
genomica.uj@gmail.com

Z życia koła

Mimo zimowej, sennej aury jaka gości w Krakowie już od kilku miesięcy, członkowie naszego Koła nie zwalniają tempa. Już na początku roku akademickiego rozpoczęły się prace nad kolejną edycją konferencji „Genomica”, która odbędzie się pod koniec kwietnia bieżącego roku. Od samego początku ruszył także cykl „seminariów czwartkowych”, podczas których wykłady wygłosili nie tylko studenci i pracownicy naukowcy naszego Wydziału, ale także goście z innych jednostek naukowych. Nie zabrakło również spotkań na temat możliwości odbywania wakacyjnych praktyk i staży w zagranicznych ośrodkach naukowych, które poprowadzili studenci mający już doświadczenie w tym temacie.

W listopadzie gościliśmy dr Joannę Chłopicką z Wydziału Farmaceutycznego UJ, która przedstawiła zagadnienie neurogastronomii, czyli tego jak nasz mózg przetwarza smaki. Naszym gościem był też dr hab. Paweł Zajdel, także z Wydziału Farmaceutycznego, z którym mieliśmy szansę podyskutować na temat strategii w odkrywaniu nowych leków. Wieloletnie członkinie naszego Koła – Agnieszka Seretny oraz Agata Kalita miały okazję opowiedzieć nam o swoich wakacyjnych przygodach z epigenetyką, które odbyły w ramach letnich programów naukowych realizowanych w Niemczech. Tuż przed Świętami Bożego Narodzenia wysłuchaliśmy jeszcze wykładu dr hab. Sylwii Kędrackiej-Krok na te-

mat wpływu depresji na proteom wybranych struktur w mózgu.

Jednak nie tylko nauką żyje nasze Koło i w przerwach między wykładami, ćwiczeniami czy też obowiązkami w laboratorium, mieliśmy kilka okazji aby spotkać się w celach towarzyskich. Nie zabrakło okazji do integracji podczas jesiennego wyjazdu do Mszany Dolnej, w którym wzięło udział aż 70 osób. Tradycją już stały się wieczory planszówkowe, wyjście na łyżwy czy zwyczajne spotkania przy piwie w pobliskiej restauracji. A propos piwa, mieliśmy nawet jedno z seminariów poświęcone procesowi produkcji tego trunku, które poprowadzili Marcin Luty oraz Szymon Krupa.

Po jesienno-zimowym semestrze pełnym wrażeń i spotkań, z nową energią ruszamy aby kontynuować naszą działalność! Z początkiem wiosny rozpocznie się „Lifescience dla licealistów” – cykl ćwiczeń laboratoryjnych, które prowadzimy dla uczniów szkół średnich. Nie możemy się doczekać również majowego wyjazdu integracyjnego oraz kontynuacji „seminariów czwartkowych”. Zespół redakcyjny, Zarząd Koła i Komisja Rewizyjna życzą naszym czytelnikom pomyślnego startu nowego semestru oraz samych sukcesów. Powodzenia!

Irma Gryniuk

20 lat Koła Mygen

Czy naprawdę już 20 lat minęło od czasu kiedy jako studenci tworzyliśmy MYGEN?

Pierwszy rocznik biotechnologii. Czuliśmy się wyjątkowi – dwudziestka szczęśliwców na nowo otwartym na UJ kierunku. Ale też byliśmy „wyjątkowo” traktowani. Na ćwiczeniach z chemii, fizyki czy biochemii poprzeczka była dla nas postawiona trochę wyżej. Uczyliśmy się dużo, ale też trzymaliśmy się razem i dużo się razem bawiliśmy. Wracając myślami do tamtych czasów, widzę nie tylko częste spotkania w akademikach, wspólne uczenie się do kolokwiów, kserowanie notatek, ale i tarzanie się ze śmiechu. Były też oczywiście regularne wspólne wyjścia do pubów – szczególną tradycją były czwartkowe wyjścia do położonego po sąsiedzku, przy Alei Mickiewicza, Kornetu. Nie zabrakło także wspólnych wypraw – Polesie, sylwester w Lubartowie, Pojezierze Drawskie, Bieszczady. Podróże nocnymi, napchanymi po brzegi pociągami, stanie na jednej nodze przez całą noc. Była szkoła letnia biotechnologii w Stegnie, organizowana przez niezapomnianą prof. Annę Podhajską z Gdańska, była Zimowa Szkoła w Zawoi.

Najbardziej ciekawe i wymagające były ćwiczenia z biochemii na 2 roku. W pracowni prof. Koja ćwiczenia prowadzili dla nas m. in. dr Joanna Bereta i dr Michał Bereta, dr Tomasz Kordula, dr Marcin Bugno. Młodzi doktorzy

z dobrym skutkiem zarażali nas swoją pasją i ciekawością. Nie było lekko – naprawdę nie wypadało nie być przygotowanym do kolejnych zajęć – doktorzy nie szczędzili słów krytyki, a czasem i szyderstw :-). Mimo wszystko, dziwnym trafem wielu z nas chętnie wracało do pracowni biochemii – nawet po to, żeby pozmywać szkło, pośmiać się i przy okazji podsłuchać co nieco z naukowych rozmów. Szczególnie otwarci i chętni do porozmawiania z młodymi studentami byli dr Joanna Bereta i dr Michał Bereta. I tam właśnie zrodził się pomysł na Koło. Grono coraz bardziej zainteresowanych studentów biotechnologii zaczęło bywać w Pracowni regularnie, później zaczęły się cotygodniowe seminaria, pod opieką dra Michała Berety. Omawialiśmy na nich przeróżne tematy, trema była ogromna, ale dyskusje – niezapomniane. Dopiero później powstał pomysł, aby naszą aktywność zamienić w oficjalną działalność studenckiego koła naukowego. Nazwa MYGEN miała być połączeniem dwóch pomysłów – zlepką angielskich słów „my gene”, a zarazem nieco zarożumiałym (z przymrużeniem oka) określeniem naszej grupy: „my geniusze”. Pierwszym prezesem został Marcin Klejman (obecnie prywatnie mój szwagier :-)), logo narysował Igor Siwanowicz. Do koła należeli początkowo studenci I i II rocznika biotechnologii.

Dr Michał Bereta poszedł krok dalej – postarał się o współpracę, w ramach

której zamiast regularnego kursu, na 4 roku studiów dostaliśmy do ręki prawdziwy projekt naukowy – otrzymanie przeciwciał monoklonalnych przeciwko TNF i bikuninie. Pieniądze na odczynniki pochodziły częściowo z funduszy wydziałowych na uruchomienie Laboratorium Przeciwciał Monoklonalnych, a częściowo ze współpracy z labem w Szwecji (o ile mnie pamięć nie myli). Układ był prosty: oni finansowali materiały i odczynniki (czyli nie ryzykowali wiele), a w razie naszego sukcesu zyskiwali swoje przeciwciało. My natomiast mieliśmy możliwość zrobić coś NAPRAWDĘ.

Ponieważ tematyka była zupełnie nowa, uczyliśmy się wszyscy wspólnie. Trzeba było zdobyć protokoły, zgromadzić sprzęt. Nierzadko wymyślić jak rozwiązać problem. Pamiętam, że dostałam za zadanie „ustawić” Western blot do sprawdzenia otrzymanych klonów komórkowych. Nikt wcześniej w labie nie robił Western blotów, trze-

ba było wykazać się samodzielnością i przedsiębiorczością. Musiałam zorganizować sobie sprzęt (złożyć z elementów pożyczonych z innych pracowni, głównie od dra Pawła Maka), protokoły, zrobić bufory, żel wylewałam cały dzień... Ale UDAŁO SIĘ! Nie tylko udało nam się uzyskać kilka klonów produkujących monoklonalne przeciwciała, ale udało się wyselekcjonować klon produkujący przeciwciało blokujące działanie TNF!

Był w nas zapał i radość. Chyba nic później nie dało mi aż takich wrażeń, takiej frajdy z nauki. Czasy początków Koła dały nam wiarę we własne siły i rozpęd do późniejszej pracy naukowej. A znajomości i przyjaźnie zawarte w czasie studiów trwają do dziś.

Trudno uwierzyć, że dra Michała B. nie ma z nami już od prawie 10 lat...

*Agata Klejman
(poprzednio Pękalska, znana
powszechnie jako Agafia)*

Pamiętam świętowanie 10-lecia istnienia Koła Mygen, jakby to było wczoraj. Minęło jednak aż 10 lat! Czas biegnie niesamowicie szybko. W tamtym okresie pełniłam funkcję Przewodniczącej Koła Mygen i był to bardzo owocny czas w moim życiu. Jak wszyscy wiemy, studia na Wydziale Biotechnologii nie należą do łatwych. Spotkałam jednak wiele pomocnych i zaangażowanych osób, które wspierały rozwój naszej organizacji. W zespole tkwi siła. Wspólnie organizowaliśmy ciekawe wykłady,

zarówno dla studentów jak i licealistów, pozyskiwaliśmy niezbędne fundusze i współpracowaliśmy z Radą Kół Naukowych Uniwersytetu Jagiellońskiego. Przede wszystkim jednak uczyliśmy się dzielić swoją wiedzę i pasję. Dzięki starszym, doświadczonym studentom, młodszy dowiadywali się o szerokich możliwościach wyjazdowych i stypendialnych.

Dla mnie praca w Kole była nie tylko przyjemnością, ale także swoistym

"warsztatem" umiejętności organizacji i zarządzania zespołem. Z pewnością działalność w Mygenie wiele mnie nauczyła i pomogła w kolejnych pracach po studiach. Gdy przekazywałam stery następnej osobie, czyli Kasi Kowalik, miałam poczucie dobrze wypełnionego zadania. Świętowaliśmy 10-lecie istnienia Mygeny, nosiliśmy z dumą jubileuszowe koszulki oraz mogliśmy napić się herbaty z pięknych kubków (jedno i drugie służy mi do dzisiaj).

Nie sposób wymienić wszystkie osoby, które w tamtym okresie współpracowały przy rozwoju Koła, na pewno wielkim wsparciem byli moi zastępcy Kuba Kołodziejcki i Krzysiek Szade oraz opiekun Koła Pani Prof. Joanna Bereta. W pamięci pozostaną na długo wyjazdy integracyjne do Mszany czy wspólne ogniska na Zakrzówku. Dzięki współpracy wielu osób, udało się z dużym sukcesem zorganizować stoisko Wydziału na Festiwalu Nauki czy w czasie Nocy Naukowców. Uczestni-

czyliśmy razem w Szkołach Zimowych oraz studenckich zjazdach Akademickiego Stowarzyszenia Studentów Biotechnologii. Młodszy studenci uczyli się przygotowywać plakaty konferencyjne oraz prezentować wyniki badań naukowych. W Mygenie dużo się działo i trudno było trafić na pusty pokój Koła (miło wspominać też wspólne malowanie ścian ;-). Na Wydziale sporo się mówiło o naszych działaniach, co niezwykle ułatwiło wszelkie kontakty z Radą Wydziału oraz Dziekanatem. Stworzyliśmy silną grupę otwartą na współdziałanie.

Bardzo się cieszę, że Mygen dalej się rozwija i wszystkim życzę kolejnych okrągłych rocznic oraz powodzenia w "dorosłym" życiu rodzinnym i zawodowym po zakończeniu przygody z Kołem.

*Małgorzata Parjaszewska
(dawniej Sokołowska)*

MYGEN powstał spontanicznie i radośnie w pokoju 113, czyli w LaBeretorium, w dawnym budynku Instytutu Biologii Molekularnej UJ przy Alejach Mickiewicza. Powstał dzięki entuzjazmowi studentów dwóch pierwszych roczników Biotechnologii, ale przede wszystkim dzięki energii i poświęceniu dra Michała Berety i prof. Joanny Berety. Dzięki Nim dowiedzieliśmy się, na czym polega codzienna praca w laboratorium, jak krytycznie czytać literaturę naukową oraz jak w pełni

wykorzystać naszą fantazję i wiedzę przy planowaniu eksperymentów.

Zapewne niejedną z nas do dziś wspomina gorące MYGENowe dyskusje oraz najbardziej kuriozalne hipotetyczne eksperymenty. MYGEN i LaBeretorium to był nasz dom w czasie studiów. Wielu z nas, zarażonych bakcyłem dobrej nauki, wyjechało po studiach na doktoraty za granicę, ale jestem pewna, iż wszyscy wciąż pamiętamy to, czego nauczyliśmy się od Opiekunów

naszego Koła: świętości Nauki, etyki pracy oraz kreatywności w labie. MY-GEN wychował wielu świetnych naukowców, którzy pracują na uniwersytetach na całym świecie. Cieszę się, że nadal się rozwija i przyciąga

do siebie nowe roczniki Studentów UJ. Wszystkiego najlepszego z okazji 20-tych urodzin!

Ilona Rafalska-Metcalf

Podsumowanie Międzynarodowej Konferencji Nauk Przyrodniczych i Medycznych: Młodzi Naukowcy, Doktoranci, Studenci

Międzynarodowa Konferencja Nauk Przyrodniczych i Medycznych: Młodzi Naukowcy, Doktoranci, Studenci odbyła się w dniach 1-3 grudnia ubiegłego roku kalendarzowego w Lublinie.

Udział w konferencji umożliwił uczestnikom poszerzenie wiedzy nie tylko w obszarze biochemii i biotechnologii, ale również w innych dziedzinach nauki, takich jak medycyna, farmacja, weterynaria oraz chemia. Prelegenci wykazywali się wysokim poziomem wiedzy i przedstawiali prace badawcze, przeglądowe, a także opisy przypadków.

Każdy z uczestników mógł również wziąć udział w warsztatach oferowanych przez Organizatorów, a ponieważ tematyka warsztatów była różnorodna, każdy mógł znaleźć coś dla siebie.

Jednak to nie był koniec oferty Organizatorów konferencji, gdyż abstrakty uczestników zostały zamieszczone

w książce, która jest częścią czasopisma *MEDtube Science*, a chętni mogli przygotować publikacje do wspomnianego czasopisma oraz innych, takich jak *World Scientific News* oraz *Nauki Przyrodnicze*. Po konferencji wydana została również monografia pokonferencyjna.

Spośród członków naszego Koła w konferencji wzięły udział oraz wygłosiły prezentacje - Kinga Pajdzik, Kinga Stopa oraz Martyna Wasilewska. Studentkom tym przyznano również nagrody: II nagrodę za wygłoszenie najlepszego referatu otrzymała Kinga Pajdzik, natomiast wystąpienia Kingi Stopy oraz Martyny Wasilewskiej zostały wyróżnione.

Serdecznie dziękujemy Organizatorom za ciepłe przyjęcie i życzymy powodzenia w kolejnych edycjach Konferencji.

Kinga Stopa



Doktoranci, Młodzi Naukowcy!

Z radością zapraszamy Was do wzięcia udziału w **IV Ogólnopolskiej Konferencji Doktorantów Nauk o Życiu BioOpen**. W dniach **24-25 maja 2018 r.** spotkamy się na **Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego**, już po raz czwarty, aby przedstawić naukowe dokonania, podzielić się doświadczeniem i integrować we wspólną atmosferę!

Na Konferencji gościć będziemy wybitnych specjalistów, których wykłady rozpoczną obrady w czterech sesjach tematycznych: **Mikrobiologia i immunologia, Biologia molekularna i biotechnologia, Fizjologia i biotechnologia roślin, Ekologia i ochrona środowiska**

Uczestnicy natomiast będą mogli zaprezentować się w sesjach referatowych i posterowych. W trakcie trwania BioOpen swoje usługi i produkty zaprezentują także znane i szanowane firmy z sektora life science.

Zapraszamy na naszą stronę i profil na facebooku.

Pozdrawiamy,

Komitet Organizacyjny

Nowinki ze świata nauki

JAK RYBONUKLEAZA DICER ROZPOZNAJE I TNIE DWUNICIOWE RNA?

Mimo że endorybonukleazy Dicer odkryto prawie dwie dekady temu, wciąż budzą one zainteresowanie wielu badaczy ze względu na to, jaką rolę odgrywają w regulacji ekspresji genów. Obecnie wiemy, iż odpowiadają one za cięcie dwuniciowego RNA, w wyniku którego powstaje mikro-RNA (miRNA) oraz krótkie interferujące RNA (siRNA) uczestniczące w zjawisku wy-ciszenia ekspresji na drodze interferencji RNA. Inną przypisywaną tym

endorybonukleazom funkcją jest uczestnictwo w obronie organizmu macierzystego przed wirusami poprzez cięcie genomu RNA wirusa powstałego w czasie jego replikacji.

Właśnie ten funkcjonalny dualizm zainteresował grupę badawczą z Zakładu Biochemii na Uniwersytecie w Utah, która postanowiła zbadać, w jaki sposób enzymy Dicer rozpoznają i tną substraty. W grudniu 2017 ro-

ku badacze opublikowali wyniki swoich badań nad działaniem enzymu Dicer u *Drosophila melanogaster*, z których wnioskowali, iż enzymy Dicer (a konkretnie dmDcr-2) rozpoznają substraty na podstawie występowania w nich tępych końców sekwencji (BLT – *blunt termini*) lub lepkich, z wystającym końcem 3'. Co więcej, za rozpoznanie różnego rodzaju końców dwuniciowego RNA odpowiadają różne domeny obecne w enzymach Dicer. Wykorzystując technikę mikroskopii krioelektronowej oraz wprowadzając mutacje punktowe, badacze ustalili, iż Dicer rozpoznaje i tnie substraty według dwóch modeli. W pierwszym przypadku dsRNA zawierające wystający koniec 3' jest rozpoznawany przez domenę Platform-PAZ rybonukleazy Dicer i cięty w specyficznym miejscu na fragmenty siRNA o tej samej długości (22 nukleotydów). Jednocześnie obecna w enzymie Dicer domena helikazy jest odpowiedzialna za rozpoznanie dwuniciowego RNA o tępych końcach (BLT dsRNA) i cięcie ich na fragmenty miRNA o różnych długościach sekwencji. Co ciekawe, również sam mechanizm cięcia różni się znacząco. W przypadku domeny Platform-

PAZ cięcie sekwencji jest zależne od obecności ATP. Drugi mechanizm, związany z domeną helikazy, nie wymaga ATP i wykazuje wysoką procesywność. Podejrzewa się, że zarówno procesywność, jak i powstawanie niespecyficznych produktów w drugim modelu jest korzystne w przypadku obrony przed wirusami.

Autorzy pracy postulują, iż za skuteczną obronę przed wirusami odpowiada właśnie procesywność enzymów Dicer związana z występowaniem domeny helikazy. Choć występująca u ludzi odmiana enzymu (hsDCR-1) nie wykazuje procesywności w warunkach *in vitro*, autorzy publikacji postulują, iż z racji występowania w ludzkim enzymie Dicer domeny helikazy, w odpowiednich warunkach procesywność ta może zostać wzbudzona. W takim przypadku być może mielibyśmy do czynienia z zupełnie nową metodą zwalczania infekcji wirusowych, skoncentrowaną na pobudzeniu aktywności antywirusowej enzymu Dicer, jednakże wymagane są dalsze badania.

Michał Nodzyński

Bibliografia:

Sinha NK, Iwasa J, Shen PS, Bass BL. Dicer uses distinct modules for recognizing dsRNA termini.

Science. 2018;359(6373):329-334.

ZWIĄZEK ZNALEZIONY W CZERWONYM WINIE POPRAWIA FUNKCJE KOMÓREK ODPORNOŚCIOWYCH

Resweratrol jest polifenolowym związkiem roślinnym, który wzbudził duże zainteresowanie jako środek farmakologiczny ze względu na jego potencjal-

ne przeciwnowotworowe działanie, a także wpływ na starzenie się i stan zapalny. Jednak wiele badań ukazywało sprzeczne dowody na wpływ reswe-

ratolu w różnych kontekstach. Craveiro i wsp. odkryli, że wysokie dawki resweratrolu hamowały odpowiedź ludzkich limfocytów T CD4+ na antygeny, natomiast niskie dawki leku zmieniły metabolizm komórek, czyniąc je bardziej wrażliwymi na antygeny. Dodatkowo, komórki wytwarzały

zwiększone ilości prozapalnej cytokiny - interferonu- γ . Sugeruje to, że należy dokładnie rozważyć zastosowanie resweratrolu w leczeniu różnych chorób, szczególnie w przypadku zaburzeń autoimmunologicznych.

Szymon Krupa

Bibliografia:

[1] Creveiro, M. et al. (2017). Resveratrol Stimulates the Metabolic Reprogramming of Human CD4+ T Cells to Enhance Effector Function, *Sci. Signal*, 10(501).

[2] <https://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/50668/title/Compound-Found-in-Red-Wine-Boosts-Immune-Cell-Function/> [dostęp: 23.01.2018]

ODPORNOŚĆ MOŻE SPRAWIĆ, ŻE TERAPIE OPARTE NA CRISPR BĘDĄ NIESKUTECZNE

CRISPR-Cas9 został okrzyknięty przełomowym narzędziem do edycji genomu, które może zapoczątkować erę precyzyjnej terapii genowej. Badania kliniczne z jego udziałem zaplanowano już na ten rok, jednakże okazuje się, iż układ odpornościowy może hamować skuteczność tej terapii.

W badaniu, które ukazało się w *MIT Technology Review*, zbadano krew 12 dorosłych i 22 noworodków pod kątem przeciwciał przeciwko białkom Cas9 pochodzących ze *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus pyogenes*. Stwierdzono obecność przeciwciała dla Cas9 z *S. pyogenes* u 65 procent dawców i przeciwciała dla Cas9 z *S. aureus* u 75 procent badanych.

Ponadto, u prawie połowy dawców obecne były komórki T CD4+, które specyficznie atakowały homologi Cas9 z *S. aureus*.

Odporność może nie tylko prowadzić do ograniczenia skuteczności terapii CRISPR, związane są z nią również pewne obawy co do bezpieczeństwa stosowania technik opartych na CRISPR. Problemy te są jednak ograniczone do tych terapii, które mają na celu edycję genomów in vivo, prawdopodobnie nie dotyczą one badań obejmujących usuwanie komórek i edytowanie genów w laboratorium.

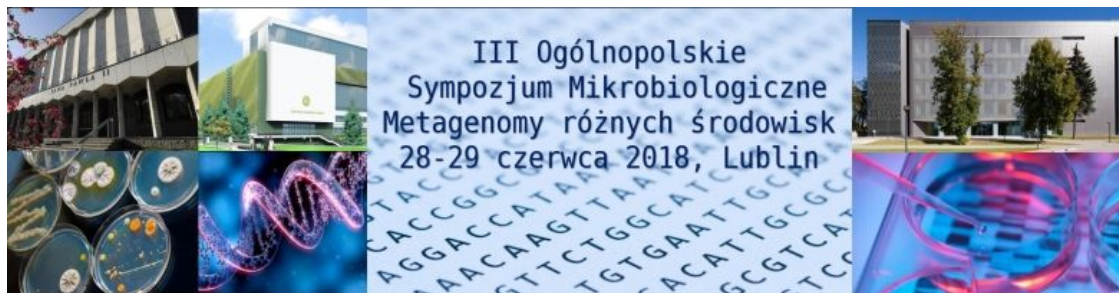
Szymon Krupa

Bibliografia:

[1] <https://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/51276/title/ImmunityMayMakeCRISPR-Based-Therapies-Ineffective/> [dostęp: 23.01.2018].
[2] <https://www.technologyreview.com/the-download/609904/uh-oh-crispr-might-not-work-in-people>

[dostęp: 23.01.2018].

[3] Charlesworth, C. T. et al. (2018). Identification of Pre-Existing Adaptive Immunity to Cas9 Proteins in Humans. Retrieved from <https://www.biorxiv.org/content/early/2018/01/05/243345> [dostęp: 25.01.2018].



Zapraszamy na **III Ogólnopolskie Sympozjum Mikrobiologiczne „METAGENOMY RÓŻNYCH ŚRODOWISK”**, które odbędzie się w Lublinie w dniach **28-29 czerwca 2018** roku na Katolickim Uniwersytecie Lubelskim. W konferencji uczestniczyć będą eksperci z całej Polski związani z mikrobiologią, biologią molekularną i bioinformatyką. Tematyka konferencji dotyczy kompleksowego rozpoznania bioróżnorodności mikroorganizmów w różnych środowiskach oraz najnowocześniejszych metod badawczych stosowanych w mikrobiologii, biologii molekularnej i biotechnologii. Celem Sympozjum jest podsumowanie dotychczasowej wiedzy i przedstawienie najnowszych osiągnięć w badaniach z zakresu metagenomiki, mikrobiologii, bioinformatyki, oddziaływań pomiędzy mikroorganizmami różnych środowisk oraz ich znaczenia dla rozwoju rolnictwa, ochrony środowiska i biotechnologii.

Szczegółowe informacje dostępne są na stronie internetowej:

<http://www.kul.pl/iii-ogolnopolskie-sympozjum-mikrobiologiczne-metagenomy-roznych-srodowisk%20quot,18462.html>

Serdecznie zapraszamy!

Organizatorzy:

Instytut Biotechnologii Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego Jana Pawła II,

Instytut Agrofizyki Polskiej Akademii Nauk w Lublinie,

Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie,

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa,

Państwowy Instytut Badawczy w Puławach,

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Spis treści:

Rola pozakomórkowego DNA w biofilmach prokariotycznych i eukariotycznych

Magdalena Smolarz 16

Zielona synteza jako alternatywna metoda wytwarzania nanocząstek srebra

Joanna Reszutko 28

Identyfikacja i analiza metycylinooporności flory gronkowcowej jamy nosowej psów

Kamila Dubrowska, Marta Stolarczyk, Kornela Sybidło 39

Rola pozakomórkowego DNA w biofilmach prokariotycznych i eukariotycznych

Magdalena Smolarz

Zakład Biochemii Porównawczej i Bioanalityki

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

magdalena.smolarz@student.uj.edu.pl

Praca napisana pod opieką dr hab. Marii Rapały-Kozik, prof. UJ

Intensywne namnażanie się bakterii i grzybów w danym środowisku prowadzi do formowania przez te mikroorganizmy przestrzennych struktur nazywanych biofilmami. Aktualne badania wskazują, iż biofilmy pełnią jedną z kluczowych ról w rozwoju poważnych chorób infekcyjnych, stanowiących często zagrożenie życia dla osób z obniżoną odpornością. Szereg wydzielanych przez patogeny składników tworzy zewnątrzkomórkową macierz stanowiącą szczelną barierę chroniącą mikroorganizmy przed niekorzystnymi warunkami środowiska. Poznanie roli poszczególnych komponentów macierzy stanowi wyzwanie dla współczesnej nauki. Okazuje się, że szczególnie ważną rolę w formowaniu macierzy pełni pozakomórkowe DNA (ang. *extracellular DNA*, eDNA), uwalnianie do przestrzeni zewnątrzkomórkowej przez mikroorganizmy tworzące biofilm. Ostatnie lata badań wykazały, że eDNA jest jednym z głównych składników wpływających na integralność całej struktury, ponadto może ono utrudniać penetrację biofilmów przez antybiotyki i tym samym brać udział w rozwijaniu lekooporności. Dokładne poznanie mechanizmów tworzenia biofilmów i funkcji poszczególnych ich komponentów ma kluczowe znaczenie w opracowywaniu nowoczesnych leków przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych. W niniejszej pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat funkcji pozakomórkowego DNA w biofilmach prokariotycznych i eukariotycznych oraz możliwości wykorzystania leków opartych na aktywności deoksyrybonukleazy w zwalczaniu infekcji.

Wstęp

Niemal każde środowisko na Ziemi zasiedlane jest przez różne gatunki mikroorganizmów, które mogą wchodzić wzajemnie w złożone interakcje. Wspólny rozwój prowadzić może do postawiania biofilmów, czyli trójwymiarowych struktur tworzonych przez je-

den lub kilka gatunków mikroorganizmów prokariotycznych i eukariotycznych [1]. Biofilmy mogą powstawać w niezliczonej liczbie środowisk sztucznych oraz naturalnych i to właśnie warunki środowiskowe determinują specyficzne właściwości tych struktur. Życie w takich zorganizowanych społecznościach przynosi wiele

korzyści mikroorganizmom, ponieważ umożliwia m.in. przetrwanie w nieprzychylnych warunkach środowiska. Szacuje się, że ok. 97% masy całego biofilmu stanowi woda, natomiast pozostałe 3% to wydzielane egzopolisacharydy, białka, lipidy oraz zewnątrzkomórkowe DNA (eDNA) [2]. Główną rolą tych składników jest zwiększanie adhezji mikroorganizmów do podłoża i utrzymywanie integralności całej struktury. Biofilmy oraz ich składniki mogą z jednej strony mieć znaczenie w utrzymywaniu prawidłowej homeostazy organizmu gospodarza, a z drugiej strony, pełnić rolę w rozwoju drobnoustrojów patogennych i lekooporności.

Struktura i formowanie biofilmów bakteryjnych

Każdego roku zwiększa się liczba badań naukowych dotyczących procesów tworzenia biofilmów, a otrzymywane wyniki wnoszą coraz więcej istotnych informacji na ich temat. Dotychczasowe obserwacje pokazują, że większość znanych gatunków bakterii jest w stanie rozwijać się i żyć w tak zorganizowanych społecznościach, a ponadto wydaje się, że jest to dominująca forma występowania większości mikroorganizmów w przyrodzie [3]. Proces tworzenia biofilmu jest długotrwały i złożony. Pierwszym etapem jest adhezja mikroorganizmu do podłoża. W procesie tym ogromną rolę odgrywają białka adhezyjne, specyficzne dla danego gatunku, oraz pozakomórkowe DNA. W kolejnych etapach, do miejsca powstania pierwszej monowarstwy na-

plywają kolejne komórki mikroorganizmów, co skutkuje tworzeniem wielowarstwowej struktury przestrzennej stabilizowanej przez szereg związków wydzielanych do przestrzeni pozakomórkowej określanych jako macierz biofilmu [4]. Do głównych jej komponentów w biofilmie bakteryjnym zalicza się egzopolisacharydy, stanowiące stabilne rusztowanie całej struktury. Ważną rolę w formowaniu biofilmów pełnią także białka powierzchniowe bakterii, które mogą być przyłączane do powierzchni komórek lub wydzielane na zewnątrz. Szczególnie ważną rolę odgrywają tu białka budujące fimbrie. Przykładem może być białko TasA, występujące u bakterii *Bacillus subtilis*, tworzące amyloidowe włókna, które umożliwiają ścisłe przyleganie komórek mikroorganizmu, a w konsekwencji tworzenie stabilnych struktur biofilmu [5]. W macierzy biofilmów prokariotycznych znajdują się również duże ilości eDNA, którego funkcja w ostatnich latach jest intensywnie badana [6].

Rola eDNA w biofilmach prokariotycznych

Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA) we wszystkich organizmach pełni rolę nośnika informacji genetycznej. Właściwości fizyczne DNA, takie jak wysoka lepkość oraz ujemny ładunek elektrostatyczny sprawiają, że może on poza komórką pełnić wiele innych funkcji, niezwiązanych z przekazywaniem informacji genetycznej.

W 2002 roku podczas badań nad biosyntezą alginianów u *Pseudomonas*

aeruginosa, zaobserwowano, że oprócz dużej ilości polisacharydów i innych związków organicznych, w macierzy biofilmu występują znaczne ilości kwasu nukleinowego [6]. Wykonano eksperyment polegający na suplementacji pożywki hodowlanej deoksyrybonukleazą (DNaza I). Zaobserwowano inhibicję tworzenia biofilmu hodowanego przez mniej niż 60 godzin. Badania te wykazały, że kwas nukleinowy znajdujący się w macierzy biofilmu ma kluczowe znaczenie dla formowania biofilmu bakteryjnego, szczególnie na jego pierwszych etapach. Biofilm rosnący przez minimum 84 godziny był zdecydowanie mniej wrażliwy na działanie DNazy I, co świadczy o pojawieniu się dodatkowych składników stabilizujących jego strukturę. Zewnątrzkomórkowe DNA, ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne, ułatwia przyleganie komórek do podłoża, dlatego też jego degradacja przez deoksyrybonukleazę ogranicza adhezję mikroorganizmów do podłoża, a to z kolei hamuje pierwsze etapy tworzenia tej zorganizowanej struktury. Ponadto w rozwijających się biofilmach degradacja eDNA utrudnia również agregację komórek bakteryjnych [7]. Wykazano również, że szczepy *Bacillus cereus* z mutacją genów *purA*, *purC* i *purL*, odpowiedzialnych za biosyntezę puryn, nie są w stanie prawidłowo formować biofilmów [8], co dodatkowo potwierdza wcześniejsze hipotezy. Dokładny mechanizm regulacji uwalniania eDNA nie jest do końca poznany. Udowodniono, że DNA znajdujące się w macierzy biofilmu nie różni się od genomowego, zatem postawiono hi-

potezę, że może być ono uwalniane w procesie autolizy. Autoliza u bakterii jest wynikiem aktywacji szlaków zależnych przede wszystkim od zjawiska „*quorum sensing*”, które między innymi umożliwia mikroorganizmom regulację ekspresji genów w zależności od gęstości populacji [9]. W przypadku *Ps. aeruginosa* wykazano, że genem regulującym uwalnianie DNA jest *pqsA*. Bakterie z mutacją genu *pqsA* wytwarzają bardzo niewielkie ilości cząsteczki sygnałowej PQS (ang. *Pseudomonas Quinolone Signal*), biorącej udział w aktywacji lizy. Kolejne badania pokazały, że uwalnianie eDNA u *Ps. aeruginosa* jest dodatkowo regulowane przez żelazo, które wpływa na aktywność genów *Pqs*. W dużym stężeniu wpływa ono na obniżenie ekspresji tych genów i w rezultacie skutkuje zmniejszeniem uwalniania DNA na zewnątrz [10]. *Ps. aeruginosa* wytwarza również szereg toksyn, m.in. piocyjaninę, która katalizuje reakcję zamiany tlenu w rodniki ponadtlenkowe i nadtlenek wodoru. Okazuje się, że istnieje zależność pomiędzy produkcją tego związku a uwalnianiem eDNA, ponieważ H_2O_2 indukuje wśród bakterii znajdujących się w biofilmie mechanizm autolizy [11]. Mogłoby się wydawać, że z jednej strony produkcja piocyjanianu jest zjawiskiem niekorzystnym dla pojedynczych komórek bakteryjnych, jednak należy pamiętać, że w kontekście całego biofilmu uwalnianie pozakomórkowego DNA ma kluczowe znaczenie. Oprócz mechanizmu autolizy pojawiają się również przykłady świadczące o możliwości uwalniania DNA za pomocą systemów sekrecji

[12]. Zaobserwowano, że Gram ujemne bakterie z gatunku *Neisseria gonorrhoeae* uwalniają duże ilości zewnątrzkomórkowego DNA podczas wykładniczej fazy wzrostu, wykorzystując IV system sekrecji (T4SS) [13]. Pojawiają się również przykłady transportu DNA na zewnątrz komórki za pomocą pęcherzyków błonowych [14]. Do tej pory mechanizm ten zaobserwowano u kilku gatunków bakterii Gram ujemnych (*Pseudomonas aeruginosa*, *Myxococcus xanthus*) oraz Gram dodatnich (*Bacillus anthracis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*) [15].

Pomimo niewątpliwej roli w stabilizacji struktury biofilmów, eDNA odkrywa również ważną funkcję w horyzontalnym transferze genów, który jest głównym mechanizmem odpowiedzialnym za adaptację drobnoustrojów do warunków środowiska [16]. Do głównych mechanizmów wymiany DNA pomiędzy bakteriami zaliczyć należy transformację, koniugację oraz transdukcję. Skupiska pozakomórkowego DNA stanowią dużą pulę genów, które mogą być przekazywane pomiędzy mikroorganizmami należącymi do tych samych lub różnych gatunków. Transformacja jest bardzo szybkim mechanizmem, dzięki któremu możliwe jest rozprzestrzenianie genów kodujących między innymi czynniki wirulencji oraz lekooporność [17, 18]. W procesie tym biorą udział mikroorganizmy charakteryzujące się tzw. kompetencją, czyli zdolnością do przyjmowania DNA ze środowiska. Na podstawie badań horyzontalnego transferu genów u niektórych gatunków paciorkowców

wykazano, że kompetencja jest wynikiem aktywacji szlaku sygnałowego ComDEX przez peptyd CSP (ang. *competence-stimulating peptide*) [19]. Mutanty nieposiadające zdolności do kompetencji tworzą biofilmy o znacznie zredukowanej biomacie [20]. Transfer genów oporności na antybiotyki opisano między innymi dla biofilmu tworzonego przez dwie bakterie pospolicie występujące w jamie ustnej: *Veillonella dispar* oraz *Streptococcus mitis*. Zaobserwowano, że oczyszczone DNA pochodzące z *Veillonella dispar* może transformować bakterie *S. mitis*, co skutkuje pojawieniem się genów oporności na tetracyklinę u paciorkowca [21].

Struktura i formowanie biofilmów eukariotycznych

Struktura biofilmów eukariotycznych jest stosunkowo słabo zbadana. Najlepiej poznanymi są biofilmy tworzone z udziałem polimorficznych, oportunistycznych drożdżaków z rodzaju *Candida*, które są składnikami naturalnej mikroflory u prawie 80% populacji człowieka. Drożdżaki z gatunku *Candida albicans* wywołują u osób z obniżoną odpornością poważne infekcje – kandydozy. Podobnie jak w przypadku bakterii, możemy wyróżnić trzy etapy tworzenia biofilmów drożdżowych. Pierwszym etapem jest adhezja komórek do podłoża, następnie dochodzi do zmiany formy morfologicznej z komórkowej na strzępkową (filamentną), a także rozpoczyna się produkcja i uwalnianie składników macierzy tworzącej biofilm [22]. Macierz zewnętrz-

komórkowa w biofilmie eukariotycznym składa się głównie z węglowodanów, ale występują w niej również białka, aminocukry, kwas uronowy, reszty fosforanowe oraz znaczne ilości DNA [23, 24]. Patogenne grzyby mają zdolność do ścisłego przylegania do różnych powierzchni wewnątrz organizmu gospodarza, takich jak na przykład śródbłonek naczyń krwionośnych i błony śluzowe. Ponadto drożdżaki bardzo często kolonizują sztuczne implanty, zastawki i sprzęty medyczne, stanowiąc groźne dla życia źródła wtórnego zakażenia [25]. Adhezję do podłoża i agregację komórek grzybów tworzących biofilm umożliwiają białka – adhezyny, które najlepiej zostały opisane w przypadku drożdżaków *C. albicans*. Główną grupą adhezyn występujących u *C. albicans* są glikoproteiny z rodziny Als (ang. *agglutinin-like sequence*). Przyleganie do błon śluzowych umożliwiają głównie białka Als1, Als2 i Als4, z kolei Als1 oraz Als3 wraz z adhezyną Hwp1 (ang. *hyphal wall protein*) umożliwiają zlepianie za sobą strzępek, co pozwala na tworzenie rozbudowanych struktur [26]. Kolejną ważną adhezyną jest białko Eap1 (ang. *enhanced adherence to polystyrene*), strukturalnie bardzo podobne do białek z rodziny Als. Uważa się, że jego główną funkcją jest umożliwianie adhezji do sztucznych powierzchni polistyrenowych oraz do nabłonka nerkowego [27]. Białek umożliwiających przyleganie do różnych powierzchni odkrytych u *C. albicans* oraz u innych patogennych grzybów takich jak *Cryptococcus neoformans* czy *Aspergillus fumigatus* jest jednak znacznie więcej [28].

Rola eDNA w biofilmach eukariotycznych

Selektywna degradacja składników macierzy dojrzałego biofilmu formowanego przez *C. albicans* za pomocą proteiny K i chitynazy skutkuje obniżeniem adhezji drożdżaka do podłoża [22]. Większość aktualnie prowadzonych badań koncentruje się jednak na wyjaśnieniu funkcji eDNA. Okazuje się, że ilość pozakomórkowego DNA jest ściśle skorelowana z etapem tworzenia biofilmu. Dodanie DNazy I nie wykazuje znacznego wpływu na formowanie biofilmu drożdżowego na pierwszych etapach formowania, w przeciwieństwie do biofilmów bakteryjnych [24]. Dopiero dodanie DNazy I do dojrzałego biofilmu, rosnącego przez minimum 48 godzin, powoduje spadek integralności powstałej struktury. Wydaje się zatem, że pozakomórkowe DNA jest kluczowym składnikiem zapewniającym stabilność dojrzałego biofilmu eukariotycznego, natomiast nie jest niezbędne na etapie adhezji drożdżaka do podłoża. W początkowych fazach rozwoju biofilmu drożdżowego kluczową rolę pełnią przede wszystkim liczne adhezyny. Podobne obserwacje poczyniono w przypadku grzybów z gatunku *A. fumigatus* [29]. W celu potwierdzenia funkcji DNA w biofilmach drożdżowych wykonano doświadczenie polegające na dodaniu niewielkiej ilości egzogennej DNA pochodzącej z *C. albicans* oraz patogenów związanych z zapaleniem płuc: *Ps. aeruginosa* i *S. aureus* do struktur tworzonych przez *C. albicans*, *C. glabrata* i *C. tropicalis*. Zaobserwowano

powstanie gęstej sieci komórek otoczonych dużą ilością eDNA. Zaskakujący wynik uzyskano, gdy egzogenne DNA dodawane było w bardzo dużej ilości (powyżej 10 µg/ml). Zaobserwowano wówczas spadek masy biofilmu, co może świadczyć o roli DNA w inhibicji wzrostu i promowaniu odrywania komórek od podłoża w celu kolonizacji innych powierzchni, w momencie osiągnięcia przez biofilm dojrzałej struktury [30].

Mechanizm uwalniania eDNA przez organizmy eukariotyczne nie jest do końca poznany. Uwalnianie eDNA przez bakterie jest głównie związane ze zjawiskiem „*quorum sensing*”, które indukuje procesy autolizy, jednak poznano do tej pory zaledwie kilka związków biorących udział w tym zjawisku u organizmów eukariotycznych [9]. W przypadku *C. albicans* substancje te odpowiedzialne są za regulację zmiany formy morfologicznej drożdżaka, która w dużej mierze zależy od gęstości komórek. W zagęszczeniu większym niż 10⁶ komórek/ml obserwuje się silną inhibicję strzępkowania spowodowaną produkcją farnezołu [31]. Jednak badania z wykorzystaniem mutanta *C. albicans chk1/chk1*, pozbawionego kinazy histydynowej, biorącej udział między innymi w przekazie sygnału modulowanego przez farnezoł [32], wykazały brak znaczącej roli tego związku w aktywacji uwalniania eDNA [24]. Wpływ innych cząsteczek biorących udział w „*quorum sensing*” nie został jeszcze poznany. Podejrzewa się, że za uwalnianie pozakomórkowego DNA może być również odpowiedzialny proces oparty na aktywności chity-

naz [33]. Do tej pory odkryto cztery geny kodujące chitynazy u *C. albicans*. Geny *CHT2* oraz *CHT3* są odpowiedzialne ze regulację zmiany formy morfologicznej i wykazują szczególnie wysoką aktywność w formie strzępkowej [34]. Wykazano, że chitynazy kodowane przez te geny są aktywne w momencie uwalniania eDNA, zatem można podejrzewać, że istnieje ścisła korelacja pomiędzy uwalnianiem eDNA i tworzeniem formy strzępkowej [33].

Wpływ pozakomórkowego DNA na stabilizację biofilmów mieszanych

W warunkach naturalnych większość poważnych infekcji jest związana z występowaniem tzw. biofilmów mieszanych, utworzonych z kilkunastu gatunków bakterii i grzybów. Formowanie wielogatunkowych biofilmów obserwuje się bardzo często m. in. na powierzchni zębów oraz dziąseł. Wykazano, że bakterie wchodzące w skład tych struktur (np. *S. mutans*, *S. gordonii*, *Veillonella dispar*, *Fusobacterium nucleatum* oraz *Porphyromonas gingivalis*) uwalniają znaczne ilości eDNA [35]. Podobnie jak w przypadku biofilmów jednogatunkowych, zaobserwowano, że DNA odgrywa kluczową rolę w początkowych etapach formowania mieszanych biofilmów, natomiast ich forma dojrzała stabilizowana jest głównie przez polisacharydy. Wyniki badań *in vivo* oraz *in vivo* prowadzonych na biofilmach tworzonych przez *Staphylococcus epidermidis* i *C. albicans* w obrębie wklucia centralnego u myszy wskazują na zwiększoną ilość

pozakomórkowego DNA i zdecydowanie większą stabilność w porównaniu do struktur tworzonych niezależnie przez wskazane gatunki mikroorganizmów [36]. Wykazano, że przyczyną zwiększonej ilości eDNA w macierzy jest zmniejszenie ekspresji genów zlokalizowanych w operonie *lrg* *S. epidermidis*, odpowiedzialnych za powstanie białek będących represorami autolizy [37]. Ponadto zaobserwowano zwiększone rozprzestrzenianie *S. epidermidis* w obrębie wklucia centralnego u myszy, co przekładało się na dynamiczny rozwój infekcji i skutkowało wzrostem śmiertelności zwierząt. Bardzo często w biofilmach mieszanych obserwowane jest przyleganie bakterii do strzępek. Prawdopodobnie drożdżaki mogą pełnić funkcję szkieletu, na którym rozwija się biofilm bakteryjny, dzięki temu strzępki ułatwiają kolonizację tkanek gospodarza i rozprzestrzenianie infekcji bakteryjnych [36].

eDNA jako czynnik wirulencji mikroorganizmów prokariotycznych i eukariotycznych

Większość składników macierzy biofilmu może być rozpoznawana przez komórki układu odpornościowego człowieka za pośrednictwem receptorów rozpoznających wzorce [38]. Bakteryjne DNA uwolnione w trakcie fagocytozy uruchamia produkcję cytokin przez aktywację receptora TLR9, znajdującego się na błonie endosomu fagocytów. TLR9 rozpoznaje niemetylowane motywy CpG charakterystyczne dla bakteryjnego DNA [39]. Badania z ostatnich lat pokazują, że

również pozakomórkowe bakteryjne DNA znajdujące się w macierzy może pośredniczyć w aktywacji komórek układu odpornościowego. Dodanie do rosnącego biofilmu tworzonego przez *Ps. aeruginosa* DNazy I, skutkuje zmniejszeniem produkcji IL-8 i IL-1 β przez neutrofile, co może wskazywać na istotną rolę eDNA w indukcji stanu zapalnego [39]. Zaobserwowano także, że niektóre mikroorganizmy są zdolne do unikania rozpoznania na tej drodze, czego przykładem mogą być bakterie *N. gonorrhoeae*. Bez indukcji autolizy, lecz za pośrednictwem T4SS bakterie te uwalniają metylowane DNA, przez układ immunologicznego gospodarza nie jest aktywowany [13].

Do tej pory rola eDNA w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej przez *C. albicans* oraz inne patogeny eukariotyczne nie została jeszcze dokładnie zbadana, jednak można podejrzewać, że podobnie jak w przypadku bakterii, DNA będzie aktywowało odpowiedź immunologiczną. Do tej pory wykazano, że w przypadku biofilmów tworzonych przez *C. albicans* obserwuje się zmienioną odpowiedź komórek układu odpornościowego w porównaniu do hodowli planktonicznych. Różnice widać przede wszystkim w odpowiedzi komórek fagocytujących. Zaobserwowano, że jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (ang. *peripheral mononuclear blood cells*, PBMCs) migrują przez strukturę biofilmu bez indukcji fagocytozy, ponadto, paradoksalnie, promują rozwój biofilmu [40]. Na tej podstawie wyciągnięto wniosek, że za indukcję wzrostu biofilmu odpowiada niezidentyfikowany związek uwalniany do nad-

sączy przez PBMCs. Ponadto wydzielanie tej substancji może być indukowane przez komponenty ściany komórkowej *C. albicans*, jednak do tej pory nie wytłumaczono w pełni tego procesu. W przypadku interakcji monocytołów, dotychczasowe badania pokazały, że nie otaczają one biofilmu tworzego przez *C. albicans* i wydają się być wręcz nieaktywne w infekcjach grzybiczych [41].

Tworzenie biofilmów leży u podstaw wielu chorób infekcyjnych, których skuteczne zwalczanie jest niezwykle trudne. Zaobserwowano, że mikroorganizmy tworzące biofilm charakteryzują się zwiększoną antybiotykoopornością. Występowanie zjawiska lekooporności jest jednym z największych wyzwań współczesnej medycyny. Początkowo uważano, że zewnątrzkomórkowa macierz stanowi pewnego rodzaju barierę uniemożliwiającą przedostawanie się różnych związków do wnętrza biofilmu [42]. Częsteczki antybiotyków mogą być wiązane z komponentami macierzy, co utrudnia ich dyfuzję. Jednak jest to efekt krótkotrwały i w przypadku długotrwałej antybiotykoterapii obserwuje się narastającą dyfuzję antybiotyków [43]. Zaobserwowano na przykład, że szczep RP62A *S. epidermidis*, dzięki uwalnianiu dużej ilości zewnątrzkomórkowych polimerów, uniemożliwia przedostawanie się flukonazolu do komórek drożdżaków, z kolei obecność *Candida* wpływa na zmniejszenie wrażliwości gronkowców na wankomycynę [44], co niezwykle utrudnia zwalczanie takich mieszanych infekcji. Kilka lat temu odkryto także zupełnie

nową funkcję eDNA. Okazuje się, że pozakomórkowe DNA może wiązać występujące w środowisku jony np. magnezu, pełniąc funkcję chelatora. Niedobór jonów magnezu jest sygnałem indukującym systemy PhoPQ i PmrAB, które odpowiadają za wzrost oporności na kationowe peptydy przeciwbakteryjne (ang. CAPs) [45] oraz na aminoglikozydy u *Ps. aeruginosa* [43]. Problem oporności na antybiotyki nie dotyczy tylko biofilmów bakteryjnych. Większość infekcji o podłożu grzybiczym jest trudna do zwalczenia za pomocą związków przeciwgrzybiczych. Szczególnie groźne i trudne w zwalczeniu są infekcje wywołane przez *C. albicans*, występujące u osób z obniżoną odpornością. Podobnie jak w przypadku biofilmów prokariotycznych, mechanizmów oporności na antymikotyki można doszukiwać się wśród składników macierzy zewnątrzkomórkowej. W przypadku biofilmów tworzonych przez *C. albicans* zbadano zależność pomiędzy dodatkiem DNazy I, a wzrostem wrażliwości na niektóre popularne antymikotyki takie jak amfoterycyna B, kaspofungina i flukonazol, różniące się mechanizmem działania. Amfoterycyna B wiąże się ze sterolami znajdującymi się na błonie komórkowej grzybów i zwiększa jej przepuszczalność, z kolei flukonazol hamuje produkcję tych związków. Kaspofungina hamuje syntezę beta-(1,3)-D-glukanu będącego składnikiem ściany komórkowej drożdżaków. Zaobserwowano wzrost podatności na działanie tylko amfoterycyny B i kaspofunginy w obecności DNazy I. Dokładnie nie wyjaśniono braku wpływu DNazy

I na aktywność flukonazolu, jednak odpowiedź może tkwić w budowie cząsteczki. Flukonazol, w przeciwieństwie do amfoterycyny B i kaspofunginy, jest związkiem drobnocząsteczkowym, który może łatwo przedostawać się do komórek poprzez macierz, przez co degradacja eDNA za pomocą DNazy I nie zwiększa możliwości jego transportu.

Terapie oparte na działaniu deoksyrybonukleazy

Od momentu odkrycia kluczowej roli pozakomórkowego DNA w utrzymywaniu stabilności biofilmów, podejmowano próby opracowania skutecznych leków opartych na aktywności deoksyrybonukleazy. Do tej pory udowodniono, że DNaza wołowa jest w stanie skutecznie niszczyć strukturę biofilmów mieszanych, tworzonych przez *P. aeruginosa* oraz *S. aureus* [46]. Odkryto również, że deoksyrybonukleaza NucB pochodząca z *Bacillus licheniformis* umożliwia rozpraszanie biofilmów tworzonych m.in. na protezach tchawiczo-przełykowych [47]. NucB jest cząsteczką mniejszą niż cząsteczka DNazy I, przez co może skuteczniej przedostawać się do głębszych struktur biofilmu i bardziej efektywnie wpływać na jego degradację. W medycynie znalazła zastosowanie rekombinowana ludzka DNaza I (hrDNaza, Dornaza alfa), wykorzystywana w leczeniu mukowiscydozy. Wykazano, że lek ten wpływa również na dyspersję biofilmów tworzonych przez pneumokoki w warunkach *in vivo*, jednak badania *in vivo* nie zostały do tej pory przeprowadzo-

ne [7]. Pomimo tego, że do tej pory przeprowadzono jedynie wstępne badania *in vivo*, nie ulega wątpliwości, że stosowanie leków opartych na aktywności deoksyrybonukleazy lub stosowanie tego enzymu jednocześnie z antybiotykami może stać się skuteczną metodą zwalczania infekcji. Jednak jednym z głównych problemów ograniczających zastosowanie DNazy do celów terapeutycznych jest duża trudność w jej pozyskiwaniu. Przykładowo ludzka rekombinowana DNaza wymaga do swojej aktywności glikozylacji, co uniemożliwia produkowanie jej w systemach bakteryjnych. Przyszłe zastosowanie tego enzymu na szeroką skalę wymaga opracowania wydajnych i tanich sposobów jego pozyskiwania [46].

Podsumowanie

Zjawisko formowania biofilmów przez mikroorganizmy od lat budzi zainteresowanie badaczy z całego świata. Coraz więcej uwagi poświęca się badaniu funkcji poszczególnych elementów wchodzących w skład zewnątrzkomórkowej macierzy. Szczególnie interesującym jej składnikiem jest poza-komórkowe DNA, którego zewnątrzkomórkowa funkcja po raz pierwszy została odkryta w 2002 roku podczas badań prowadzonych nad biofilmem bakteryjnym tworzonym przez *P. aeruginosa*. Od tego czasu eDNA jest uważane za jeden z głównych składników biofilmów prokariotycznych i eukariotycznych, którego zadaniem jest przede wszystkim utrzymywanie integralności powstałej struktury. Pomimo

dość obszernej wiedzy na temat roli i mechanizmów uwalniania DNA u bakterii, wciąż mało uwagi poświęca się biofilmom o podłożu grzybiczym i mieszanym. Większość dotychczasowych badań prowadzona była na modelowych biofilmach jednogatunkowych, które występują bardzo rzadko w warunkach naturalnych. Konieczne są zatem dalsze prace umożliwiające przede wszystkim poznanie podstaw zakażeń o podłożu wielogatunkowym, gdyż to właśnie one są odpowiedzialne za rozwój najpoważniejszych infekcji. Na podstawie aktualnego stanu wiedzy wydaje się, że opracowanie leków opartych na aktywności deoksyrybonukleazy, umożliwiających degradację eDNA, może stać się obiecującą metodą zwalczania biofilmów o podłożu bakteryjno-grzybiczym wywołujących poważne infekcje, będące jedną z przyczyn wysokiej śmiertelności osób cierpiących na przykład na mukowiscydozę czy zespół nabytego niedoboru odporności.

Bibliografia:

- [1] L. A. Pratt and R. Kolter, "Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: Roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili," *Mol. Microbiol.*, vol. 30, no. 2, pp. 285–293, 1998.
- [2] I. W. Sutherland, "Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework," *Microbiology*, vol. 147, no. 1, pp. 3–9, 2001.
- [3] E. Karatan and P. Watnick, "Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 73, no. 2, pp. 310–347, 2009.
- [4] N. Rabin, Y. Zheng, C. Opoku-Temeng, Y. Du, E. Bonsu, and H. O. Sintim, "Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents," *Future Med. Chem.*, vol. 7, no. 4, pp. 493–512, 2015.
- [5] D. Romero, C. Aguilar, R. Losick, and R. Kolter, "Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, no. 5, pp. 2230–2234, 2010.
- [6] C. B. Whitchurch et al., "Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation" *Science* (80-.), vol. 295, no. 5559, pp. 0–1, 2002.
- [7] L. Hall-Stoodley et al., "Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase treatment and evidence of capsule downregulation in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates," *BMC Microbiol.*, vol. 8, no. 1, p. 173, 2008.
- [8] S. Vilain, J. M. Pretorius, J. Theron, and V. S. Brözel, "DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, no. 9, pp. 2861–2868, 2009.
- [9] M. Allesen-Holm et al., "A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms," *Mol. Microbiol.*, vol. 59, no. 4, pp. 1114–1128, 2006.
- [10] L. Yang, K. B. Barken, M. E. Skindersoe, A. B. Christensen, M. Givskov, and T. Tolker-Nielsen, "Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*," *Microbiology*, vol. 153, no. 5, pp. 1318–1328, 2007.
- [11] T. Das and M. Manefield, "Pyocyanin Promotes Extracellular DNA Release in *Pseudomonas aeruginosa*," *PLoS One*, vol. 7, no. 10, pp. 1–8, 2012.
- [12] J. P. Dillard and H. S. Seifert, "A variable genetic island specific for *Neisseria gonorrhoeae* is involved in providing DNA for natural transformation and is found more often in disseminated infection isolates," *Mol. Microbiol.*, vol. 41, no. 1, pp. 263–277, 2001.
- [13] H. L. Hamilton, N. M. Domínguez, K. J. Schwartz, K. T. Hackett, and J. P. Dillard, "*Neisseria gonorrhoeae* secretes chromosomal DNA

via a novel type IV secretion system," *Mol. Microbiol.*, vol. 55, no. 6, pp. 1704-1721, 2005.

[14] S. R. Schooling and T. J. Beveridge, "Membrane vesicles: An overlooked component of the matrices of biofilms," *J. Bacteriol.*, vol. 188, no. 16, pp. 5945-5957, 2006.

[15] S. Liao et al., "Streptococcus mutans extracellular DNA is upregulated during growth in biofilms, actively released via membrane vesicles, and influenced by components of the protein secretion machinery," *J. Bacteriol.*, vol. 196, no. 13, pp. 2355-2366, 2014.

[16] S. Molin and T. Tolker-Nielsen, "Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 14, no. 3, pp. 255-261, 2003.

[17] P. Courvalin, "Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 38, no. 7, pp. 1447-1451, 1994.

[18] L. Montanaro et al., "Extracellular DNA in biofilms," *Int. J. Artif. Organs*, vol. 34, no. 9, pp. 824-831, 2011.

[19] L. Kausmally, O. Johnsborg, M. Lunde, E. Knutsen, and L. S. Håvarstein, "Choline-binding protein D (CbpD) in *Streptococcus pneumoniae* is essential for competence-induced cell lysis," *J. Bacteriol.*, vol. 187, no. 13, pp. 4338-4345, 2005.

[20] F. C. Petersen, D. Pecharki, and A. A. Scheie, "Biofilm mode of growth of *Streptococcus intermedius* favored by a competence-stimulating signaling peptide," *J. Bacteriol.*, vol. 186, no. 18, pp. 6327-6331, 2004.

[21] S. Hannan, D. Ready, A. S. Jasni, M. Rogers, J. Pratten, and A. P. Roberts, "Transfer of antibiotic resistance by transformation with eDNA within oral biofilms," *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 59, no. 3, pp. 345-349, 2010.

[22] J. Chandra et al., "Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Develop-

ment, Architecture, and Drug Resistance," *Natl. Review Microbiol.*, vol. 9, no. 18, pp. 109-118, 2001.

[23] M. A. Al-Fattani and L. J. Douglas, "Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: Chemical composition and role in drug resistance," *J. Med. Microbiol.*, vol. 55, no. 8, pp. 999-1008, 2006.

[24] M. Martins et al., "Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms," *Mycopathologia*, vol. 169, no. 5, pp. 323-331, 2010.

[25] E. M. Kojic and R. O. Darouiche, "Candida Infections of Medical Devices," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 17, no. 2, pp. 255-267, 2004.

[26] C. J. Nobile, J. E. Nett, D. R. Andes, and A. P. Mitchell, "Function of *Candida albicans* adhesin hwp1 in biofilm formation," *Eukaryot. Cell*, vol. 5, no. 10, pp. 1604-1610, 2006.

[27] F. Li and S. P. Palecek, "EAP1, a *Candida albicans* Gene Involved in Binding Human Epithelial Cells," *Eukaryot. Cell*, vol. 2, no. 6, pp. 1266-73, 2003.

[28] P. W. J. de Groot, O. Bader, A. D. de Boer, M. Weig, and N. Chauhan, "Adhesins in human fungal pathogens: Glue with plenty of stick," *Eukaryot. Cell*, vol. 12, no. 4, pp. 470-481, 2013.

[29] R. Rajendran, C. Williams, D. F. Lappin, O. Millington, and M. Martins, "Extracellular DNA Release Acts as an Antifungal Resistance Mechanism in Mature *Aspergillus fumigatus* Biofilms," *Eukaryot. Cell*, vol. 12, no. 3, pp. 420-429, 2013.

[30] B. Sapaar et al., "Effects of extracellular DNA from *Candida albicans* and pneumonia-related pathogens on *Candida* biofilm formation and hyphal transformation," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 116, no. 6, pp. 1531-1542, 2014.

[31] J. M. Hornby et al., "Quorum Sensing in the Dimorphic Fungus *Candida albicans* Is Mediated by Farnesol" *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, no. 7, pp. 2982-2992, 2001.

- [32] M. Kruppa et al., "The Two-Component Signal Transduction Protein Chk1p Regulates Quorum Sensing in *Candida albicans*," *Eukaryot Cell*, vol. 3, no. 4, pp. 1062-1065, 2004.
- [33] R. Rajendran et al., "Extracellular DNA release confers heterogeneity in *Candida albicans* biofilm formation," *BMC Microbiol.*, vol. 14, no. 1, p. 303, 2014.
- [34] S. Selvaggini, C. A. Munro, S. Paschoud, D. Sanglard, and N. A. R. Gow, "Independent regulation of chitin synthase and chitinase activity in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*," *Microbiology*, vol. 150, no. 4, pp. 921-928, 2004.
- [35] S. Schlafer, R. L. Meyer, I. Dige, and V. R. Regina, "Extracellular DNA contributes to dental biofilm stability," *Caries Res.*, vol. 51, no. 4, pp. 436-442, 2017.
- [36] M. Pammi, R. Liang, J. Hicks, T. Mistretta, and J. Versalovic, "Biofilm extracellular DNA enhances mixed species biofilms of *Staphylococcus epidermidis* and *Candida albicans*" *BMC Microbiol.*, vol. 13, no. 257, pp. 257-269, 2013.
- [37] K. H. Groicher, B. A. Firek, D. F. Fujimoto, and K. W. Bayles, "The *Staphylococcus aureus* *lrgAB* operon modulates murein hydrolase activity and penicillin tolerance," *J. Bacteriol.*, vol. 182, no. 7, pp. 1794-1801, 2000.
- [38] G. Pietrocola et al., "Toll-like receptors (TLRs) in innate immune defense against *Staphylococcus aureus*," *Int. J. Artif. Organs*, vol. 34, no. 9, pp. 799-810, 2011.
- [39] J. I. Fuxman Bass et al., "Extracellular DNA: A Major Proinflammatory Component of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms," *J. Immunol.*, vol. 184, no. 11, pp. 6386-6395, 2010.
- [40] J. Chandra, T. S. McCormick, Y. Imamura, P. K. Mukherjee, and M. A. Ghannoum, "Interaction of *Candida albicans* with adherent human peripheral blood mononuclear cells increases *C. albicans* biofilm formation and results in differential expression of pro- and anti-inflammatory cytokines," *Infect. Immun.*, vol. 75, no. 5, pp. 2612-2620, 2007.
- [41] H. Phagocytes et al., "Interactions between Human Phagocytes and *Candida albicans* Biofilms Alone and in Combination with Antifungal Agents," *J Infect Dis.*, vol. 201, no. 12, pp. 1941-1949, 2011.
- [42] J. W. Costerton, "Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections," *Science* (80-.), vol. 284, no. 5418, pp. 1318-1322, 1999.
- [43] H. Mulcahy, L. Charron-Mazenod, and S. Lewenza, "Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms," *PLoS Pathog.*, vol. 4, no. 11, p. e1000213, 2008.
- [44] B. Adam, G. S. Baillie, and L. J. Douglas, "Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis* Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*," *J. Med. Microbiol.*, vol. 51, no. MAY, pp. 344-349, 2002.
- [45] J. B. McPhee, S. Lewenza, and R. E. W. Hancock, "Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*," *Mol. Microbiol.*, vol. 50, no. 1, pp. 205-217, 2003.
- [46] N. S. Jakubovics, R. C. Shields, N. Rajarajan, and J. G. Burgess, "Life after death: The critical role of extracellular DNA in microbial biofilms," *Lett. Appl. Microbiol.*, 2013.
- [47] A. Shakir, M. R. Elbadawey, R. C. Shields, N. S. Jakubovics, and J. G. Burgess, "Removal of biofilms from tracheoesophageal speech valves using a novel marine microbial deoxyribonuclease," *Otolaryngol. - Head Neck Surg. (United States)*, vol. 147, no. 3, pp. 509-514, 2012.

Zielona synteza jako alternatywna metoda wytwarzania nanocząstek srebra

Joanna Rzeszutko

Koło Naukowe Studentów Biotechnologii „Bio-tech”

Laboratorium Biotechnologii Molekularnej

Wydział Biotechnologii

Uniwersytet Rzeszowski

asia16207@wp.pl

Praca napisana pod opieką dr Małgorzaty Kus-Liśkiewicz

W ostatnich latach obserwuje się duże zainteresowanie w dziedzinie nanotechnologii skupiającej się na syntezie nanocząstek (NPs), które dzięki swoim rozmiarom zyskują unikalne właściwości chemiczne i fizyczne w porównaniu do swoich odpowiedników w skali mikro lub makro. Szeroko rozpowszechnione są metaliczne nanocząstki srebra (AgNPs) znajdujące zastosowanie w wielu gałęziach nauki, medycyny i przemysłu. Ważne jest, aby metody ich produkcji charakteryzowały się dużą efektywnością, łatwością wykonania i niskim kosztem produkcji, a zarazem były przyjazne dla środowiska naturalnego i nietoksyczne dla konkretnych zastosowań. Z tych powodów coraz częściej rezygnuje się z konwencjonalnych sposobów syntezy, opartych na procesach chemicznych i fizycznych. Obiecujące staje się zastąpienie ich technikami skupiającymi się na metodach tzw. zielonej syntezy, zdecydowanie bardziej przyjaznej środowisku, w której omija się stosowanie substancji niebezpiecznych dla całego ekosystemu. Ponadto, technologia zielonej syntezy jest bardziej opłacalna. Stosuje się energooszczędne procesy prowadzące do powstawania nieszkodliwych dla środowiska produktów, w tym przypadku AgNPs. Znanych jest wiele naturalnie występujących organizmów, będących źródłem biomolekuł niezbędnych do syntezy nanocząstek metalicznych. Co więcej, sprawiają one, że nowo wytworzone struktury zyskują pożądane właściwości do aplikacji biomedycznych. W niniejszej pracy przedstawiono niektóre sposoby wytwarzania nanocząstek srebra, skupiając się na biosyntezie z udziałem zasobów biologicznych, których to produkty znajdują szereg zastosowań praktycznych.

Wstęp

Nanotechnologia jest stosunkowo młodą, ale gwałtownie rozwijającą się dziedziną nauki, której głównym celem

jest produkcja i zastosowanie molekuł w rozmiarze nano, czyli takich które mają jeden wymiar mniejszy niż 100 nm [1, 2]. Początki rozwoju tej dyscypliny sięgają 1959 roku, kiedy to pod-

czas słynnego wykładu pt. *There's Plenty of Room at the Bottom*, Richard P. Feynman przedstawił koncepcję miniaturyzacji oraz ogromne możliwości technologii opartej na działaniach w skali nanometrycznej [3].

Nanocząstki (NPs) charakteryzują się unikalnymi właściwościami fizycznymi i chemicznymi, co związane jest z ich dużą powierzchnią względem objętości, jaką posiadają. Własności te powodują, że nanocząstki są wysoce reaktywnymi strukturami. Wpływa też na to rodzaj materiału, z którego NPs są wytworzone. Wyróżnia się m.in. nanocząstki metali, fulereny, polimerowe i ceramiczne, a o przynależności do danej grupy decydują ich właściwości, kształt, rozmiar oraz struktura [4]. Ze względu na swoje specyficzne cechy, struktury te znalazły szeroki wachlarz zastosowań w różnych gałęziach nauki i przemysłu, począwszy od medycyny, kosmetologii, farmacji, technologii dostarczania leków, biomedycyny i ochrony zdrowia, poprzez ochronę środowiska, rolnictwo, produkcję żywności i pasz, a na przemyśle chemicznym, elektronice, optyce i kosmonautyce skończywszy [5]. Dzięki swoim małym rozmiarom i łatwości przenikania błon komórkowych są w stanie dotrzeć do każdej struktury organizmu. Ponadto są bardziej odporne mechanicznie, mają wyższą temperaturę topnienia i pożądane właściwości fizyczne dotyczące przewodnictwa elektrycznego, cieplnego i magnetycznego [6]. Na szczególną uwagę zasługują najczęściej wykorzystywane nanocząstki srebra (AgNPs), które cechują się m.in. działaniem antybakteryjnym i przeciw-

grzybiczym, mogą być one wykorzystywane do obrazowania biologicznego i dostarczania leków [7]. Stwierdzono, że ilość wyprodukowanych rocznie nanocząstek srebra sięga 500 ton i będzie z każdym rokiem wzrastać. Z tego powodu wiele uwagi poświęca się zastosowaniu odpowiednich metod syntezy, które będą wydajne i opłacalne, a zarazem bezpieczne dla późniejszych aplikacji oraz przyjazne dla środowiska [8].

Metody wytwarzania nanocząstek

Obecnie wyróżnia się dwie główne metody wytwarzania nanocząstek srebra: *top-down* [9] i *bottom-up* [10]. Istotą podejścia *top-down* jest stopniowe rozdrabnianie litego materiału na drobne cząstki przy wykorzystaniu technik fizycznych i mechanicznych, np. poprzez mechaniczne rozdrobnienie, szlifowanie, frezowanie, ablację laserową, metody termalne, wypalanie w piecach rurowych. Do zalet tych technologii należy możliwość uniknięcia zanieczyszczeń pochodzących od rozpuszczalnika oraz równomierny rozkład nanocząstek. Rozwiązania te wymagają jednakże zużycia dużej ilości energii potrzebnej m. in. do utrzymania odpowiedniej temperatury pieca rurowego, w którym syntetyzuje się głównie cząstki metaliczne, czasu potrzebnego do osiągnięcia stabilności termicznej, a powstałe w ten sposób struktury mają niekiedy niedoskonałości na swojej powierzchni.

Metoda *bottom-up* opiera się na samoorganizacji atomów do nowych jąder i syntezie NPs od podstaw. Wykorzy-

stuje się tutaj metody chemiczne i fotochemiczne, polegające na redukcji soli metali w obecności odpowiednich organicznych i nieorganicznych czynników redukujących, jakimi są np. borowodorek sodu (NaBH_4), N-dimetyloformamid (DMF), cytrynian sodu, askorbinian, wodór elementarny, kopolimery blokowe oraz stabilizatorów, które zapobiegają agregacji. Zmiany parametrów syntezy tj. stężenia soli, stabilizatorów czy stosunek molowy soli metalu i reduktora, a także dobór wartości pH, temperatury, czasu syntezy i środowiska reakcji pozwalają kontrolować morfologię nanocząstek – ich kształt, rozmiar, stabilność i stan agregacji [11]. Ta, jak się wydaje, szybka, łatwa i efektywna metoda, stosowana głównie do produkcji nanocząstek metalicznych, okazuje się być niebezpieczną dla środowiska naturalnego oraz dla osoby przeprowadzającej syntezę ze względu na szkodliwość wykorzystywanych związków chemicznych [5]. Odrębna kwestią jest też biokompatybilność otrzymanych NPs, niezwykle istotna właściwość nowo otrzymanych struktur, która pozwala na ich stosowanie w układach biologicznych. Po syntezie typu *bottom-up* mogą występować pozostałości toksycznych roztworów, co dyskredytuje taką strukturę do zastosowań biomedycznych [12, 13].

Zielona synteza nanocząstek srebra

Alternatywą dla technik fizycznych i chemicznych jest tworzenie NPs srebra metodą tzw. zielonej syntezy, zgod-

nej z założeniami nowego trendu zwanego „zieloną chemią” (ang. *green chemistry*). Koncepcja ta skupia się na uzyskaniu energooszczędnych i mniej kosztownych procesów oraz ograniczeniu lub całkowitym wyeliminowaniu toksycznych reagentów podczas eksperymentów i zastąpieniu ich elementami biologicznymi, które są przyjazne środowisku [14, 15]. Wykorzystanie metod zielonej chemii w technologiach chemicznych staje się coraz bardziej popularne i powszechne na całym świecie ze względu na wzrastające problemy z utylizacją toksycznych i niebezpiecznych dla środowiska naturalnego odpadów [14]. Ponadto jest to koncepcja opłacalna i łatwa do zastosowania w syntezach na skalę przemysłową [16, 17]. Niemniej ważnym aspektem jest pożądana biozgodność wytworzonych nanocząstek i brak szkodliwych efektów na tkanki człowieka w zastosowaniach medycznych [18].

Metody oparte na zielonej syntezie wykorzystują prekursory nanocząstek (np. azotan srebra dla AgNPs) oraz naturalne polimery jako czynniki redukujące i stabilizujące, występujące powszechnie w środowisku. Procedura powstawania nanocząstek zawiera kilka kluczowych etapów (Ryc. 1):

- 1) etap aktywacji – redukcja jonów metali i nukleacja zredukowanych atomów metalu;
- 2) etap wzrostu – spontaniczne połączenie małych nanocząsteczek w cząstki o większym rozmiarze;
- 3) etap zakończenia – faza trwająca do czasu przyjęcia ostatecznego stabilnego rozmiaru i kształtu [19].

Niezmiernie ważnym krokiem jest rzetelna charakterystyka otrzymanych nanocząstek, która dostarcza informacji na temat wielkości, struktury, morfologii, kształtu, dyspersji, ładunku powierzchniowego i składu chemicznego. Powszechnie wykorzystuje się do tego metody z użyciem spektroskopii UV-Vis, skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM), transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM), spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) oraz analizę dyfrakcji rentgenowskiej (XRD) i pomiar potencjału Zeta [13, 20].

Istnieje szeroki wachlarz zasobów biologicznych stosowanych do biosyntezy nanocząstek. Zalicza się do nich bakterie, grzyby, drożdże, algi, rośliny, wirusy, materiały pochodzenia zwierzęcego [12, 21], a nawet miód [22, 23]. Poniżej opisano kilka przykładów wykorzystania elementów biologicznych do przeprowadzenia efektywnej biosyntezy AgNPs.

Biosynteza AgNPs z wykorzystaniem bakterii

Dane literaturowe potwierdzają możliwość wykorzystania aktywności zewnętrznej lub wewnątrzkomórkowej bakterii do syntezy nanocząstek nieorganicznych. Pierwsza z tych metod jest szybsza i bardziej ekonomiczna ze względu na brak konieczności stosowania odpowiednich detergentów lub obróbki ultradźwiękowej w celu uwolnienia zsyntetyzowanych NPs, w porównaniu do biosyntezy wewnątrzkomórkowej [24].

Jedną z metod prowadzących do synte-

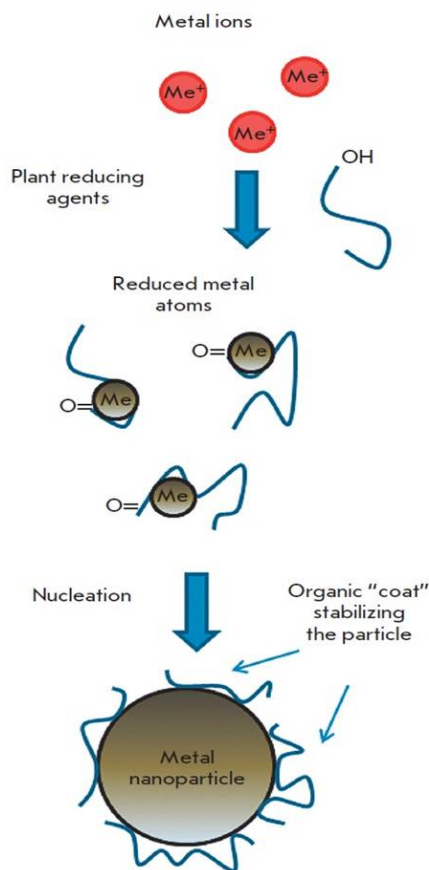
zy stabilnych AgNPs o rozmiarze 40 nm jest bioredukcja wolnych jonów srebra (pochodzących z Ag^+NO_3^-) z użyciem supernatantu z hodowli niepatogenicznej bakterii *Bacillus licheniformis* [25]. Dodatkowe zastosowanie supernatantu z hodowli *Bacillus subtilis* i promieniowania mikrofalowego w wodzie powoduje zewnątrzkomórkową syntezę monodispersyjnych nanocząstek srebra o wielkości 5-50 nm, a także zwiększenie szybkości reakcji i uniknięcie niepożądanego agregacji [26]. Wydajną syntezę AgNPs otrzymuje się dzięki wykorzystaniu odpornego na srebro szczepu *Pseudomonas stutzeri* AG259, wyizolowanego z kopalni srebra. Mikroorganizm ten przy niskich stężeniach jonów srebra wydajnie akumuluje wewnątrzkomórkowe nanocząstki srebra o wielkości 35-46 nm [27]. Przy wysokiej koncentracji tego prekursora w czasie hodowli otrzymuje się cząstki w zakresie od kilku do 200 nm. Wówczas *P. stutzeri* uruchamiając mechanizm obronny wytrąca srebro w przestrzeniach periplazmatycznych i redukuje jony do postaci pierwiastkowej, charakteryzującej się sześciokątną topologią lub postacią trójkątów równobocznych. Przestrzeń periplazmatyczna ogranicza grubość kryształów, ale nie ich szerokość, która może sięgać 100-200 nm [28]. Innym przykładem zdolności do biosyntezy AgNPs w odpowiedzi na obecność jonów srebra są bakterie kwasu mlekowego powszechnie występujące w maślanie. Cukry i enzymy zawarte w ścianie komórkowej szczepu *Lactobacillus* powodują zarodkowanie AgNPs na powierzchni komórek, które

potem przemieszczają się do wnętrza komórki, ulegają tam agregacji i łączą się w większe cząstki. Pojedyncze nanocząstki wytworzone z użyciem tego mikroorganizmu osiągają 25-50 nm, a w agregatach 100 nm. Cechuje je kulisty kształt i wewnątrz- lub zewnątrzkomórkowe występowanie [29]. Kolejne doniesienia wskazują na pomyslną redukcję wodnych jonów Ag^+ z zastosowaniem supernatantów hodowli bakterii *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* oraz *Escherichia coli*. W tych przypadkach obserwuje się wytworzenie NPs już po 5 minutach od dodania prekursora i przypuszcza się, że do bioredukcji przyczyniają się enzymy nitroreduktazy [30]. Dane literaturowe podają także sprzyjający wpływ *Aeromonas* sp. SH10 i *Corynebacterium* sp. SH09 na powstawanie NPs [31].

Podczas stosowania żywych kultur mikroorganizmów do syntezy AgNPs, mogą rodzić się też pewne ograniczenia utrudniające ich produkcję. Należą do nich: utrzymanie wysoce sterylnych warunków, temperatury w zakresie 30-37°C potrzebnej do utrzymania hodowli. Podobnie, trzeba przeprowadzić dodatkowe metody zapewniające odzyskanie wytworzonych nanocząstek, w tym często również „wydobycie ich” z wnętrza komórek, czego nie obserwuje się podczas syntezy z udziałem ekstraktów bezkomórkowych [13].

Biosynteza AgNPs z wykorzystaniem ekstraktów roślinnych

Zielona synteza z udziałem ekstraktów roślinnych okazuje się być obiecująca



Ryc. 1. Schematyczne przedstawienie syntezy nanocząstek metalu w ekstrakcie roślinnym [19].

ze względu na szybką, ekonomiczną, niepatogenną oraz jednoetapową metodę. Połączenie Ag^+NO_3^- i biomolekuł powszechnie występujących w roślinach prowadzi do powstawania AgNPs [32]. Istnieje kilka propozycji na temat mechanizmu odpowiedzialnego za bioredukcję srebra. Stwierdza się, że poszczególne aminokwasy mają różną zdolność do wiązania się z jonami metalu. Jedna z grup badawczych wykazała, że lizyna, cysteina, arginina i metionina łączą się z jonami srebra i dokonują ich redukcji. Natomiast asparaginian redukuje kwas tetrachlo-

roaurynowy, co prowadzi do formowania się AgNPs. Po dogłębnej analizie 20 naturalnie występujących α -amino-kwasów dowodzi się, że wiążą się one z jonami metali poprzez grupy aminowe i karboksylowe łańcucha głównego lub przez łańcuchy boczne, tj. grupy karboksylowe kwasu asparaginowego, kwasu glutaminowego oraz grupy tiolowe czy aminowe lub atom azotu w pierścieniu imidazolowym histydyny [33]. Inna teoria wskazuje na fakt, iż kluczową rolę w syntezie AgNPs odgrywają fitochemikalia, m.in. flawonoidy, terpenoidy, polifenole, alkaloidy, aldehydy, cukry, kwasy fenolowe, które po rozpuszczeniu w wodzie działają zarówno jako reduktory jak i naturalne stabilizatory nowo powstałych produktów, bez konieczności dodawania syntetycznych odczynników. Flawonoidy chelatują i redukują jony metali poprzez obecność grup funkcyjnych i proces przekształcania enoli do ketonów, w wyniku czego formują się AgNPs. Zauważono również, że cukry obecne w ekstraktach roślinnych są w stanie indukować tworzenie NPs. Monosacharydy w postaci liniowej lub zawierające grupę aldehydową (np. glukoza) są bardziej efektywnymi reduktorami jonów metali niż monosacharydy zawierające grupę ketonową, np. fruktoza, która musi najpierw ulec przekształceniom tautomerycznym od ketonu do aldehydu i tylko wówczas działa jako przeciwutleniacz. Wiadomo jest też, że stosowanie glukozy jako reduktora skutkuje tworzeniem się NPs o różnej morfologii, podczas gdy w przypadku fruktozy obserwuje się tylko monodispersyjne struktury [19].

Znanych jest wiele roślin zawierających aktywne cząsteczki, z udziałem których udokumentowano zdolność przeprowadzania biosyntezy nanocząstek srebra. Procedura powstawania tychże „nanoproduktów” jest łatwa i na równi wydajna z syntezą chemiczną czy fizyczną, a ich właściwości są zależne od gatunku zastosowanej rośliny. Nie sposób wymienić wszystkich roślin użytych dotychczas do zielonej syntezy AgNPs. W zależności od szerokości geograficznej wykorzystuje się zasoby naturalne charakterystyczne dla danych regionów na kuli ziemskiej. Do biosyntezy AgNPs otrzymuje się ekstrakty z różnych części roślin, np.: liści *Andrographis paniculata*, *Artemisia nilagirica*, *Mentha piperita*, kwiatów *Mirabilis jalapa* czy *Matricaria chamomilla* [34], owoców *Caria papaya*, łupin *Citrus sinensis*, bulw *Dioscorea bulbifera* [20], nasion *Pistacia atlantica*, *Trachyspermum ammi*, *Argyreia nervosa* [5], a także kory, korzeni, łodyg, łupin i kalusa innych roślin. Co więcej, istnieje możliwość sterowania rozmiarami i morfologią wytworzonych nanocząstek poprzez dobranie odpowiednich warunków środowiska, np. stężenia substratu, natężenia światła, temperatury, pH, szybkości wstrząsania, donora elektronów (np. glukozy lub fruktozy) czy długości czasu ekspozycji [31]. Wytworzone produkty nabywają dodatkowe, pożądane cechy, tj. aktywność antybakteryjną, antywirusową i antynowotworową [35]. Pomimo wielu zalet wykorzystania ekstraktów roślinnych istnieją również pewne ograniczenia. Głównymi są różnice w składzie chemicznym eks-

traktów roślinnych pochodzących z tych samych gatunków, które są zbierane z różnych części świata. Może to być przyczyną otrzymania odmiennych wyników w niezależnych laboratoriach [5].

Biosynteza AgNPs z udziałem miodu

Szczególne właściwości chemiczne miodu sprawiają, że jest on z powodzeniem wykorzystywany do zielonej syntezy nanocząstek. Zawiera bowiem związki, które przyczyniają się do efektywnej biosyntezy, do których należą: węglowodany (np. fruktoza), białka, witaminy, związki fenolowe (kwas elagowy, kawowy, p-kumarowy, felurowy) oraz związki bioaktywne np. kwas askorbinowy, tokoferole, katalaza, dysmutaza ponadutlenkowa. W literaturze dostępnych jest wiele danych potwierdzających wydajną syntezę nanocząstek srebra w temperaturze pokojowej z użyciem miodu. Środkiem redukującym jest w tym przypadku fruktoza, a stabilizującym – białka, które wiążą się z nanocząstkami poprzez grupy karboksylowe. Otrzymane przez jedną z grup badawczych tym sposobem NPs są stabilne przez 5 miesięcy bez potrzeby dodawania innych stabilizatorów. Natomiast morfologia i rozmiar nowo powstałych struktur są uzależnione od rodzaju i stężenia zastosowanego miodu. Ponadto obserwuje się odwrotną korelację co do wzrostu wartości pH oraz stężenia miodu, a rozmiarów otrzymanych NPs [22]. Badania prowadzone przez Haiza H. i in. potwierdzają, że przy użyciu 10 g

miodu powstały AgNPs o wielkości w zakresie 18,98-26,05 nm, a przy zastosowaniu 40 g miodu ich rozmiar zmalał do 15,63-17,86 nm. AgNPs otrzymane tą metodą cechuje ponadto aktywność antybakteryjna i przeciugrzybicza [36].

Zastosowanie AgNPs w biomedycynie

Nanocząstki srebra mają mnóstwo zastosowań praktycznych, m.in. w medycynie, kosmetologii, ochronie środowiska i różnych sektorach gospodarki. Eksperti z zakresu biotechnologii wykorzystują ich unikatowe właściwości, dostarczając szereg rozwiązań dla biomedycyny. AgNPs cechują się bakteriobójczym lub bakteriostatycznym działaniem, co jest szczególnie pożądane w dzisiejszych czasach, kiedy wzrasta częstość stosowania antybiotyków i przez to kształcą się szczepy antybiotkooporne, będące poważnym zagrożeniem dla społeczeństwa. Obiecujące stają się zatem terapie z udziałem AgNPs, które są skuteczne zarówno przeciw bakteriom Gram-dodatnim (np. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792), jak i Gram-ujemnym (np. *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028). W literaturze odnotowano kilka teorii wyjaśniających mechanizm niszczenia komórek bakteryjnych przez nanocząstki. Zauważono, że AgNPs mają zdolność wielokierunkowego działania na mikroorganizmy. Niniejsze meta-

liczne struktury mogą zakotwiczać się w błonie komórkowej bakterii powodując jej permeabilizację, czyli częściową przepuszczalność [37]. W sytuacji gdy AgNPs wnika do wnętrza komórki, oddziałują ze strukturami komórkowymi i cząsteczkami biologicznymi, np. lipidami, białkami czy DNA, co w konsekwencji ma szkodliwy wpływ na drobnoustroje. Przykładem, który to potwierdza, są interakcje nanocząstek z rybosomami prowadzące do denaturacji tychże organelli, hamowania translacji i syntezy białek. Co więcej, nanocząstki upośledzają funkcjonowanie łańcucha oddechowego, negatywnie wpływają na podziały komórkowe i aktywność licznych enzymów, w szczególności tych bogatych w aminokwasy zawierające siarkę w swoim składzie. Udowodniono, że uwolnione jony srebra mogą tworzyć stabilne wiązania z grupami tiolowymi (-SH) białek obecnych w błonie komórkowej i powodować ich dezaktywację. Istotne znaczenie ma budowa ściany komórkowej, bowiem jej struktura, zawierająca mniejsze ilości peptydoglikanu u bakterii Gram-ujemnych, ułatwia dostęp Ag^+ do błony komórkowej w porównaniu z bakteriami Gram-dodatnimi. Dowiedziono również, że potencjał przeciwbakteryjny AgNPs jest związany z indukcją wytwarzania przez nie wolnych rodników i reaktywnych form tlenu (ROS), a to prowadzi do powstawania stresu oksydacyjnego w komórkach [38]. Ponadto preparaty zawierające w swoim składzie nano-srebro wykazują działanie przeciw grzybom należącym do gatunku *Candida*, odpowiedzialnym za najczęściej

występujące grzybiczne infekcje u pacjentów. Struktury te działają też jako fungicydy przeciwko grzybom z rodzaju *Aspergillus* i *Saccharomyces*. AgNPs oddziałują także z HIV-1, wiążąc się do glikoprotein gp120, tym samym zapobiegając wiązaniu się wirusa z komórkami gospodarza. Dzięki wyżej wymienionym właściwościom, obecność AgNPs staje się nieoceniona w wielu aplikacjach medycznych, począwszy od opatrunków na rany, implantów, materiałów wykorzystywanych w ortopedii, po tkaniny oraz wszelkie urządzenia medyczne, które powleka się tymi strukturami w celu utrzymania odpowiedniej higieny. Przeprowadzone badania udowadniają, że NPs indukują apoptozę w wybranych komórkach nowotworowych, są skuteczne w oczyszczaniu ścieków i wykorzystywane w konstruowaniu różnego rodzaju biosensorów. Wymienione aplikacje to jedynie niewielka część spośród wszystkich cennych zastosowań nano-srebra [39].

Podsumowanie

Zasoby naturalne oferują wiele możliwości wykorzystania ich do tworzenia zminiaturyzowanych materiałów funkcjonalnych. Rosnąca świadomość społeczeństwa sprawia, że naukowcy i producenci coraz częściej sięgają po metody syntezy nanocząstek metalicznych opartych na zielonej chemii. Nanocząstki srebra to niezmiernie ciekawe obiekty, które cieszą się ogromnym zainteresowaniem ze względu na swoje szczególne właściwości fizyczne i chemiczne pożądane

w nauce, medycynie i wielu innych sektorach przemysłu, a antybakteryjne działanie AgNPs jest wysoce cenione w dobie rozpowszechniającej się antybiotykkooporności różnych szczepów bakterii. Równie istotne są także antynowotworowe i przeciwgrzybicze właściwości tychże cząsteczek. Pomimo wielu zalet, jakie przynosi biosynteza z wykorzystaniem organizmów biologicznych, istnieją też pewne ograniczenia, na które należy zwrócić uwagę podczas optymalizacji procesów syntezy. Niemniej jednak, używanie ekologicznych substancji jako reduktorów i stabilizatorów w procesie tworzenia się AgNPs cieszy się coraz większym powodzeniem i w związku z tym wykorzystanie ich może ograniczyć lub całkowicie wyprzeć stosowanie niebezpiecznych chemikaliów do syntezy AgNPs.

Bibliografia:

[1] Salata O. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J Nanobiotechnology*. 2004;2(1):3.

[2] Laurent S, Forge D, Port M, et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev*. 2008;108(6):2064-110.

[3] Feynman RP. There's Plenty of Room at the Bottom. *Engineering and Science*. 1960;23(5):22-36.

[4] Khan I, Saeed K, Khan I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*. 2017.

[5] Ahmed S, Ahmad M, Swami BL, Ikram S. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *J Adv Res*.

2016;7(1):17-28.

[6] Maruyama M, Matsubayashi R, Iwakuro H, Isoda S, Komatsu T. Silver nanosintering: a lead-free alternative to soldering. *Appl. Phys. A*. 2008; 93(2): 467-470.

[7] Wei D, Qian W. Facile synthesis of Ag and Au nanoparticles utilizing chitosan as a mediator agent. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2008;62(1):136-142.

[8] Larue C, Castillo-michel H, Sobanska S, et al. Foliar exposure of the crop *Lactuca sativa* to silver nanoparticles: evidence for internalization and changes in Ag speciation. *J Hazard Mater*. 2014;264:98-106.

[9] Boufi S, Belhaaj S, Magnin A, Pignon F, Impérator-clerc M, Mortha G. Ultrasonic assisted production of starch nanoparticles: Structural characterization and mechanism of disintegration. *Ultrason Sonochem*. 2018;41:327-336.

[10] Schröfel A, Kratošová G, Šafařík I, Šafaříková M, Raška I, Šor LM. Applications of bio-synthesized metallic nanoparticles - a review. *Acta Biomater*. 2014;10(10):4023-42.

[11] Malina D, Sobczak-Kupiec A, Kowalski Z. Nanocząstki srebra-przegląd chemicznych metod syntezy. *Czasopismo Techniczne. Chemia*. 2010; 107: 183-192.

[12] Rodríguez-Luis, Osvelia E, Hernandez-Delgadillo R, et.al. Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Bactericidal and Antimycotic Activities against Oral Microbes. *Journal of Nanomaterials*. 2016; 3:1-10.

[13] Agarwal H, Venkat Kumar S, Rajeshkumar S. A review on green synthesis of zinc oxide nanoparticles - An eco-friendly approach. *Resource-Efficient Technologies*. 2017; 3(4): 406-413.

[14] Reddy GAK, Joy JM, Mitra T, et al. Nano silver - a review. *Int J Adv Pharm*. 2012;2(1):09-15.

[15] Duan H, Wang D, Li Y. Green chemistry for nanoparticle synthesis. *Chem Soc Rev*. 2015;44(16):5778-92.

- [16] Dhuper S, Panda D, Nayak PL. Green synthesis and characterization of zero valent iron nanoparticles from the leaf extract of *Mangifera indica*. *Nano Trends: J Nanotech App*. 2012;13(2):16-22.
- [17] Zhang Y, Cheng X, Zhang Y, Xue X, Fu Y. Biosynthesis of silver nanoparticles at room temperature using aqueous aloe leaf extract and antibacterial properties. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2013; 423:63-68.
- [18] Velusamy P, Kumar GV, Jeyanthi V, Das J, Pachaiappan R. Bio-Inspired Green Nanoparticles: Synthesis, Mechanism, and Antibacterial Application. *Toxicol Res*. 2016;32(2):95-102.
- [19] Makarov VV, Love AJ, Sinitsyna OV, et al. "Green" nanotechnologies: synthesis of metal nanoparticles using plants. *Acta Naturae*. 2014;6(1):35-44.
- [20] Rajeshkumar S, Bharath LV. Mechanism of plant-mediated synthesis of silver nanoparticles - A review on biomolecules involved, characterisation and antibacterial activity. *Chem Biol Interact*. 2017; 273:219-227.
- [21] Shamim N, Sharma VK. Sustainable Nanotechnology and the Environment: Advances and Achievements. OUP USA; 2014.
- [22] Balasooriya ER, Jayasinghe CD, Jayawardena UA, Ruwanthika, Ranasinghe WD, Mndis de Silva R, Udagama PV. Honey Mediated Green Synthesis of Nanoparticles. *New Era of Safe Nanotechnology. Journal of Nanomaterials* 2017; 3:1-10.
- [23] Philip D. Honey mediated green synthesis of silver nanoparticles. *SpectrochimActa A Mol Biomol Spectrosc*. 2010;75(3):1078-81.
- [24] Deljou A, Goudarzi S. Green Extracellular Synthesis of the Silver Nanoparticles Using Thermophilic *Bacillus* Sp. AZ1 and its Antimicrobial Activity Against Several Human Pathogenic Bacteria. *Iran J Biotechnol*. 2016;14(2):25-32.
- [25] Kalishwaralal K, Deepak V, Ramkumarpan-dian S, Nellaiah H, Sangiliyandi G. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by the culture supernatant of *Bacillus licheniformis*. *Materials Letters*. 2008; 62(29):4411-4413.
- [26] Saifuddin N, Wong CW, Yasumira, AA Nur. Rapid Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Culture Supernatant of Bacteria with Microwave Irradiation. *E-Journal of Chemistry*. 2009; 6(1):61-70.
- [27] Slawson RM, Van dyke MI, Lee H, Trevors JT. Germanium and silver resistance, accumulation, and toxicity in microorganisms. *Plasmid*. 1992;27(1):72-9.
- [28] Klaus-Joerger T, Joerger R, Olsson E, Granqvist CG. Bacteria as workers in the living factory: metal-accumulating bacteria and their potential for materials science. *Trends Biotechnol*. 2001;19:15-20.
- [29] Korbekandi H, Irvani S, Abbasi S. Optimization of biological synthesis of silver nanoparticles using *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. *J Chem Technol Biotechnol*. 2012;87(7):932-937.
- [30] Shahverdi AR, Minaeian S, Shahverdi HR, Jamalifar H, Nohi A. Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of *Enterobacteria*: A novel biological approach *Process Biochemistry*. 2007;42(5):919-923.
- [31] Irvani S, Korbekandi H, Mirmohammadi SV, Zolfaghari B. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Res Pharm Sci*. [2014;9(6):385-406.
- [32] Kulkarni N, Muddapur U. Biosynthesis of Metal Nanoparticles: A Review. *Journal of Nanotechnology*. 2014(2):1-8.
- [33] Glusker J., Katz A., Bock C. Metal ions in biological systems. *Rigaku J*. 1999;16(2):8-16.
- [34] Parlinska-Wojtan M, Kus-Liskiewicz M, Depciuch J, Sadik O. Green synthesis and antibacterial effects of aqueous colloidal solutions of silver nanoparticles using chamomile terpenoids as a combined reducing and capping agent. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2016;39(8):1213-23.

- [35] Bagherzade G, Tavakoli MM, Namaei MH. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of saffron (*Crocus sativus* L.) wastages and its antibacterial activity against six bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2017; 7(3): 227-233.
- [36] Haiza H, Azizan A, Mohidin AH, Halin DSC. "Green synthesis of silver nanoparticles using local honey," *Nano Hybrids*, 2013; 4(87-98).
- [37] Okafor F, Janen A, Kukhtareva T, Edwards V, Curley M. Green synthesis of silver nanoparticles, their characterization, application and antibacterial activity. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(10):5221-38.
- [38] Dakal TC, Kumar A, Majumdar RS, Yadav V. Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. *Front Microbiol*. 2016;7:1831.
- [39] Khatoon N, Mazumder JA, Sardar M. Biotechnological Applications of Green Synthesized Silver Nanoparticles. *J Nanosci Curr Res* 2017; 2: 107.

Identyfikacja i analiza metycylinooporności flory gronkowcowej jamy nosowej psów

Kamila Dubrowska, Marta Stolarczyk, Kornela Sybidło

Studenckie Koło Naukowe Mikrobiologów

Katedra Immunologii, Mikrobiologii i Chemii Fizjologicznej

Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

stolarczyk_marta@zut.edu.pl

Praca napisana pod opieką dr hab. Jolanty Karakulskiej

Florę fizjologiczną jamy nosowej psów reprezentują przede wszystkim przedstawiciele typów *Proteobacteria*, *Firmicutes* czy *Bacteroidetes*. Spośród *Firmicutes* duże znaczenie kliniczne i epidemiologiczne mają gronkowce - *Staphylococcus* spp., stanowiące jeden z ważniejszych czynników etiologicznych zakażeń u zwierząt, jak i u ludzi. Zwierzęta mogą być nosicielami lub mogą być zakażone gronkowcami, w tym szczepami opornymi na metycylinę. Metycylinooporne gronkowce wykazują brak wrażliwości na działanie antybiotyków beta-laktamowych, co ogranicza możliwości terapeutyczne w przebiegu infekcji gronkowcowych. Celem pracy była izolacja gronkowców z jam nosowych zdrowych psów oraz ich identyfikacja i analiza oporności na metycylinę. Materiałem do badań były wymazy pobrane z jam nosowych 14 psów, w tym 5 psów utrzymywanych w warunkach domowych i 9 psów przebywających w schronisku. Fenotypową identyfikację gronkowców przeprowadzono na podstawie ich właściwości morfologicznych i hodowlanych, tj. zdolności do rozkładu mannitolu, właściwości hemolitycznych, obecności katalazy i czynnika skupiania CF oraz produkcji koagulazy. Ponadto, przynależność bakterii do rodzaju *Staphylococcus* potwierdzano amplifikacją genu *gap*, a ich identyfikację gatunkową określano techniką PCR-RFLP genu *gap* z użyciem enzymu restrykcyjnego AluI. Wrażliwość szczepów na metycylinę analizowano metodą dyfuzyjno-krążkową, zgodnie z zaleceniami EUCAST. Genetyczne uwarunkowanie metycylinooporności określano na podstawie obecności genu *mecA*. Spośród wyizolowanych 14 gronkowców zidentyfikowano: 7 (50%) izolatów *S. equorum* / *S. succinus*, 2 (14%) izolaty *S. caprae*, 1 (7%) izolat *S. aureus*, 1 (7%) izolat *S. xylosus*, 1 (7%) izolat *S. delphini* / *S. intermedius* / *S. pseudintermedius*, 1 izolat (7%) *S. petrasii* oraz 1 (7%) izolat *S. xylosus*. U żadnego z analizowanych gronkowców nie stwierdzono oporności na metycylinę. Podsumowując, kolonizacja jamy nosowej zdrowych psów przez gronkowce dotyczyła połowy badanych zwierząt. Flora gronkowcowa jamy nosowej psów była zróżnicowana gatunkowo, jednakże

dominowały gronkowce koagulazoujemne. U badanych psów nie wykazano nosicielstwa metycylinoopornych gronkowców.

Przegląd literatury

Gronkowce to Gram-dodatnie ziarniaki o średnicy 0,5 – 1,5 μm . Należą do typu *Firmicutes*, klasy *Bacilli*, rzędu *Bacillales*, rodziny *Staphylococcaceae* i rodzaju *Staphylococcus*, w obrębie którego wyróżnia się 52 gatunki i 28 podgatunków [1]. Biorąc pod uwagę zdolność gronkowców do produkcji koagulazy, dokonano ich podziału na koagulazododatnie (*coagulase-positive staphylococci*, CPS) i koagulazoujemne (*coagulase-negative staphylococci*, CNS). Do koagulazododatnich gronkowców należą: *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. delphini*, *S. lutrae*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* oraz *S. hyicus* [2].

Gronkowce kolonizują skórę, błony śluzowe oraz przewód pokarmowy, układ oddechowy, moczowo-płciowy i kanały słuchowe ludzi i zwierząt. Większość z nich stanowi fizjologiczną mikrobiotę, tj. wchodzi w skład społeczności mikroorganizmów komensalnych, symbiotycznych i patogennych egzystujących w organizmach [39]. Jednakże w pewnych warunkach bakterie te mogą powodować zakażenia oraz wiele jednostek chorobowych. Przenoszone są one drogą powietrzno-kropelkową, powietrzno-pyłową oraz przez kontakt bezpośredni [2].

Nosicielstwo to stałe lub przejściowe występowanie chorobotwórczych mikroorganizmów w organizmie zdrowego człowieka czy zwierzęcia,

pozostających w stanie równowagi z fizjologiczną mikrobiotą organizmu. Najczęściej izolowanymi mikroorganizmami z jam nosowych psów są: *Moraxella* spp., *Phyllobacterium* spp., *Cardiobacteriaceae* oraz *Staphylococcus* spp. [4]. Wśród rodzaju *Staphylococcus*, głównymi przedstawicielami mikrobioty nosogardzieli u psów są *S. aureus* i *S. epidermidis* [4]. Ponadto, często izolowane są takie drobnoustroje jak: *Micrococcus* sp., α -hemolizujące paciorkowce i *Acinetobacter* spp., oraz, sporadycznie, *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas* spp., *Alcaligenes* spp. [5]. Za większość infekcji gronkowcowych odpowiedzialne są CPS, głównie *S. aureus*. Jednakże zarówno u ludzi, jak i u zwierząt odnotowuje się wzrost częstości zakażeń o etiologii CNS. Zwykle zakażenia te dotyczą osobników z zaburzeniami układu odpornościowego, po zabiegach chirurgicznych, podczas których zostały zaaplikowane ciała obce. Do CNS najczęściej wywołujących zakażenia u człowieka należą: *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. lugdunensis*, rzadziej *S. hominis*, *S. saccharolyticus*, *S. simulans*, *S. capitis* i sporadycznie *S. auricularis* [2]. Natomiast spośród CNS będących przyczyną infekcji gronkowcowych u zwierząt należy wymienić m.in. *S. epidermidis*, *S. sciuri*, *S. xylosus* i *S. chromogenes* [3]. Coraz częstszy problem kliniczny i epidemiologiczny sta-

nowią lekooporne bakterie, w tym gronkowce odporne na metycylinę. Problem metycylinooporności został zaobserwowany po raz pierwszy w 1980 roku. Metycylinooporne szczepy są dużym zagrożeniem dla zdrowia ludzi i zwierząt, ze względu na ograniczone możliwości terapeutyczne w przypadku zakażeń o etiologii tych szczepów. Metycylinooporność pociąga za sobą bowiem brak wrażliwości bakterii na wszystkie antybiotyki β -laktamowe: penicyliny, penicyliny z inhibitorami β -laktamaz, karbapenemy, cefalosporyny i monobaktamy [6].

Jednakże problem nosicielstwa metycylinoopornych szczepów gronkowców dotyczy nie tylko ludzi. Izolacji metycylinoopornych szczepów *S. aureus* (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) z psów dokonano w latach 90. XX wieku. Wykazano, że psy oraz ludzie mogą być nosicielami tych samych szczepów pod względem genetycznym [8]. Obecność MRSA u zwierząt jest najczęściej skutkiem stosowania antybiotyków [9]. Ponadto, zwierzęta mogą ulegać zakażeniom poprzez bezpośredni kontakt lub w trakcie zabiegów chirurgicznych. Problemem jest też częste nosicielstwo tego patogenu u pracowników gabinetów weterynaryjnych [10].

Metycylinooporność dotyczy nie tylko *S. aureus*, ale również koagulazoujemnych gronkowców. Przedstawicielem CNS, u którego często stwierdza się metycylinooporność jest *S. epidermidis*. Wykazano, że 90% szczepów tego gatunku izolowanych z przypadków klinicznych od ludzi cechuje oporność na metycylinę [11]. Zdrowe psy są czę-

sto kolonizowane przez szczepy MRCNS (*methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci*, metycylinooporne koagulazoujemne gronkowce). Najliczniej izolowanym od psów gatunkiem MRCNS jest *S. haemolyticus* [12]. Z kolei wśród krów z zapaleniem gruczołu mlekowego najczęściej izolowane są MRCNS należące do gatunków: *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* i *S. capitis* [13].

Zjawisko metycylinooporności może się rozprzestrzeniać wśród gronkowców z powodu ich zdolności do horyzontalnego transferu genów determinujących ten typ oporności. Co więcej, ze względu na możliwość międzygatunkowego transferu lekoopornych szczepów, zjawisko nosicielstwa tych szczepów u ludzi i zwierząt stanowi istotny problem diagnostyczny i epidemiologiczny.

Celem pracy była identyfikacja szczepów *Staphylococcus* spp. zasiedlających jamę nosową zdrowych psów oraz analiza metycylinooporności wyizolowanych gronkowców.

Materiały

Materiał do badań stanowiły wymazy pobrane z jam nosowych 14 psów, w tym od 5 psów mieszkających w warunkach domowych oraz 9 psów przebywających w Schronisku dla Bezdomnych Zwierząt w Szczecinie. Wymazy zostały pobrane przez lekarza weterynarii, z prawego oraz lewego nozdrza, przy użyciu jałowych wymazówek. Wszystkie zwierzęta w momen-

cie pobierania wymazów były zdrowe i w ciągu 30 dni przed badaniem nie przyjmowały antybiotyków. W badaniach wykorzystano następujące szczepy referencyjne: *S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* ATCC 25923 (*American Type Culture Collection*), których użyto w charakterze szczepów kontrolnych podczas przeprowadzania reakcji PCR, PCR-RFLP, a także oznaczania metycylinyoporności wyizolowanych gronkowców.

Metody

Do izolacji gronkowców zastosowano podłoże Mannitol Salt Agar (BioMaxima S.A.). Wyizolowane szczepy przechowywano w -20°C w podłożu Tryptone Soya Broth (Oxoid) z dodatkiem 10% glicerolu. Wstępną identyfikację fenotypową gronkowców przeprowadzano na podstawie morfologii kolonii na podłożu Mannitol Salt Agar, barwienia bakterii metodą Grama i analizy mikroskopowej. Wyizolowane bakterie przesiewano na podłoże Brain Heart Infusion Agar (Scharlau) i inkubowano przez 24 godziny w 37°C. Następnie wykonywano test na katalazę z użyciem 3% H₂O₂ oraz określano obecność czynnika

skupiania (CF) w teście szkiełkowym i zdolność do wytwarzania koagulazy w teście probówkowym z użyciem osocza króliczego (Biomed), zgodnie z zaleceniem producenta. Analizowano również właściwości hemolityczne gronkowców na podłożu Columbia Blood Agar Base (BioMaxima S.A.) z 5% odwłóknionej krwi baraniej (Graso). Po inkubacji hodowli w 37°C przez 24 godziny określano zdolność szczepów do rozkładu erytrocytów. DNA analizowanych szczepów izolowano za pomocą zestawu GeneMATRIX Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit (EURx), zgodnie z procedurą podaną przez producenta. W celu potwierdzenia przynależności wyizolowanych szczepów do rodzaju *Staphylococcus* zastosowano amplifikację genu *gap* techniką PCR. Sekwencje starterów i parametry reakcji PCR zostały zaczerpnięte z pracy Yugueros i wsp. [16]. Skład mieszaniny reakcyjnej zastosowanej do amplifikacji genu *gap* przedstawiono w Tabeli 1. Reakcję PCR prowadzono w termocyklerze PE-QSTAR (Biotechnologie GmbH). Do identyfikacji gatunkowej gronkowców zastosowano analizę restrykcyjną genu *gap* z użyciem enzymu AluI (EURx). Amplikony genu *gap* (930 par

Składnik mieszaniny reakcyjnej PCR	Ilość substratu (µl)
Woda dejonizowana (A&A Biotechnology)	4,55
Master Mix (A&A Biotechnology)	6,25
Starter 1 (0,5 µM)	0,6
Starter 2 (0,5 µM)	0,6
DNA	0,5
Razem	12,5

Tab. 1. Skład mieszaniny reakcyjnej zastosowanej do amplifikacji genu *gap*.

Składnik mieszaniny	Ilość substratu
Woda dejonizowana	19,55 µl
10x Bufor Tango	2,5 µl
BSA	0,25 µl
Enzym <i>AluI</i>	2 U
Produkt PCR	2,5 µl
Razem	25 µl

Tab. 2. Skład mieszaniny reakcyjnej zastosowanej w technice PCR-RFLP.

zasad) i enzym *AluI* inkubowano 4 godziny w 37°C. Skład mieszaniny reakcyjnej (EURx) został przedstawiony w Tabeli 2.

Produkty PCR i PCR-RFLP zostały poddane rozdzielowi elektroforetycznemu w 2% żelu agarozowym (BioMaxima S.A.), z dodatkiem 1% bromku etydyny (2 µl / 90 ml żelu). Do elektroforezy został użyty bufor TBE (Bio-Rad). Rozdziały prowadzono w aparacie Bio-Rad, początkowo przez 15 minut przy napięciu 40V, a następnie przez 45 minut przy napięciu 90V.

Do analizy uzyskanych produktów PCR i PCR-RFLP użyto wzorzec masy cząsteczkowej DNA – Φ X174 (Fermentas). Wyniki rozdzielów elektroforetycznych analizowano za pomocą programu GeneTools (Syngene).

Wzory PCR-RFLP genu *gap*, uzyskane dla analizowanych szczepów gronkowców, porównywano ze wzorami uzyskanymi na podstawie analizy *in silico* RFLP genu *gap* z użyciem enzymu *AluI*, wykonanej dla sekwencji genu *gap* 59 gatunków i podgatunków gronkowców zdeponowanych w GenBank (NEBcutter V2.0). Wzory RFLP genu *gap*, które posłużyły jako wzorzec do

identyfikacji gatunkowej analizowanych gronkowców zostały uzyskane z Katedry Immunologii, Mikrobiologii i Chemii Fizjologicznej ZUT w Szczecinie [17].

Oporność szczepów gronkowców na metycylinę oznaczano przy użyciu metody dyfuzyjno-krążkowej z użyciem krążka z cefoksytyną (30 µg) (BioMaxima S.A.), zgodnie z rekomendacją EUCAST [18]. Do kontroli testu dyfuzyjno-krążkowego zastosowano szczepy: *S. aureus* (ATCC 2151) – szczep MSSA i *S. aureus* (ATCC 43300) – szczep MRSA. Po inkubacji w atmosferze tlenowej przez 18 godzin w 35°C dokonywano pomiaru strefy zahamowania wzrostu wokół krążka z antybiotykiem i interpretowano wyniki zgodnie z rekomendacją EUCAST [18].

Do amplifikacji fragmentu genu *mecA* (162 pary zasad) zastosowano startery i warunki reakcji PCR opisane przez Oliveira i de Lencastre [19]. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w Tabeli 3.

Do kontroli amplifikacji genu *mecA* zastosowano szczep referencyjny *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) oraz *S.*

Składnik mieszaniny reakcyjnej PCR	Ilość substratu (μl)
Woda dejonizowana (A&A Biotechnology)	4,55
Master Mix (A&A Biotechnology)	6,25
Starter 1 (0,5 μM)	0,6
Starter 2 (0,5 μM)	0,6
DNA	0,5
Razem	12,5

Tab. 3. Skład mieszaniny reakcyjnej zastosowanej do amplifikacji genu *mecA*.

aureus ATCC 25923 (MSSA).

Wyniki

Wymazy z jam nosowych zostały pobrane od 14 psów (Tab. 4), w tym 5 psów mieszkających w domach oraz 9 psów przebywających w Schronisku dla Bezdomnych Zwierząt w Szczecinie. Od 2 psów (40%) mieszkających w warunkach domowych wyizolowano 5 szczepów gronkowców (szczepy 1 - 5; Tab. 4, Tab. 6). Z kolei od 5 psów (55%) przebywających w schronisku wyizolowano 9 szczepów gronkowców (szczepy 6 - 14; Tab. 4, Tab. 6). W sumie od 7 psów (50%) wyizolowano 14 szczepów gronkowców. Natomiast w wymazach pobranych od pozostałych 7 psów (50%) nie stwierdzono obecności gronkowców (Tab. 4).

Badane szczepy gronkowców rosły na podłożu Brain Heart Infusion Agar w postaci okrągłych, gładkich kolonii (forma S), o barwie białej, kremowej lub żółtej (Tab. 5). Zdolność do rozkładu mannitolu na podłożu Mannitol Salt Agar oraz zdolność do rozkładu nadtlenu wodoru odnotowano u wszystkich analizowanych gronkowców (Tab. 5). Podczas analizy właściwości hemo-

litycznych wyizolowanych szczepów, słabą strefę przejaśnienia i zazielenienie podłoża wokół kolonii interpretowano jako hemolizę typu alfa, wyraźne przejaśnienie podłoża wokół kolonii jako hemolizę typu beta, a brak przejaśnienia jako hemolizę typu gamma. Wytwarzanie hemolizy typu beta stwierdzono u 3 (21%) szczepów. Natomiast u pozostałych 11 (79%) szczepów odnotowano brak hemolizy (gamma hemoliz) (Tab. 5). U 2 (11%) szczepów stwierdzono zdolność do wytwarzania koagulazy, a u 1 (6%) z nich stwierdzono również obecność czynnika clumping factor (Tab. 5).

W DNA wszystkich 14 wyizolowanych szczepów zidentyfikowano gen *gap*, co potwierdziło ich przynależność do rodzaju *Staphylococcus*.

Do identyfikacji gatunkowej gronkowców zastosowano technikę PCR-RFLP z użyciem enzymu AluI. Uzyskane wzory porównywano ze wzorami RFLP genu *gap* uzyskanymi analizą *in silico* dla sekwencji 55 gatunków i podgatunków gronkowców dostępnych w bazie danych GenBank (9.06.2011). Na podstawie otrzymanych produktów PCR-RFLP o takich samych wzorach restrykcyjnych wyróżniono 6 grup ga-

Wymaz od psa	Pochodzenie psa	Liczba szczepów	Numer szczepu
1	Dom	0	
2	Dom	3	1, 2, 3
3	Dom	0	
4	Dom	2	4, 5
5	Dom	0	
6	Schronisko	2	6,7
7	Schronisko	0	-
8	Schronisko	0	
9	Schronisko	0	
10	Schronisko	3	8, 9, 10
11	Schronisko	1	11
12	Schronisko	0	
13	Schronisko	2	12, 13
14	Schronisko	1	14

Tab. 4. Charakterystyka materiału badawczego.

tunkowych (Tab. 6).

Ustalono przynależność 7 (50%) izolatów do gatunku *S. equorum* lub *S. succinus*, 2 (14%) izolatów do gatunku *S. caprae*, 2 (14%) izolatów do gatunku *S. delphini* lub *S. intermedius* lub *S. pseudintermedius*, 1 (7%) izolatu do gatunku *S. aureus*, 1 (7%) izolatu do gatunku *S. petrasii* oraz 1 (7%) izolatu do gatunku *S. xylosus*. Wyniki identyfikacji gatunkowej gronkowców przedstawiono w Tabeli 6. oraz na Rycinie 1.

Analiza metycylinooporności gronkowców przy użyciu testu dyfuzyjno-krażkowego wykazała wrażliwość wszystkich izolatów na metycylinę. Na Rycinie 2 przedstawiono wynik testu dyfuzyjno-krażkowego z cefoksytiną, wykonanego z referencyjnymi szczepa-

mi MRSA (kontrola dodatnia) oraz MSSA (kontrola ujemna).

Omówienie wyników i dyskusja

Na podstawie przeprowadzonych badań ustalono, że psy ze schroniska były częściej kolonizowane przez gronkowce (55% psów), niż psy mieszkające w domach (40% psów) (Tab. 4). Ze względu na warunki panujące w schronisku i stały kontakt z innymi psami może łatwo dochodzić do transferu bakterii między podopiecznymi schroniska, co potwierdza obecność 6 szczepów przynależnych do gatunku *S. equorum* lub *S. succinus* w jamie nosowej 4 psów. Jednocześnie u żadnego z psów utrzymywanych w warunkach domowych nie stwierdzono

obecności *S. equorum* / *S. succinus*.
 Psy domowe były kolonizowane przez *S. caprae* (40% izolatów), *S. aureus* (20% izolatów), *S. xylosus* (20% izolatów), *S. delphini* / *S. intermedius* / *S. pseudintermedius* (20% izolatów) (Tab. 6). Qekwana [20] analizując mikrobiotę jamy nosowej psów również zidentyfikował *S. aureus*, *S. xylosus* oraz *S. pseudintermedius*. Należy pod-

kreślić, że są to gatunki gronkowców, które są najczęstszym czynnikiem etiologicznym zakażeń u psów. Jednakże analizowane w badaniach własnych wymazy pochodziły z jam nosowych zdrowych psów, bez jakichkolwiek objawów chorobowych. Obecność tych szczepów w jamach nosowych analizowanych psów wskazuje zatem na stan nosicielstwa.

Nr szczepu	Barwa kolonii na podłożu BHIA	Rozkład mannitolu	Katalaza	Hemoliza	Koagulaza	Clumping factor
1	biała	+	+	gamma	-	-
2	kremowa	+	+	gamma	-	-
3	kremowa	+	+	gamma	+	+
4	biała	+	+	beta	-	-
5	biała	+	+	gamma	-	-
6	biała	+	+	gamma	-	-
7	kremowa	+	+	gamma	-	-
8	żółta	+	+	gamma	-	-
9	biała	+	+	beta	-	-
10	kremowa	+	+	beta	+	-
11	biała	+	+	gamma	-	-
12	biała	+	+	gamma	-	-
13	żółta	+	+	gamma	-	-
14	kremowa	+	+	gamma	-	-

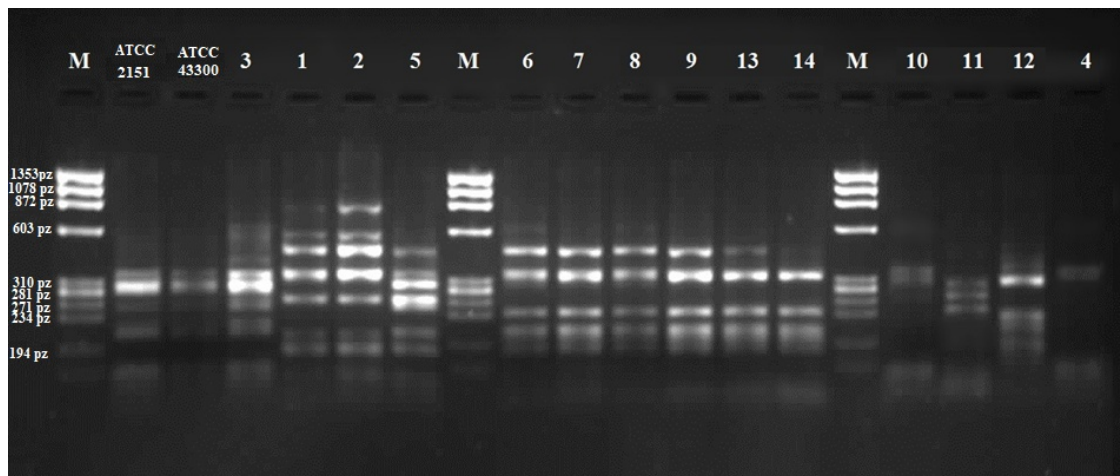
Tab. 5. Właściwości fenotypowe analizowanych gronkowców (+ wynik dodatni, - wynik ujemny).

S. caprae to gatunek pierwotnie wyizolowany z mleka koziego. Zamankhan i in. [34] w swoich badaniach wyizolowali *S. caprae* z zapalenia ucha zewnętrznego u psa. W badaniach własnych ten gatunek wyizolowano z jamy nosowej dwóch psów mieszkających w domu. *S. aureus* jest patogenem u ludzi jak i u zwierząt, może

powodować od lekkich infekcji skóry aż do bakteriemii. Z pracy Leonard i Markey [37] wynika, iż jest to rzadko izolowany gatunek od psów. W badaniach własnych *S. aureus* zidentyfikowano u psa mieszkającego w domu. Szczep *S. xylosus* jest stosowany jako kultura starterowa w produkcji przetworów mięsnych i mleczarskich [30,

Numer analizowanego szczepu	Pochodzenie psa	Grupa gatunkowa	Przynależność gatunkowa
1	Dom	A	<i>S. caprae</i>
2	Dom	A	<i>S. caprae</i>
3	Dom	B	<i>S. aureus</i>
4	Dom	C	<i>S. delphini</i> / <i>S. intermedius</i> / <i>S. pseudintermedius</i>
5	Dom	D	<i>S. xylosus</i>
6	Schronisko	E	<i>S. equorum</i> / <i>S. succinus</i>
7	Schronisko	E	<i>S. equorum</i> / <i>S. succinus</i>
8	Schronisko	E	<i>S. equorum</i> / <i>S. succinus</i>
9	Schronisko	E	<i>S. equorum</i> / <i>S. succinus</i>
10	Schronisko	C	<i>S. delphini</i> / <i>S. intermedius</i> / <i>S. pseudintermedius</i>
11	Schronisko	F	<i>S. petrasii</i>
12	Schronisko	E	<i>S. equorum</i> / <i>S. succinus</i>
13	Schronisko	E	<i>S. equorum</i> / <i>S. succinus</i>
14	Schronisko	E	<i>S. equorum</i> / <i>S. succinus</i>

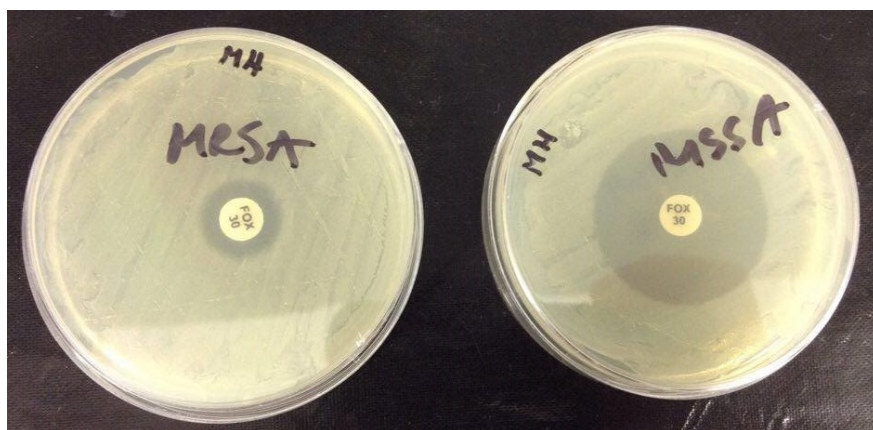
Tab. 6. Identyfikacja gatunkowa gronkowców i źródło ich izolacji.



Ryc. 1. Rozdział elektroforetyczny produktów PCR-RFLP genu *gap* uzyskanych po cięciu enzymem restrykcyjnym *AluI*. Ścieżki: 1, 8, 15: M – wzorzec masy molekularnej DNA ΦX174 (Fermentas); 2: ATCC 2151 (MSSA); 3: ATCC 43300 (MRSA); 4: *S. aureus* (szczep nr 3); 5, 6: *S. caprae* (szczechy nr: 1, 2); 7: *S. xylosus* (szczep nr 5); 9 – 14, 18: *S. equorum* / *S. succinus* (szczechy nr: 6, 7, 8, 9, 13, 14, 12); 16, 19: *S. delphini* / *S. intermedius* / *S. pseudintermedius* (szczechy nr: 10, 4); 17: *S. petrasii* (szczep nr 11).

31]. Singh i Jain [38] zidentyfikowali ten gatunek jako czynnik etiologiczny zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych po ugryzieniu przez psa. Z kolei z badań przeprowadzonych przez Cox i in. [35] wynika, że szczepy tego gatunku występują w mikrobiocie skóry psa. Natomiast Medleau i in. [36] wyizolowali *S. xylosus* ze skórnych zmian rop-

nych psów. W badaniach własnych wykazano obecność jednego szczepu tego drobnoustroju w jamie nosowej psa mieszkającego w domu. Od psów pochodzących ze schroniska wyizolowano: 7 (77%) szczepów *S. equorum* / *S. succinus*, 1 (11%) szczep *S. petrasii* i 1 (11%) szczep *S. delphini* / *S. intermedius* / *S. pseudintermedius* (Tab. 6).



Ryc. 2. Schemat działania cefoksytyny na szczepy odporne na cefoksytynę (szczep MRSA, ATCC 43300) oraz wrażliwe na cefoksytynę (szczep MSSA, ATCC 2151).

Należy zaznaczyć, iż wysoka homologia sekwencji genu *gap* u gatunków *S. equorum* i *S. succinus*, a także *S. delphini*, *S. intermedius* i *S. pseudintermedius* uniemożliwia ich różnicowanie wewnątrzgatunkowe metodą PCR-RFLP z użyciem enzymu restrykcyjnego AluI [17].

Szczepy należące do gatunków *S. equorum* i *S. succinus* są stosowane jako kultury starterowe w produkcji produktów spożywczych, takich jak sery czy wędliny, gdyż nadają im specyficzne właściwości, m.in. kolor, smak i aromat. Z drugiej strony, identyfikowane były jako czynniki etiologiczne zakażeń u ludzi, takich jak ostre zapalenie nerek, zapalenie wsierdza, zakażenia dróg moczowych i infekcje rogówki [23]. Szczepy tego gatunku są również izolowane od zdrowych koni, kóz oraz krów chorych na zapalenie gruczołu mlekowego [25]. W badaniach własnych wyizolowano siedem szczepów *S. equorum* / *S. succinus* z jamy nosowej psów przebywających w schronisku.

S. petrasii jest komensalem występującym na skórze, błonach śluzowych, w gruczołach mlekowych i mleku ssaków [33]. Z kolei *S. petrasii* jest przyczyną infekcji ran, infekcji ucha, zakażeń układu moczowo-płciowego oraz bakteriemii u ludzi [27]. W badaniach własnych wyizolowano jeden szczep *S. petrasii* od jednego osobnika przebywającego w schronisku.

S. delphini, *S. intermedius* i *S. pseudintermedius* należą do grupy SIG (*Staphylococcus intermedius* group) oraz stanowią, zwłaszcza *S. pseudintermedius*, fizjologiczną mikrobiotę

skóry i błon śluzowych psów. Kizerwetter-Świda i in. [26] w swoich badaniach zidentyfikowali ten szczep jako czynnik etiologiczny infekcji skóry i ran, zapalenia ucha zewnętrznego oraz zakażeń układu moczowo-płciowego u psów. W badaniach własnych z jamy nosowej jednego psa pochodzącego ze schroniska wyizolowano jeden szczep *S. delphini* / *S. intermedius* / *S. pseudintermedius*.

Trzy spośród wyizolowanych szczepów były koagulazododatnie. Natomiast pozostałe 11 szczepów było koagulazoujemnych. Można zatem założyć, że dominującą florą gronkowcową w jamie nosowej psów są gronkowce koagulazoujemne. Kaszanyitzky i in. [28] wykazali, iż mikrobiotę skóry psów stanowią częściej gronkowce koagulazododatnie. Natomiast badania przeprowadzone przez Nagasae i in. [29] wskazują na przewagę gronkowców koagulazoujemnych na skórze psów.

Wytwarzanie hemolizy typu beta stwierdzono u 3 (21%) szczepów: 2 izolatów *S. delphini* / *S. intermedius* / *S. pseudintermedius* oraz u 1 izolatu *S. equorum* / *S. succinus*. Beta-hemoliza świadczy o całkowitej lizie krwinek, a więc o produkowaniu hemolizyny, która jest ważnym czynnikiem chorobotwórczości. Natomiast u pozostałych 11 (79%) szczepów odnotowano brak hemolizy erytrocytów.

W badaniach własnych u żadnego z analizowanych szczepów gronkowców nie wykryto fenotypowej oporności na metycylinę ani obecności genu *mecA* determinującego potencjalną metycylinooporność. Jednakże, często w badaniach izoluje się metycylino-

oporne szczepy gronkowców od psów [8, 12, 15, 26, 28].

Podsumowując, kolonizacja jamy nosowej zdrowych psów przez gronkowce dotyczyła połowy badanych zwierząt. Wykazano, iż flora gronkowcowa zasiedlająca jamę nosową psów była zróżnicowana gatunkowo, jednakże dominowały gronkowce koagulazoujemne. U badanych psów nie wykazano nosicielstwa metacylioopornych gronkowców.

Bibliografia:

- [1] <http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>
- [2] Szewczyk E. Diagnostyka Bakteriologiczna. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2013.
- [3] Buczek J., Kostro K., Gliński Z. 2008, Zoonozy, Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, 183-186.
- [4] Tress B, Dorn ES, Suchodolski JS, et al. Bacterial microbiome of the nose of healthy dogs and dogs with nasal disease. Smidt H, ed. PLoS ONE. 2017;12(5):e0176736. doi:10.1371/journal.pone.0176736.
- [5] Krogh H, Kristensen S. A study of skin diseases in dogs and cats. II. Microflora of the normal skin of dogs and cats. Nordisk Veterinærmedicin. 1976;28(9):459-63.
- [6] Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Medical Microbiology. Philadelphia: Elsevier; 2016.
- [7] Szczuka E, Grabska K, Trawczyński K, Bosacka K, Kaznowski A. Characterization of SCC-mectypes, antibiotic resistance, and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* strains. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica. 2013;60(3):261-270. doi:10.1556/amicr.60.2013.3.3.
- [8] Morgan M. 2008. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis. J Antimicrob Chemother. 62, 1181-1187.
- [9] David MZ, Daum RS. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. Clinical Microbiology Reviews. 2010;23(3):616-687. doi:10.1128/CMR.00081-09.
- [10] www.colorado.gov/pacific/sites/default/files/DC_CD_HAI-Questions-and-answers-for-pet-owners-about-MRSA.pdf
- [11] Podkowiak M, Bania J, Schubert J, Bystroń J. Coagulase-negative staphylococci: an emerging threat to public health?. Życie Weterynaryjne. 2014;89(1):60-66.
- [12] Ruzauskas M, Couto N, Kerziene S et al. Prevalence, species distribution and antimicrobial resistance patterns of methicillin-resistant staphylococci in Lithuanian pet animals. Acta Veterinaria Scandinavica. 2015;57(1). doi:10.1186/s13028-015-0117.
- [13] Fessler A, Billerbeck C, Kadlec K, Schwarz S. Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2010;65(8):1576-1582. doi:10.1093/jac/dkq172.
- [14] Gardete S, Wu SW, Gill S, Tomasz A. Role of *VraSR* in Antibiotic Resistance and Antibiotic-Induced Stress Response in *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2006;50(10):3424-3434. doi:10.1128/AAC.00356-06.
- [15] Coyner K. S. 2013. Managing MRSA, MRSP, and MRSS dermatologic infections in pets. Veterinary medicine. <http://veterinarymedicine.dvm360.com/managing-mrsa-mrsp-and-mrss-dermatologic-infections-pets?id=&sk=&date=&pageID=3>
- [16] Yugueros J., Temprano A., Berzal B., Sanchez M., Hernanz C., Luengo J. M., Naharro G. 2000. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase-Encoding Gene as a Useful Taxonomic Tool for *Staphylococcus* spp.. Journal of Clinical Microbiology. 38. 4251-4355.

- [17] Karakulska J, Fijałkowski K, Nawrotek P, Po-bucewicz A, Poszumski F, Czernomysy-Furowicz D. Identification and methicillin resistance of coagulase-negative staphylococci isolated from nasal cavity of healthy horses. *Journal of Microbiology*. 2012;50(3):444-451. doi:10.1007/s12275-012-1550-6.
- [18] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0, 2018. <http://www.eucast.org>.
- [19] Oliveira D, Lencastre H. Multiplex PCR Strategy for Rapid Identification of Structural Types and Variants of the *mec* Element in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002;46(7):2155-2161. doi:10.1128/aac.46.7.2155-2161.2002.
- [20] Quekwana D. N., Oguttu J. W., Sithole F., Odoi A. 2017. Burden and predictors of *Staphylococcus aureus* and *S. pseudintermedius* infections among dogs presented at an academic veterinary hospital in South Africa (2007-2012). *PeerJ*.
- [21] Shuttleworth R, Behme RJ, McNabb A, Colby WD. Human isolates of *Staphylococcus caprae*: association with bone and joint infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997; 35(10):2537-2541.
- [22] d'Ersu J, Aubin G, Mercier P, Nicollet P, Bémer P, Corvec S. Characterization of *Staphylococcus caprae* Clinical Isolates Involved in Human Bone and Joint Infections, Compared with Goat Mastitis Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2015;54(1):106-113. doi:10.1128/jcm.01696-15.
- [23] Vela J, Hildebrandt K, Metcalfe A et al. Characterization of *Staphylococcus xylosus* isolated from broiler chicken barn bioaerosol. *Poultry Science*. 2012;91(12):3003-3012. doi:10.3382/ps.2012-02302.
- [24] Vandenesch F, Eykyn SJ, Bes M, Meugnier H, Fleurette J, Etienne J. Identification and ribotypes of *Staphylococcus caprae* isolates isolated as human pathogens and from goat milk. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995;33(4):888-892.
- [25] Novakova D. *Staphylococcus equorum* and *Staphylococcus succinus* isolated from human clinical specimens. *Journal of Medical Microbiology*. 2006;55(5):523-528. doi:10.1099/jmm.0.46246-0.
- [26] Kizerwetter-Świda M, Chrobak-Chmiel D, Rzewuska M, Binek M. *Staphylococcus pseudintermedius* – trudno rozpoznawalny patogen. *Postępy Mikrobiologii*. 2015;54(2):103-114.
- [27] Švec P, Echahidi F, Petráš P et al. *Staphylococcus petrasii* subsp. *pragensis* subsp. nov., occurring in human clinical material. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2015;65(7):2071-2077. doi:10.1099/ijls.0.000220.
- [28] Kaszanyitzky, É. J., Jánosi, S., Egyed, Z., Ágost, G., & Semjén, G. Antibiotic resistance of staphylococci from humans, food and different animal species according to data of the hungarian resistance monitoring system in 2001. *Acta Veterinaria Hungarica*, 51(4), 451-464. DOI:10.1556/AVet.51.2003.4.3
- [29] Nagase N, Sasaki A, Yamashita K, Shimizu A, Wakita Y, Kitai S, Kawano J. Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2002; 64(3): 245-250/ DOI:10.1292/jvms.64.245
- [30] H. Meugnier, M. Bes, C. Vernozy-Rozandb, C. Mazuyb, Y. Brun, J. Freney, J. Fleurette. Identification and ribotyping of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus equorum* strains isolated from goat milk and cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 1996;31(1-3):325-331/DOI:10.1016/0168-1605(96)00975-0
- [31] Simonová M., Strompfová V., Marciňáková M., Lauková A., Vesterlund S., Latorre S., Moratalla, Bover-Cid S., Vidal-Carou C. Characteriza-

tion of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* isolated from Slovak meat products. Meat Science. 2006;73(4): 559-564/DOI:10.1016/j.meatsci.2006.02.004

[32] Schleifer K., Kloos W., Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin I. Amended Descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and Descriptions of Three New Species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus xylosus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 1975;25:50-61, doi:10.1099/00207713-25-1-50

[33] Pantůček R., Švec P., Dajcs J. J., Machová I., Černohlávková J., Šedo O., Gelbíčová T., Mašlaňová I., Doškař J., Zdráhal Z., Růžicková V., Sedláček I. *Staphylococcus petrasii* sp. nov. including *S. petrasii* subsp. *petrasii* subsp. nov. and *S. petrasii* subsp. *croceilyticus* subsp. nov., isolated from human clinical specimens and human ear infections. Systematic and Applied Microbiology. 2013;36(2):90-95, DOI: 10.1016/j.syapm.2012.11.004

[34] Zamankhan Malayeri, H., Jamshidi, S. and Zahraei Salehi, T. (2010). Identification and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria causing otitis externa in dogs. VeterinIdentification of serum biomarkers for colorectal cancer metastasis using a differential secretome approach Research Communications, 34(5),435-444. DOI:10.1007/s11259-010-9417-y

[35] Cox H. U., Hoskins J. D., Newman S. S., Foil C. S., Turnwald G. H., Roy A. F. (1988) Temporal study of staphylococcal species on healthy dogs. American Journal of Veterinary Research 49(6):747-751,

[36] Medleau L., Long R. E., Brown J., Miller W. H. Frequency and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from canine pyoderma. American Journal of Veterinary Research. 47(2):229-231,

[37] Leonard, F., Markey, B. (2008). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: A review. The Veterinary Journal, 175(1), pp.27-36. Doi; 10.1016/j.tvjl.2006.11.008

[38] Singh A., Jain R.; 2016 *Staphylococcus xylosus* Meningitis Following Dog-bite. Indian Pediatrics;53:931

[39] Lederberg J, MacCray A. 'Ome Sweet 'Omics—a genealogical treasury of words. The Scientist. 2001. Available at: <https://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/13313/title/-Ome-Sweet--Omics---A-Genealogical-Treasury-of-Words/>. [Dostęp: 26 lutego 2018]

Publikacja w Acta Mygenica XIV

Zachęcamy do publikacji w kolejnym numerze Zeszytów Naukowych "Acta Mygenica" Koła Naukowego Studentów Biotechnologii "Mygen". Akceptujemy artykuły przeglądowe i badawcze o tematyce z zakresu lifescience. Najlepsze z nadesłanych artykułów zostaną opublikowane w **XIV wydaniu** "Acta Mygenica" w październiku 2018.

Termin nadsyłania abstraktów mija 2 września, natomiast artykułów oraz zgód opiekuna naukowego - 9 września.

W razie pytań prosimy o kontakt z Kingą Pajdzik (kinga.pajdzik@gmail.com).

Poprzednie edycje zeszytów naukowych „Acta Mygenica” oraz szczegółowe informacje są dostępne pod adresem: www.mygen.wbbib.uj.edu.pl/dzialalnosc/actamygenica

