

## AUTOREFERAT

### 1. Imię i nazwisko

Ryszard Koczura

### 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania

Dyplom doktora nauk biologicznych w zakresie biologii – mikrobiologii, uzyskany na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu w 2001 r. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Pozyskiwanie żelaza przez pałeczki *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* wyhodowane z materiałów pobranych od chorych ludzi”.

Promotor: Prof. dr hab. Adam Kaznowski

Recenzenci: Prof. dr hab. Antoni Różalski, dr hab. Jerzy Chylak

Dyplom magistra biologii, uzyskany na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu w 1996 r. Tytuł pracy magisterskiej: „Wytwarzanie sideroforów przez środowiskowe szczepy *Vibrio* spp. wyhodowane z wody Bałtyku”

Promotor: Prof. dr hab. Krystyna Włodarczak

### 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych

01.10.2001 do chwili obecnej: adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

01.10.1996 – 21.09.2001: studia doktoranckie na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

4. Wskazanie osiągnięcia\* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

**Integrony bakterii Gram-ujemnych występujących  
w wodach powierzchniowych**

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

1. **Koczura R.**, Mokracka J., Jabłońska L., Gozdecka E., Kubek M, Kaznowski A. 2012. Antimicrobial resistance of integron-harboring *Escherichia coli* isolates from clinical samples, wastewater treatment plant and river water. *Science of the Total Environment*. 414, 680–685.

IF<sub>2012</sub> – **3,258**; IF<sub>5-letni</sub> – **3,789**; punktacja MNiSW – **40**; liczba cytowań (wg Web of Science) – **41**

Wkład habilitanta: **55%**, autor korespondencyjny. Autorstwo koncepcji badań; zaplanowanie doświadczeń; pozyskanie finansowania na część badań dotyczących antybiotykooporności i występowania integronów u bakterii wyhodowanych z wody rzecznej (grant MNiSW nr N N304 080635); wykonanie części doświadczeń – pobór próbek ścieków i wody rzecznej, izolacja i identyfikacja bakterii, określenie występowania integronów klasy 1 i 2 u wybranych szczepów *E. coli*, określenie lekowrażliwości wybranych szczepów, analiza klonalna metodą ERIC-PCR, analiza statystyczna; interpretacja wyników badań; przygotowanie manuskryptu; przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

2. **Koczura R.**, Mokracka J., Barczak A., Krysiak N., Kaznowski A. 2013. Association between the presence of class 1 integrons, virulence genes and phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolates from river water. *Microbial Ecology*. 65, 84–90.

IF<sub>2013</sub> – **3,118**; IF<sub>5-letni</sub> – **3,662**; punktacja MNiSW – **35**; liczba cytowań (wg Web of Science) – **10**

Wkład habilitanta: **65%**, autor korespondencyjny. Autorstwo koncepcji badań; zaplanowanie doświadczeń; pozyskanie finansowania badań (grant MNiSW nr N N304 080635); wykonanie części doświadczeń – pobór próbek wody, izolacja i identyfikacja bakterii, określenie występowania i zawartości genowej integronów u wybranych szczepów *E. coli*, analiza klonalna metodą ERIC-PCR, określenie przynależności części szczepów do grup filogenetycznych A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>2</sub><sub>3</sub>, D<sub>1</sub>, i D<sub>2</sub>, określenie u części szczepów występowania 15 genów związanych z chorobotwórczością, analiza statystyczna; interpretacja wyników badań; przygotowanie manuskryptu; przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

3. **Koczura R.**, Semkowska A., Mokracka J. 2014. Integron-bearing Gram-negative bacteria in lake waters. *Letters in Applied Microbiology*. 59, 514–519.

IF<sub>2014</sub> – **1,659**; IF<sub>5-letni</sub> – **1,891**; punktacja MNiSW – **25**; liczba cytowań (wg Web of Science) – **4**

Wkład habilitanta: **80%**, autor korespondencyjny. Autorstwo koncepcji badań; zaplanowanie doświadczeń; wykonanie części doświadczeń – pobór próbek wody, izolacja i identyfikacja bakterii; określenie zawartości genowej części zmiennej integronów, określenie wytwarzania β-laktamaz typu ESBL, analiza klonalna; interpretacja wyników badań; przygotowanie manuskryptu; przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

4. **Koczura R.**, Krysiak N., Taraszewska A., Mokracka J. 2015. Coliform bacteria isolated from recreational lakes carry class 1 and class 2 integrons, and virulence-associated genes. *Journal of Applied Microbiology*. 119, 594–603.

IF<sub>2015</sub> – **2,156**; IF<sub>5-letni</sub> – **2,637**; punktacja MNiSW – **30**; liczba cytowań (wg Web of Science) – **0**

Wkład habilitanta: **80%**, autor korespondencyjny. Autorstwo koncepcji badań; zaplanowanie doświadczeń; wykonanie części doświadczeń – pobór próbek wody, izolacja bakterii; określenie zawartości genowej części zmiennej integronów, analiza klonalna, analiza statystyczna; interpretacja wyników badań; przygotowanie manuskryptu; przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

5. **Koczura R.**, Mokracka J., Makowska N. 2016. Environmental isolate of *Rahnella aquatilis* harbors class 1 integron. *Current Microbiology*. 72, 64–67.

IF<sub>2015</sub> – **1,519**; IF<sub>5-letni</sub> – **1,563**; punktacja MNiSW – **15**; liczba cytowań (wg Web of Science) – **0**

Wkład habilitanta: **80%**, autor korespondencyjny. Autorstwo koncepcji badań; zaplanowanie doświadczeń; pozyskanie finansowania badań (grant MNiSW nr N N304 080635); wykonanie części doświadczeń – pobór próbek wody, identyfikacja szczepu *R. aquatilis* metodą MLSA; określenie zawartości genowej części zmiennej integronów, określenie lekowrażliwości szczepu; interpretacja wyników badań; przygotowanie manuskryptu; przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

6. **Koczura R.**, Mokracka J., Taraszewska A., Łopacińska N. 2016. Abundance of class 1 integrase and sulfonamide resistance genes in a river water and sediments is affected by anthropogenic pressure and seasonality. *Microbial Ecology*. DOI: 10.1007/s00248-016-0843-4.

IF<sub>2015</sub> – **3,232**; IF<sub>5-letni</sub> – **3,560**; punktacja MNiSW – **35**; liczba cytowań (wg Web of Science) – **0**

Wkład habilitanta: **65%**, autor korespondencyjny. Autorstwo koncepcji badań; zaplanowanie doświadczeń; pozyskanie finansowania badań (grant NCN nr DEC-2011/03/B/NZ9/00070); wykonanie części doświadczeń – pobór próbek wody i osadu, oznaczenia fizykochemiczne wody, określenie liczby kopii genów *intI1* i *sul* w metagenomie wybranych próbek wody i osadu, analiza klonalna, analiza statystyczna; interpretacja wyników badań; przygotowanie manuskryptu; przygotowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (Impact Factor) czasopism, w których ukazały się publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, zgodnie z rokiem opublikowania (w przypadku pracy z 2016 r. wykorzystano ostatnią dostępną wartość – IF<sub>2015</sub>) – **14,942**.

Suma liczby punktów MNiSW za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, wg punktacji z 2015 r. – **180**.

Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego (wg bazy Web of Science) – **55**.

**c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

**Wprowadzenie**

Integrony są strukturami genetycznymi zdolnymi do włączania kaset genowych na drodze rekombinacji zlokalizowanej oraz ich ekspresji. Opisano je po raz pierwszy w 1989 r. (Stokes i Hall 1989). Platforma integronu składa się zwykle z trzech elementów: a) genu *intI*, kodującego integrację należącą do rekombinaz tyrozynowych, b) sekwencji *attI* – miejsca, w którym dochodzi do rekombinacji na skutek działania integrazy, oraz c) dwóch promotorów, z których jeden ( $P_{int}$ ) odpowiada za ekspresję genu *intI*, a drugi ( $P_C$ ) zapewnia ekspresję kaset genowych, które zwykle nie mają własnego promotora (Cambrey i wsp. 2010).

Wyróżnia się dwa główne typy integronów: mobilne, zwane też integronami oporności, oraz chromosomalne. Integrony mobilne związane są z plazmidami lub transpozonami (sam integron nie jest mobilny). Zawarte w nich kasety genowe zwykle determinują oporność bakterii na antybiotyki. Zidentyfikowano ponad 130 różnych kaset genowych; pojedynczy integron może zawierać od zera do ośmiu kaset (Cambrey i wsp. 2010).

Na podstawie sekwencji aminokwasowej integras integrony mobilne podzielono na pięć klas. Najbardziej rozpowszechnione i najlepiej poznane są integrony klasy 1, występujące u wielu gatunków bakterii Gram-ujemnych i nielicznych Gram-dodatnich. W budowie integronów klasy 1 wyróżnić można dwa konserwowane regiony, określane jako 5'-CS (ang. conserved segment) oraz 3'-CS. W regionie 5'-CS występuje gen integrazy *intI1* oraz promotory  $P_{int}$  i  $P_C$ . Region 3'-CS, który może ulegać delecji i nie jest niezbędny do funkcjonowania integronu, zawiera geny *qacA/E1* i *sul1*, warunkujące oporność na czwartorzędowe sole amoniowe i sulfonamidy. Pomędzy regionami 5'-CS i 3'-CS obecny jest region zmienny, w który włączane są kasety genowe. Jego wielkość zależy od liczby i rodzaju zintegrowanych genów.

Integrony klasy 2 występują sporadycznie w genomach bakterii. Obecny w nich gen integrazy *intI2* zawiera w swej sekwencji przedwcześnie występujący kodon stop, co prowadzi do powstawania нефunkcjonalnego białka. Efektem tego jest stosunkowo stabilny skład regionu zmiennego integronów klasy 2, zawierającego zwykle kasety genowe *dfrA1*

(warunkuje oporność na trimetoprim), *sat2* (warunkuje oporność na streptotrycynę), *aadA1* (odpowiedzialny za oporność na streptomycynę i spektynomycynę) oraz *orfX*, o nieznannej funkcji. Integrony klasy 3 opisano tylko u kilku gatunków bakterii. Pozostałe dwie klasy integronów, 4 i 5, związane są z opornością na trimetoprim u szczepów *Vibrio* spp.

Integrony chromosomalne, niezwiązane z ruchomymi elementami genomu bakteryjnego, stwierdzono u wielu gatunków bakterii. Analiza bioinformatyczna 1189 kompletnych sekwencji genomów bakteryjnych (głównie Proteobacteria) wykazała obecność genów integraz integronowych *intI* u 17% z nich. Do integronów chromosomalnych zalicza się superintegrony, zawierające ponad 20 kaset genowych. Największe superintegrony wykryto u *Vibrio vulnificus* (217 kaset genowych) i *V. cholerae* (179 kaset) (Cambray i wsp. 2010).

Początkowo integrony badano głównie u szczepów bakterii izolowanych z materiałów klinicznych. W późniejszym okresie wzrosło zainteresowanie ich występowaniem i rolą u bakterii występujących w środowisku. Integrony i geny oporności na antybiotyki, określane mianem zanieczyszczenia ksenogenetycznego (ang. xenogenetic pollutants), są indykatorem presji selekcyjnej wywołanej stosowaniem antybiotyków w danej populacji i jednocześnie zagrożenia opornością szczepów chorobotwórczych, której można spodziewać się w tej populacji (Gillings 2013). Gen integrazy klasy 1 proponuje się uznać za wyznacznik antropogenicznego zanieczyszczenia środowiska naturalnego (Gillings i wsp. 2015).

Celem prowadzonych przeze mnie badań było określenie występowania integronów, ich struktury, rodzaju przenoszonych kaset oporności oraz związku występowania integronów z wieloopornością i wirulencją u bakterii Gram-ujemnych izolowanych z wód powierzchniowych: z wody rzecznej, jezior rekreacyjnych oraz jezior na obszarach objętych ochroną, leżących na terenie Wielkopolskiego Parku Narodowego, a także w metagenomie wody i osadu rzecznoego.

### **Wpływ oddziaływań antropogenicznych i środowiskowych na występowanie integronów klasy 1 i antybiootykooporność bakterii w wodzie rzecznej**

Oddziaływanie antropogeniczne na występowania integronów u bakterii w wodzie rzecznej określiłem na przykładzie wpływu zrzutu ścieku oczyszczonego do wód odbiornika. Oczyszczalnia ścieków stanowi środowisko, które sprzyja wysokiemu poziomowi horyzontalnego transferu genów ze względu na obecność dużej liczby szczepów bakteryjnych

pochodzących z różnych źródeł, składników odżywczych istotnych dla przeżycia i subinhibicyjnych stężeń antybiotyków (Rizzo i wsp. 2013, Berglund i wsp. 2014).

W ramach badań dotyczących wpływu antropopresji na obecność integronów w wodzie rzecznej określiłem występowanie integronów klasy 1, 2 i 3 u bakterii heterotroficznych wyhodowanych z wody (3456 szczepów) i osadu rzeki Warty (3456 szczepów), z próbek pobranych w trzech miejscach: Rogalinku (lokalizacji o stosunkowo niskim poziomie antropopresji), Poznaniu (mieście zamieszkiwanym przez ok. 550 tys. mieszkańców) oraz Czerwonaku (miejscu położonym 5 km poniżej ujścia ścieków oczyszczonych z Centralnej Oczyszczalni Ścieków w Koziegłowach obsługującej Poznań o okoliczne gminy). Stwierdziłem, że szczepy pochodzące z wody pobranej poniżej ujścia ścieków oczyszczonych znacząco częściej (7,7%), w porównaniu ze szczepami wyhodowanymi z wody pobranej powyżej zrzutu ścieków oczyszczonych – w Rogalinku (3,8%) i Poznaniu (3,6%), zawierają w genomie gen integrazy klasy 1. W przypadku bakterii heterotroficznych wyhodowanych z osadu rzeczno-pobranego w tych samych miejscach, gen *intI1* również był obecny znacząco częściej u izolatów pochodzących z lokalizacji poniżej dopływu ścieków oczyszczonych (3,9%) niż u szczepów wyosobnionych z osadu pobranego w Rogalinku (1,6%) i Poznaniu (1,3%). Gen integrazy klasy 2 występował u bakterii hodowlanych sporadycznie, a genu *intI3* nie wykryłem (Koczura i wsp. 2016b).

W badaniach dotyczących *Escherichia coli* wykorzystano 1877 izolatów pochodzących z próbek materiałów pobranych od chorych ludzi (59 izolatów), ze ścieków pobranych w Centralnej Oczyszczalni Ścieków w Koziegłowach (1195) oraz z wody rzeki Warty z miejsc poboru zlokalizowanych przed (301) i po (322) punkcie zrzutu ścieków oczyszczonych. Łącznie wyizolowano 227 szczepów *E. coli* z integronami; 200 z nich miało wyłącznie integrony klasy 1, 23 – wyłącznie integrony klasy drugiej, cztery szczepy zawierały integrony obu tych klas. Nie stwierdzono natomiast obecności integronów klasy 3 (Koczura i wsp. 2012).

Obecność integronów wykryto u 56% szczepów klinicznych, 11% szczepów pochodzących z oczyszczalni ścieków (w tym 11,5% izolatów wyhodowanych z kanału wypływowego), 6% szczepów z rz. Warty przed punktem zrzutu ścieków oczyszczonych i 14% szczepów z rz. Warty za punktem zrzutu oczyszczonych ścieków. Częstość występowania integronów u szczepów klinicznych była znacząco wyższa niż u szczepów środowiskowych. Stwierdzono również znacząco wyższą częstość występowania integronów

u szczepów *E. coli* wyosobnionych z wody rzeki Warty za punktem dopływu ścieków oczyszczonych w porównaniu z miejscem przed zrzutem ścieków (Koczura i wsp. 2012).

Lekowrażliwość zawierających integrony izolatów *E. coli* określono w stosunku do 27 antybiotyków i chemioterapeutyków należących do 11 klas. Niemal wszystkie (99,1%) szczepy zawierające integrony były wielolekooporne, tj. odporne na antybiotyki należące do co najmniej trzech klas. Zaobserwowano istotne statystycznie różnice w częstości występowania oporności na 18 z 27 antybiotyków. Dotyczyły one przeważnie wyższej częstości oporności u klinicznych szczepów *E. coli*, stwierdzono jednak też znacząco wyższą częstość oporności na kanamycynę, cefalotynę, trimetoprim, kotrimoksazol, ciprofloksacynę, norfloksacynę i chloramfenikol u szczepów izolowanych z wody za miejscem zrzutu ścieków oczyszczonych, w porównaniu do izolatów pochodzących z rzeki przed miejscem zrzutu (Koczura i wsp. 2012).

Oczyszczanie ścieków, choć zmniejsza liczbę bakterii, nie eliminuje zawierających integrony, wieloopornych szczepów bakterii (Mokracka i wsp. 2012b). Porównanie zakresów oporności szczepów, wyrażonych liczbą klas antybiotyków, na które były odporne, wykazało, że dopływ ścieków oczyszczonych znacząco zwiększa zakres oporności szczepów *E. coli* w wodzie odbiornika. Izolaty wyhodowane z wody pobranej powyżej punktu zrzutu ścieków były odporne na antybiotyki należące do 2-7 klas (mediana 5), natomiast izolaty wyosobnione z wody poniżej dopływu ścieków odporne były na antybiotyki należące do 2-10 klas (mediana 7). Szczepy ze ścieku oczyszczonego odporne były na antybiotyki należące do 5-9 klas (mediana 7,5) (Koczura i wsp. 2012).

Analiza występowania genu *intI1* w całkowitym DNA wyizolowanym z próbek wody rzecznej wykazała istotnie wyższą liczbę kopii tego genu w wodzie pobranej poniżej miejsca zrzutu ścieków, jednak częstość jego występowania przed i za miejscem dopływu ścieków, wyliczona na podstawie stosunku liczby kopii *intI1* do liczby kopii genu 16S rRNA, nie różniła się istotnie. Nie stwierdziłem istotnych statystycznie różnic między liczbą kopii i częstością genu *intI1* w całkowitym DNA wyizolowanym z próbek osadu pobranych w Rogalinie, Poznaniu i Czerwonaku. Ponadto, stwierdziłem brak korelacji pomiędzy liczbą kopii w ml wody i częstością *intI1* w metagenomie, a częstością występowania tego genu u izolatów wyhodowanych z wody czy osadu. Nie zaobserwowałem istotnych statystycznie różnic w częstości występowania związanego z konserwowanym regionem 3'-CS integronów klasy 1 genu *sulI* w całkowitym DNA wyizolowanym z próbek wody i osadu. Powyższe wyniki mogą świadczyć o tym, że dopływ ścieków oczyszczonych do wód odbiornika



zwiększa częstość występowania integronów klasy 1 głównie u heterotroficznych bakterii hodowlanych (Koczura i wsp. 2016b).

Częstość występowania genu integrazy klasy 1 u heterotroficznych bakterii hodowlanych oraz w metagenomie wody była istotnie wyższa w miesiącach zimowych. Mogło być to spowodowane, sugerowaną przez innych badaczy, zwiększoną pod wpływem niskiej temperatury częstością horyzontalnego transferu genów (Miller i wsp. 2014). Częstsze występowanie integronów klasy 1 w chłodniejszych miesiącach miało odzwierciedlenie w ujemnej korelacji między częstością *intI1* u izolatów bakterii, a temperaturą wody (Koczura i wsp. 2016b).

Wykazałem ponadto związek pomiędzy niektórymi parametrami fizykochemicznymi wody, jak wspomniana wyżej temperatura, przewodność właściwa (konduktywność), zasolenie, stężenie tlenu rozpuszczonego, a częstością występowania integronów u bakterii hodowlanych oraz w metagenomie wodnym (Koczura i wsp. 2016b).

Nie zaobserwowałem korelacji między wynikami dotyczącymi częstości i liczby kopii genów *intI1* i *sulI* w próbkach wody i osadu. Świadczyć to może o tym, że mikrobiomy wody i osadu rzeczno-jeziernego charakteryzują się różną dynamiką odpowiedzi na presję antropogeniczną oraz wpływ czynników środowiskowych (Koczura i wsp. 2016b).

Badania dotyczące obecności integronów u bakterii występujących w wodzie rzecznej doprowadziły również do odkrycia integronu klasy 1 u *Rahnella aquatilis* – bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, występującej w wodach słodkich. *R. aquatilis* może wywoływać zakażenia u ludzi z obniżoną odpornością, udokumentowano też przypadek posocznicy. Stosunkowo niewielka liczba opisanych przypadków infekcji powodowanych przez *R. aquatilis* sprawia, że mechanizmy oporności na antybiotyki szczepów tego gatunku nie są dobrze poznane (Koczura i wsp. 2016a).

Szczep *R. aquatilis* wyizolowano z próbki wody rzeki Warty pobranej w Sieradzu. Region zmienny integronu miał wielkość 1,6 kbp i zawierał szereg kaset genowych *dfrA1-aadA1*, warunkujących wytwarzanie reduktazy dihydrofolianowej i adenylotransferazy aminoglikozydów. Szczep był oporny na amikacynę, streptomycynę, ampicylinę, piperacylinę, amoksycylinę z kwasem klawulanowym, trimetoprim i sulfametoksazol z trimetoprimem. Nie stwierdziłem wytwarzania  $\beta$ -laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym. Oporność na penicyliny była uwarunkowana obecnością genu *bla*<sub>TEM</sub> (Koczura i wsp. 2016a).

Integron szczepu *R. aquatilis* był zlokalizowany w obrębie plazmidu o wielkość ok. 54 kbp. Plazmid ten był przekazywany do szczepu biorcy *E. coli* J-53, a transkoniugant był odporny na streptomycynę, ampicylinę, piperacylinę, trimetoprim, sulfametoksazol i trimetoprim (Koczura i wsp. 2016a).

Podsumowując, uzyskane wyniki wykazały, że:

- dopływ oczyszczonych ścieków z oczyszczalni powoduje w wodzie i osadzie odbiornika wzrost częstości występowania heterotroficznych bakterii hodowlanych, zawierających w genomie integrony klasy 1, ,
- dopływ ścieków oczyszczonych powoduje wzrost częstości występowania w wodzie odbiornika szczepów *E. coli* zawierających integrony,
- dopływ ścieków oczyszczonych powoduje wzrost częstości występowania oporności na niektóre antybiotyki, w tym cefalosporyny i fluorochinolony, u szczepów *E. coli* z integronami występujących w wodzie odbiornika,
- dopływ ścieków oczyszczonych powoduje poszerzenie zakresów oporności szczepów *E. coli* zawierających integrony w wodzie odbiornika,
- dopływ ścieków oczyszczonych powoduje zwiększenie liczby kopii genu integrazy klasy 1 w metagenomie wody odbiornika,
- częstość występowania integronów klasy 1 w wodzie rzecznej wykazuje różnice sezonowe i jest wyższa w chłodniejszych miesiącach,
- częstość występowania integronów klasy 1 w wodzie rzecznej jest skorelowana z parametrami fizykochemicznymi wody: temperaturą, przewodnością właściwą, zasoleniem oraz stężeniem tlenu rozpuszczonego,
- mikrobiomy wody i osadu cechują się różną dynamiką zmian w odpowiedzi na presję antropogeniczną i wpływ czynników środowiskowych,
- w wodach powierzchniowych dochodzi do rozprzestrzeniania się mobilnych integronów klasy 1, co prowadzi do ich występowania u gatunków, u których wcześniej nie stwierdzano ich obecności.

### **Występowanie integronów u bakterii występujących w wodach jeziornych na obszarach objętych ochroną**

Gen integrazy klasy 1 jest uznawany za marker antropogenicznego zanieczyszczenia środowiska naturalnego (Gillins i wsp. 2015). Jednak bakterie zawierające integrony są

izolowane również z materiałów pobranych od dzikich zwierząt w miejscach o stosunkowo niskim poziomie antropopresji, takim jak odległe rejony górskie Norwegii (Sunde 2005), czy otulina Drawieńskiego Parku Narodowego (Mokracka i wsp. 2012a). Badania przeprowadzone przeze mnie dotyczyły obecności integronów w genomach bakterii Gram-ujemnych występujących w wodach czterech jezior Wielkopolskiego Parku Narodowego o różnym stopniu presji antropogenicznej:

- 1) Jeziora Góreckiego – eutroficznego jeziora rynnowego o powierzchni 1,02 km<sup>2</sup>, częściowo objętego ochroną ścisłą, zlokalizowanego w centralnej części Parku przy popularnych szlakach turystycznych,
- 2) J. Łódzko-Dymaczewskiego – eutroficznego, przepływowego jeziora rynnowego o powierzchni 1,20 km<sup>2</sup>, znajdującego się przy południowej granicy Parku w bezpośrednim sąsiedztwie wsi Łódź, Stare Dymaczewo i Nowe Dymaczewo,
- 3) Jeziora Kociołek – eutroficznego kociołka eworsyjnego o powierzchni 0,04 km<sup>2</sup>, całkowicie objętego ochroną ścisłą, położonego w centralnej części Parku
- 4) J. Skrzynka – dystroficzne jeziora moreny czołowej o powierzchni 0,02 km<sup>2</sup>, całkowicie objętego ochroną ścisłą, położonego w centralnej części Parku.

Z wód ww. jezior wyhodowałem łącznie 17 szczepów bakterii Gram-ujemnych zawierających integrony: 13 z nich miało integrony klasy 1, a cztery – integrony klasy 2. Wyizolowane szczepy należały do gatunków: *Aeromonas hydrophila* (4 szczepy), *Escherichia coli* (10), *Klebsiella pneumoniae* (1) i *Pasteurella multocida* (2). Region zmienny integronów klasy 1 zawierał kasetę genową *aadA1* lub szereg kaset *dfrA1-aadA1*. Region zmienny integronów klasy 2 zawierał szereg kaset *dfrA1-sat-2-aadA1*. Wszystkie szczepy z integronami były wielooporne. Jeden z izolatów *E. coli* wytwarzał β-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym, warunkowane obecnością genu *bla<sub>SHV</sub>*, zlokalizowanego poza strukturą integronu (Koczura i wsp. 2014).

Czternaście szczepów z integronami wyhodowałem z wody Jeziora Łódzko-Dymaczewskiego, dwa z J. Kociołek, a jeden z J. Góreckiego. Potwierdza to hipotezę o wpływie działalności człowieka na częstość występowania bakterii z integronami. W okolicy linii brzegowej J. Łódzko-Dymaczewskiego znajdują się domy mieszkalne i budynki gospodarcze. W czasie pobierania materiału gospodarstwa te nie były podłączone do kanalizacji, tak więc ścieki bytowo-gospodarcze mogły przesiąkać do wód gruntowych i dalej do jeziora. Ponadto, J. Łódzko-Dymaczewskie jest jeziorem przepływowym, zasilanym przez wody rzeki Samicy, przepływającej wcześniej przez miasto Stęszew i obszary rolnicze. Dużo

mniejszej presji antropogenicznej poddane są J. Kociołek i J. Góreckie. Należy nadmienić, iż z wody J. Skrzyńka nie wyhodowano żadnego szczepu zawierającego gen integrazy. Jezioro to leży w obrębie rezerwatu ścisłego i znajduje się w pobliżu niezbyt popularnego szlaku turystycznego. Dodatkowo, jest to jezioro zarastające – otaczające je torfowisko przejściowe utrudnia dostęp nie tylko ludzi, ale i dzikich zwierząt, których odchody mogą zawierać bakterie z integronami (Koczura i wsp. 2014).

Podsumowując, uzyskane wyniki wykazały, że:

- w wodach powierzchniowych na obszarach objętych ochroną, w tym w rezerwach ścisłych, występują wielooporne bakterie zawierające integrony klasy 1 i 2,
- występowanie bakterii z integronami w wodach powierzchniowych w parku narodowym jest związane ze stopniem presji antropogenicznej.

### **Integrony u bakterii z grupy coli występujących w wodach jezior rekreacyjnych**

Podczas badań nad występowaniem bakterii z integronami w wodach akwenów rekreacyjnych pięciokrotnie, sezonowo pobierałem próbki z czterech jezior poznańskich: Jeziora Maltańskiego, J. Kierskiego, J. Rusalka i J. Strzeszyńskiego. Są to popularne zbiorniki wodne z kąpieliskami i miejscami do wędkowania. Na J. Maltańskim i J. Kierskim są również uprawiane sporty wodne: wioślarstwo, kajakarstwo, żeglarstwo (również lodowe) oraz pływanie. Z wód ww. jezior wyizolowałem łącznie 155 szczepów bakterii z grupy coli zawierających w genomie integrony klasy 1 lub 2: 137 z nich miało integrony klasy 1, 12 integrony klasy 2, a sześć miało integrony obu klas. Nie stwierdziłem występowania integronów klasy 3. Większość szczepów z integronami zidentyfikowałem jako *E. coli* (143 izolaty). Średnia częstość występowania bakterii z grupy coli z integronami wynosiła od 0,9% w J. Strzeszyńskim do 2,2% w J. Maltańskim (Koczura i wsp. 2015).

Region zmienny integronów klasy 1 wykazywał niewielkie zróżnicowanie i zawierał najczęściej szereg kaset genowych *dfrA1-aadA1* (30,1%). Pozostałe typy szeregów kaset to: *aadA1*, *dfrA7*, *dfrA17-aadA5* i *dfrA12-orfF-aadA2*. Region zmienny wszystkich integronów klasy 2 zawierał szereg kaset *dfrA1-sat2-aadA1* (Koczura i wsp. 2015).

Szczepy bakterii z grupy coli z integronami były odporne na 1-22 antybiotyków, przy czym najczęściej występowała oporność na sulfametoksazol (96,8%) i tetracyklinę (87,1%). Przeważająca większość izolatów (96,5%) była wielooporna. Bakterie wyhodowane z wody J.

Maltańskiego miały najszerszy zakres oporności, co mogło być spowodowane większą presją antropogeniczną, wywołaną zarówno położeniem jeziora, jak i częstością odbywających się na nim zawodów sportowych (Koczura i wsp. 2015).

Zaobserwowałem też różnice sezonowe w częstości występowania integronów u bakterii z grupy coli – w okresie jesienno-zimowym było ich więcej (4,2%-4,4%) niż w miesiącach letnich (0,8%-1,5%) (Koczura i wsp. 2015). Potwierdza to opisaną przeze mnie wyżej zależność między występowaniem integronów u bakterii a porą roku (Koczura i wsp. 2016b).

Podsumowując, uzyskane wyniki wykazały, że:

- w wodach jezior rekreacyjnych występują szczepy bakterii z grupy coli zawierające integrony,
- zróżnicowanie struktury genetycznej integronów szczepów *E. coli* występujących w wodzie jeziornej jest niewielkie,
- szczepy zawierające integrony występują częściej w miesiącach jesienno-zimowych,

### **Obecność integronów, a potencjał chorobotwórczy *Escherichia coli***

Najważniejszymi czynnikami zjadliwości *E. coli* są adhezyny, endo- i egzotoksyny, otoczka polisacharydowa, białka sekrecyjne i siderofory. Wśród wirulentnych szczepów *E. coli* wyróżnia się kilka patotypów, różniących się potencjałem chorobotwórczym i patomechanizmem wywoływanych zakażeń. Zakażenia jelitowe są powodowane przez enteropatogenne *E. coli* (EPEC), enterokrwotoczne *E. coli* (EHEC), enterotoksyczne *E. coli* (ETEC), enteroagregacyjne *E. coli* (EAEC), enteroinwazyjne *E. coli* (EIEC) i dyfuzyjno-enteroadherentne *E. coli* (DAEC). Najważniejsze patotypy wywołujące zakażenia pozajelitowe to uropatogenne (UPEC) i neuropatogenne *E. coli* (MNEC) (Kaper i wsp. 2004).

Pod względem filogenetycznym wyróżnia się cztery główne grupy szczepów *E. coli*: A, B1, B2 i D. Komensalne szczepy należą głównie do grupy A. Patotypy EHEC, ETEC i EIEC należą do grup A i B1. Szczepy wywołujące zakażenia pozajelitowe zaliczane są do grupy B2 oraz, rzadziej, do grupy D (Clermont i wsp. 2000).

Badania dotyczące związku obecności integronów z potencjałem chorobotwórczym *E. coli* przeprowadziłem na grupie 192 szczepów wyhodowanych z wody rzeki Warty, z których 96 miało w genomie integron klasy 1, a 96 nie zawierało integronu. Region zmienny

integronów zawierał szeregi kaset genowych *dfrA1-aadA1*, *dfrA17-aadA5*, *aadA1*, *dfrA1*, *aacA4-aadA1*, *dfrA12-orfF-aadA* i *aadB-aadA1-cmlA1*. Geny *dfrA* kodują reduktazy dihydrofolianu warunkujące oporność na trimetoprim, geny *aadA* – adenylotransferazy aminoglikozydów odpowiedzialne za oporność na streptomycynę i spektynomycynę, *aadB* – adenylotransferazy aminoglikozydów determinujące oporność na gentamicynę, kanamycynę i tobramycynę, *aacA* – acetylotransferazy aminoglikozydów warunkujące oporność na amikacynę i tobramycynę, a *cmlA* – pompę typu efflux odpowiedzialną za oporność na chloramfenikol. Ponadto dwa szczepy miały integrony zerowe, bez kaset genowych (Koczura i wsp. 2013).

Nie zaobserwowałem związku między obecnością integronów a przynależnością do grupy filogenetycznej. Najwięcej szczepów, zarówno z integronami klasy 1 (43,8%) jak i bez integronów (52,1%) należała do grupy filogenetycznej A. Najmniej licznie reprezentowana była grupa B2 (12,5% szczepów z integronami i 9,4% szczepów bez integronów) (Koczura i wsp. 2013).

Analiza występowania 15 genów związanych z chorobotwórczością *E. coli* wykazała obecność co najmniej jednego z nich u 87,5% szczepów z integronami klasy 1 i 55,2% szczepów bez integronów. Warto nadmienić, iż 35% szczepów z integronami i 22% szczepów bez integronów zawierało geny charakterystyczne dla patotypów *E. coli* wywołujących zakażenia jelitowe, m.in. geny ciepłostąlej i ciepłochwiejnej toksyny enterotoksycznych *E. coli*, geny toksyny Shiga enterokrwotocznych *E. coli*, oraz genu inwazyjności *ipaH*, występującego u EIEC. Cztery geny (ST – warunkujący wytwarzanie toksyny ciepłostąlej szczepów ETEC, *sfaS* – kodujący podjednostkę fimbrii S oraz związane z systemami pozyskiwania żelaza *fyuA* – kodujący receptor jersiniobakteryjny i *iutA* – kodujący receptor aerobakteryjny) występowały częściej ( $P < 0,05$ ) u izolatów *E. coli* zawierających integrony klasy 1 w genomie (Koczura i wsp. 2013).

Obecność integronów klasy 1 w genomie szczepu była też związana ze zwiększoną liczbą genów wirulencji (ang. virulence factor score) ( $P < 0,001$ ). Szczepy z integronami miały do pięciu (średnio 1,65) genów wirulencji, podczas gdy szczepy bez integronów – do czterech (średnio 0,62). Nie zaobserwowałem natomiast związku między składem genów integronów, a liczbą i rodzajem genów wirulencji. Liczba genów wirulencji była związana z przynależnością do grupy filogenetycznej, najwyższą zanotowano u szczepów z grupy B2 (Koczura i wsp. 2013).

Analiza występowania 24 genów wirulencji u zawierających integrony szczepów *E. coli* wyhodowanych z wody jezior rekreacyjnych wykazała obecność co najmniej jednego z nich u blisko 99% izolatów. Najczęściej występowały charakterystyczne dla uropatogennych *E. coli* geny: *kpsMT*, warunkujący wytwarzanie otoczki polisacharydowej, i *traT*, odpowiedzialny za odporność na działanie surowicy. Występowanie poszczególnych genów nie było związane z porą roku i miejscem izolacji szczepu (Koczura i wsp. 2015).

Podsumowując, uzyskane wyniki wykazały, że:

- obecność integronów klasy 1 w genomie szczepów *E. coli* wyhodowanych z wody rzecznej jest związana ze zwiększonym potencjałem chorobotwórczym,
- obecność integronów klasy 1 u *E. coli* nie jest związana z przynależnością szczepu do grupy filogenetycznej,
- potencjał chorobotwórczy szczepów *E. coli* jest związany z przynależnością szczepu do grupy filogenetycznej i jest najwyższy w grupie B2,
- wielooporne szczepy *E. coli* z integronami, obecne w wodach jezior rekreacyjnych, zawierają również geny wirulencji, co stwarza potencjalne zagrożenie dla zdrowia osób korzystających z tych akwenów.

## Piśmiennictwo

- Cambray G., Guerout A.M., Mazel D. 2010. Integrons. *Annu. Rev. Genet.* 44, 41–66.
- Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. 2000. Rapid and simple determination of *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ Microbiol.* 66, 4555–4558.
- Gillings M. 2013. Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome, and microbial pangenome. *Front. Microbiol.* 4, 4.
- Gillings M.R., Gaze W.H., Pruden A., Smalla K., Tiedje J.M., Zhu Y. 2015. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME J.* 9, 1269–1279.
- Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L.T. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Rev. Microbiol.* 2, 123–140.
- Koczura R., Mokracka J., Jabłońska L., Gozdecka E., Kubek M., Kaznowski A. 2012. Antimicrobial resistance of integron-harboring *Escherichia coli* isolates from clinical samples, wastewater treatment plant and river water. *Sci. Total Environ.* 414, 680–685.

- Koczura R., Mokracka J., Barczak A., Krysiak N., Kaznowski A. 2013. Association between the presence of class 1 integrons, virulence genes and phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolates from river water. *Microb. Ecol.* 65, 84–90.
- Koczura R., Semkowska A., Mokracka J. 2014. Integron-bearing Gram-negative bacteria in lake waters. *Lett. Appl. Microbiol.* 59, 514–519.
- Koczura R., Krysiak N., Taraszewska A., Mokracka J. 2015. Coliform bacteria isolated from recreational lakes carry class 1 and class 2 integrons, and virulence-associated genes. *J. Appl. Microbiol.* 119, 594–603.
- Koczura R., Mokracka J., Makowska N. 2016a. Environmental isolate of *Rahnella aquatilis* harbors class 1 integron. *Curr. Microbiol.* 72, 64–67.
- Koczura R., Mokracka J., Taraszewska A., Łopacinska N. 2016b. Abundance of class 1 integrase and sulfonamide resistance genes in a river water and sediments is affected by anthropogenic pressure and seasonality. *Microb. Ecol.* DOI: 10.1007/s00248-016-0843-4.
- Leverstein-van Hall M.A., Blok H.E.M., Rogier A., Donders T., Paauw A., Fluit A.C., Verhoef J. 2003. Multidrug resistance among Enterobacteriaceae is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. *J. Infect. Dis.* 187, 251–259.
- Miller J.H., Novak J.T., Knocke W.R., Pruden A. 2014. Elevation of antibiotic resistance genes at cold temperatures: implications for winter storage of sludge and biosolids. *Lett. Appl. Microbiol.* 59, 587–593.
- Mokracka J., Koczura R., Kaznowski A. 2012a. Transferable integrons of Gram-negative bacteria isolated from the gut of a wild boar in the buffer zone of a national park. *Ann. Microbiol.* 62, 877–880.
- Mokracka J., Koczura R., Kaznowski A. 2012b. Multiresistant Enterobacteriaceae with class 1 and class 2 integrons in a municipal wastewater treatment plant. *Water Res.* 46, 3353–3363.
- Stalder T., Barraud O., Casellas M., Dagot C., Ploy M.C. 2012. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Front. Microbiol.* 3, 119.
- Stokes H.W., Hall R.M. 1998. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol. Microbiol.* 3, 605–608.
- Sunde M. 2005. Class I integron with a group II intron detected in an *Escherichia coli* strain from a free-range reindeer. *Antimicrob Agents Chemother.* 49, 2512–2514.



## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo–badawczych

Główne nurty moich zainteresowań badawczych to, poza mechanizmami antybiotykooporności bakterii – czynniki wirulencji pałeczek Gram-ujemnych, w tym systemy pozyskiwania żelaza oraz bioterroryzm i broń biologiczna.

### 5.1. Integrony i antybiotykooporność bakterii pochodzących z materiałów klinicznych, ścieków i zwierząt

#### PUBLIKACJE W TEMACIE:

- Mokracka J., **Koczura R.**, Pawłowski K., Kaznowski A. 2011a. Resistance patterns and integron cassette arrays of the *Enterobacter cloacae* complex strains of human origin. *Journal of Medical Microbiology*. 60, 737–743.
- Mokracka J., **Koczura R.**, Jabłońska L., Kaznowski A. 2011b. Phylogenetic groups, virulence genes and quinolone resistance of integron-bearing *Escherichia coli* strains isolated from a wastewater treatment plant. *Antonie van Leeuwenhoek*. 99, 817–824.
- Mokracka J., **Koczura R.**, Kaznowski A. 2012a. Transferable integrons of Gram-negative bacteria isolated from the gut of a wild boar in the buffer zone of a national park. *Annals of Microbiology*. 62, 877–880.
- Mokracka J., **Koczura R.**, Kaznowski A. 2012b. Multiresistant *Enterobacteriaceae* with class 1 and class 2 integrons in a municipal wastewater treatment plant. *Water Research*. 46, 3353–3363.
- **Koczura R.**, Przyszlakowska B., Mokracka J., Kaznowski A. 2014. Class 1 integrons and antibiotic resistance of clinical *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex in Poznań, Poland. *Current Microbiology*. 69, 258–262.
- Makowska N., **Koczura R.**, Mokracka J. 2016. Class 1 integrase, sulfonamide and tetracycline resistance genes in wastewater treatment plant and surface water. *Chemosphere*. 144, 1665–1673.

W ramach badań nad integronami uczestniczyłem również w pracach dotyczących występowania i charakterystyki tych struktur genetycznych u bakterii wyhodowanych z materiałów klinicznych i ze ścieków miejskich. Stwierdziliśmy związek między obecnością integronu klasy 1, a wieloopornością oraz zwiększoną częstością i zakresem oporności na antybiotyki u szczepów kompleksów *Enterobacter cloacae* i *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* wyhodowanych z materiałów pobranych od pacjentów hospitalizowanych. Integrony występowały u ww. bakterii z częstością, odpowiednio, 55% i 63,5%. Region zmienny integronów klasy 1 szczepów kompleksu *E. cloacae* zawierał szeregi kaset genowych *aadA1*, *aadB-aadA2*, *dfrA1-aadA1*, *aacA4-aadA1* i *dfrA12-orfF-aadA2*. Integrony te były przekazywane do szczepu biorcy *E. coli* J-53 w procesie koniugacji (Mokracka i wsp. 2011a). Szczepy kompleksu *A. calcoaceticus-baumannii* zawierały integrony klasy 1 w

obrębie plazmidu o wielkości ok. 60 kbp. Ich regiony zmienny miały szeregi kaset *dfrA12-orfF-aadA2* i *aacC1-orfA-orfB-aadA1* (Koczura i wsp. 2014).

Badania próbek ścieków Centralnej Oczyszczalni Ścieków w Koziegłowach k. Poznania i Oczyszczalni Ścieków „Łącza” w Łęczycy k. Zielonej Góry wykazały, że proces oczyszczania nie eliminuje wieloopornych bakterii z rodziny Enterobacteriaceae zawierających w genomie integrony klasy 1 i 2. Zawartość genu regionu zmiennego integronów klasy 1 szczepów wyhodowanych ze ścieków wykazywała większe zróżnicowanie niż u szczepów klinicznych. U szczepów z integronami izolowanych ze ścieku oczyszczonego obserwowano zwiększoną częstość występowania oporności na niektóre antybiotyki: cefalotynę, cefazolin, cefuroksym, cefoperazon i ceftazydym (Mokracka i wsp. 2012b). W ścieku oczyszczonym stwierdzono również zwiększoną częstość występowania szczepów z integronami, a także bakterii opornych na tetracyklinę i sulfametoksazol. Zaobserwowano także wyższą częstość występowania genu integrazy klasy 1 *intI1* oraz genów *sul2* i *tet(A)*, warunkujących oporność na sulfonamidy i tetracyklinę, w metagenomie ścieku oczyszczonego (Makowska i wsp. 2016).

Występujące w ściekach miejskich izolaty *E. coli* zawierające integrony należały w większości do grupy filogenetycznej D, do której należą również szczepy wywołujące zakażenia pozajelitowe. Należy nadmienić, że wyosobnione ze ścieków miejskich szczepy *E. coli* z integronami miały do pięciu genów warunkujących chorobotwórczość. Szczepy te mogą z oczyszczalni przedostawać się do środowiska i stanowić zagrożenie dla zdrowia publicznego (Mokracka i wsp. 2011b).

Obecność bakterii z integronami stwierdziliśmy także w jelicie dzika zastrzelonego w otulinie Drawieńskiego Parku Narodowego. Pięć szczepów, należących do *E. coli*, *Hafnia alvei*, *Serratia odorifera* i *Pseudomonas* sp. zawierało w genomie integrony klasy pierwszej, przekazywalne do szczepu biorcy w procesie koniugacji (Mokracka i wsp. 2012a).

## 5.2. Systemy pozyskiwania żelaza u pałeczek Enterobacteriaceae

### PUBLIKACJE W TEMACIE:

- **Koczura R.**, Kaznowski A. 2003a. The *Yersinia* high-pathogenicity island and iron-uptake systems in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology*. 52, 637–642.
- **Koczura R.**, Kaznowski A. 2003b. Occurrence of the *Yersinia* high-pathogenicity island and iron uptake systems in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Pathogenesis*. 35, 196–201.

- Mokracka J., **Koczura R.**, Kaznowski A. 2004. Yersiniabactin and other siderophores produced by clinical isolates of *Enterobacter* spp. and *Citrobacter* spp. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 40, 51–55.
- **Koczura R.**, Mokracka J., Kaznowski A. 2012. The *Yersinia* high-pathogenicity island in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from polymicrobial infections. *Polish Journal of Microbiology*. 61, 71–73.

W początkowym okresie mojej pracy zawodowej zajmowałem się głównie bakteryjnymi systemami pozyskiwania żelaza z wykorzystaniem sideroforów – niskocząsteczkowych chelatorów jonów  $Fe^{3+}$ . Badanie prowadziłem na szczepach pałeczek Enterobacteriaceae wyhodowanych z materiałów pobranych od chorych ludzi. Szczególną uwagę poświęciłem występowaniu u badanych szczepów tzw. wyspy wysokiej patogeniczności – HPI (ang. high-pathogenicity island), zawierającej geny jersiniobakteryjnego systemu pozyskiwania żelaza.

Badania dotyczące szczepów *E. coli* (Koczura i Kaznowski 2003a) i *K. pneumoniae* (Koczura i Kaznowski 2003b) wykonałem m.in. dzięki środkom finansowym pozyskanym z Komitetu Badań Naukowych, jako grant nr 6 P04C 100 20, którym kierowałem. Stwierdziłem, że szczepy ww. gatunków produkują co najmniej jeden rodzaj sideroforu, a część z nich zdolna jest do wytwarzania dwóch lub trzech sideroforów (jersiniobaktyny, aerobaktyny i enterobaktyny). Umożliwia to bakteriom pozyskiwanie żelaza z jego ludzkich ustrojowych źródeł, takich jak hemoglobina, kompleks hemoglobina-haptoglobina, transferyna czy laktoferyna. Poza określeniem zdolności do produkcji jersiniobaktyny, u wybranych szczepów zbadałem strukturę wyspy HPI, stwierdzając jej zróżnicowanie (Koczura i Kaznowski 2003a; Koczura i Kaznowski 2003b).

Badania przeprowadzone na 107 izolatach z rodzajów *Enterobacter* i *Citrobacter* wykazały zdolność tych bakterii do wytwarzania enterobaktyny, aerobaktyny, sideroforów hydroksamowych innych niż aerobaktyna i, w mniejszym stopniu, jersiniobaktyny. Obecność wyspy patogeniczności HPI stwierdzono u pojedynczych izolatów *C. koseri*, *E. cloacae* i, po raz pierwszy, u *E. aerogenes* (Mokracka i wsp. 2004).

Określiłem ponadto występowanie wyspy patogeniczności HPI u 24 szczepów *E. coli* i *K. pneumoniae* biorących udział w 12 przypadkach zakażeń mieszanych. W 11 przypadkach, jeden szczep z pary zawierał w genomie wyspę HPI. W jednym przypadku obydwa szczepy miały wyspę patogeniczności. Analiza genetyczna HPI tych dwóch szczepów wykazała pewne różnice w jej strukturze, co sugeruje, że nie doszło do jej przekazania na drodze horyzontalnego transferu genów między szczepami biorącymi udział w zakażeniu. Z drugiej

strony zdolność do produkcji i wykorzystywania jersiniobaktyny, jako chelatora jonów Fe(III) przez szczepy biorące udział w zakażeniu mieszanym ułatwia ich namnażanie w organizmie gospodarza (Koczura i wsp. 2012).

### 5.3. Czynniki wirulencji bakterii Gram-ujemnych

#### PUBLIKACJE W TEMACIE:

- Mokracka J., **Koczura R.**, Kaznowski A. 2002. Wyspy patogeniczności. *Postępy Mikrobiologii*. 41, 51–70.
- Krzymińska S., Mokracka J., **Koczura R.**, Kaznowski A. 2009. Cytotoxic activity of *Enterobacter cloacae* human isolates. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 56, 248–252.
- Krzymińska S., **Koczura R.**, Mokracka J., Kaznowski A. 2010. Isolates of the *Enterobacter cloacae* complex induce apoptosis of human epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*. 49, 83–89.
- **Koczura R.**, Mokracka J., Krzymińska S., Kaznowski A. 2011. Virulence properties and integron-associated antibiotic resistance of *Klebsiella mobilis* strains isolated from clinical specimens. *Journal of Medical Microbiology*. 60, 281–288.
- Krzymińska S., Mokracka J., **Koczura R.**, Ćwiertnia A., Kaznowski A. 2012. *Aeromonas* spp.-mediated cell-contact cytotoxicity is associated with the presence of type III secretion system. *Antonie van Leeuwenhoek*. 101, 243–251.

Pierwszym efektem moich zainteresowań bakteryjnymi czynnikami wirulencji była praca przeglądowa dotycząca wysp patogeniczności – dużych, względnie niestabilnych fragmentów genomu, różniących się % G+C od reszty chromosomu i zawierających geny warunkujące chorobotwórczość (Mokracka i wsp. 2002). W późniejszym okresie uczestniczyłem w badaniach nad występowaniem III systemu sekrecji (T3SS) u szczepów bakterii z rodzajów *Enterobacter* i *Aeromonas*, pochodzących z materiałów pobranych od chorych ludzi. Nasz zespół stwierdził obecność genów warunkujących występowanie T3SS u pałeczek kompleksu *Enterobacter cloacae* oraz zdolność szczepów do wytwarzania cytotoksycznych enterotoksyn (Krzymińska i wsp. 2009). Izolaty zawierające geny T3SS wytwarzały na powierzchni charakterystyczne struktury o kształcie igły, typowym dla injektosomów – molekularnych strzykawek, którymi bakterie transportują białka efektorowe wprost do cytoplazmy komórek gospodarza (Krzymińska i wsp. 2009).

Do kompleksu *E. cloacae* zalicza się siedem gatunków. Podobieństwo ich cech fenotypowych nastęrcza trudności w identyfikacji z wykorzystaniem cech biochemicznych. Analiza sekwencji genu *hsp60* pozwoliła zidentyfikować większość (81%) szczepów kompleksu *E. cloacae* jako *E. hormaechei*. Wszystkie szczepy kompleksu *E. cloacae* wykazywały zdolność adhezji do komórek HEP-2, a większość (71%) dodatkowo była zdolna

do inwazji. Część izolatów indukowała apoptozę komórek, przejawiającą się kondensacją chromatyny jądrowej, powstawaniem ciał apoptotycznych i fragmentacją DNA (Krzymińska i wsp. 2010).

Badania przeprowadzone na szczepach *Klebsiella mobilis* (syn. *Enterobacter aerogenes*) wykazały zdolność tych bakterii do produkcji sideroforów: enterobaktyny, aerobaktyny i jersiniobaktyny. Wytwarzanie jersiniobaktyny było uwarunkowane obecnością w genomie wyspy patogeniczności HPI. Wszystkie szczepy wykazywały adhezję i inwazję do komórek HEp-2, a także działanie cytopatyczne. Izolaty *K. mobilis* były też cytotoksyczne w stosunku do komórek J774. Ponadto, stwierdziliśmy indukcję apoptozy w komórkach HEp-2 i J774. Dwa szczepy *K. mobilis* były wielolekooporne. Izolaty te zawierały w genomie integrony klasy 1 z kasetą genową *aadA1*, które drogą koniugacji były przekazywane do szczepu biorcy *E. coli* J-53 (Koczura i wsp. 2011).

#### **5.4. Bioterroryzm i broń biologiczna**

##### **PUBLIKACJE W TEMACIE:**

- Kaznowski A., Mokracka J., **Koczura R.** 2003. Zadania laboratoriów mikrobiologicznych w przypadku ataku bioterrorystycznego. *Postępy Mikrobiologii*. 42, 319–342.
- **Koczura R.**, Kaznowski A. 2004. The potential impact of using biological weapons against livestock and crops. *The ASA Newsletter*. 6, 26–28.

Użycie przetrwalników *Bacillus anthracis* w atakach terrorystycznych w Stanach Zjednoczonych w latach 90-tych i w 2001 r., a także eksperymenty japońskiej sekty Najwyższa Prawda (Aum Shinrikyō) z *B. anthracis* wykazały, że problem możliwości zastosowania czynników broni biologicznej w atakach bioterrorystycznych pozostaje nadal aktualny oraz uświadomiły skalę zagrożeń i koniecznych działań, które występują wskutek użyciu broni biologicznej. Kluczową rolę w identyfikacji biologicznych czynników zastosowanych w atakach powinny odegrać laboratoria mikrobiologiczne. Wymaga to przygotowania odpowiednich środków, wyszkolenia personelu ośrodków diagnostycznych i innych placówek służby zdrowia, również do wykrywania nietypowych i rzadko występujących czynników etiologicznych, które mogą być użyte jako broń biologiczna oraz ich zwalczania (Kaznowski i wsp. 2003).

Obiektem ataku bronią biologiczną może być nie tylko człowiek, ale również zwierzęta hodowlane czy rośliny uprawne. Skutki agroterroryzmu mają wymiar przede wszystkim

wymiar ekonomiczny, gdyż spowodowanie wystąpienia nawet niewielkiej liczby przypadków choroby zakaźnej wśród zwierząt hodowlanych czy roślin może skłonić importerów do zastosowania długotrwałego embarga. Utrata rynków zbytu z kolei powoduje straty w sektorach gospodarki związanych z rolnictwem oraz wzrost bezrobocia (Koczura i Kaznowski 2004).

## 5.5. Pozostałe prace oryginalne

### PUBLIKACJE W TEMACIE:

- Dudek K., **Koczura R.**, Gawalek M., Sajkowska Z., Ekner-Grzyb A. 2016. Detection of *Salmonella enterica* in a sand lizard (*Lacerta agilis*, Linnaeus, 1758) city population. *The Herpetological Journal*. 26, 57–60.
- Makowska N, Zawierucha K, Mokracka J., **Koczura R.** 2016. First report of microorganisms of Caucasus glaciers (Georgia). *Biologia*. 71, 620–625.

W ramach współpracy z Krzysztofem Dudkiem z Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu zajmuje się charakterystyką bakterii występujących materiałach pobranych od osobników jaszczurki zwinki (*Lacerta agilis* L.). W próbkach kału i wymazach z kloaki stwierdziliśmy obecność bakterii *Salmonella enterica*. Szczepy tego gatunku często kolonizują przewód pokarmowy gadów, zarówno dziko żyjących, jak i trzymany w terrariach, jednak nie wykryto ich wcześniej u *L. agilis*. Stwierdziliśmy także, że klony *S. enterica* mogą rozprzestrzeniać się w populacji jaszczurek (Dudek i wsp. 2016).

Najnowszym nurtem moich zainteresowań są drobnoustroje występujące w kriokonitach – niewielkich, wypełnionych wodą zagłębieniach na powierzchni lodowców. Wstępne wyniki przeprowadzonych przez nas badań wykazały obecność bakterii z rodzajów *Aeromonas* i *Pseudomonas* w kriokonitach na lodowcach Kaukazu (Makowska i wsp. 2016). Kolejnym etapem badań będzie charakterystyka rezystomu kriokonitów.

## 6. Dane bibliometryczne

Sumaryczny Impact Factor wszystkich publikacji, zgodnie z rokiem opublikowania – **47,573**.

Suma punktów MNiSW **580** (wg punktacji z 2015 r.).

Indeks Hirscha wg bazy Web of Science – **10**

07.09.2016.

Ryszard Koczura