

**Nowy szczep bakterii *Raoultella ornithinolytica* wyizolowany z jelita dżdżownicy
Dendrobaena veneta oraz sposób wyizolowania tego szczepu z jelita dżdżownicy
*Dendrobaena veneta***

Przedmiotem wynalazku jest nowy szczep bakterii *Raoultella ornithinolytica* zdeponowany w Narodowym Instytucie Leków w Warszawie pod Nr 02/01/2009, wytwarzający substancje antybiotyczne przeciw bakteriom z rodzaju *Mycobacterium* i sposób wyizolowania tego szczepu z jelita dżdżownicy *Dendrobaena veneta* należącej do pierścienic, których jelito obfituje w pewne gatunki bakterii stanowiące ich symbionty.

Gruźlica, jako główna przyczyna zgonów wśród chorób zakaźnych, jest jednym z najważniejszych problemów zdrowotnych i społecznych na świecie. Jej głównymi sprawcami są mykobakterie - *Mycobacterium tuberculosis*, wykazujące dużą odporność zarówno na czynniki zewnętrzne środowiska jak i oporność na działanie znanych antybiotyków oraz substancji chemicznych szkodliwych dla innych bakterii.

Trudna terapia przeciwgruźlicza oparta jest na takich antybiotykach jak: streptomycyna, cykloseryna, kanamycyna, kapreomycyna, wiomycyna, amikacyna lub ryfampicyna, czy też lekach syntetycznych jak etionamid, bądź zawierających kwas paraaminosalicyłowy, hydrazyd kwasu izonikotynowego lub pirazynamid.

Stosowanie wymienionych leków nie dało jednak całkowitego zwycięstwa nad *Mycobacterium tuberculosis*, albowiem prątki szybko uodparniają się na leki, a chorzy w czasie terapii doznają poważnych dolegliwości związanych z ich niepożądanymi, toksycznymi działaniami. Ponadto nie ma jednego skutecznego antybiotyku i leczenie gruźlicy wymaga terapii skojarzonej.

Coraz większe rozpowszechnienie lekoopornych prątków gruźlicy oznacza, że w przyszłości może zwiększać się liczba zachorowań, toteż na świecie nieustannie prowadzone są badania ukierunkowane na poszukiwanie nowych leków i szczepionek.

Od setek lat w krajach południowej Azji - Japonia, Chiny czy Wietnam, wykorzystuje się w medycynie preparaty otrzymywane z bezkręgowców, które stanowią wręcz obowiązkowy składnik wielu środków farmaceutycznych stosowanych przede wszystkim w leczeniu infekcji bakteryjnych i wirusowych.

Dowodzono, że symbiotyczne bakterie jelitowe wyizolowane z przewodu pokarmowego owadów i krocionogów oprócz funkcji odżywczej pełnią ważną rolę w powstrzymywaniu kolonizacji jelita przez patogeny, dzięki swym przeciwbakteryjnym i przeciwgrzybiczym właściwościom antybiotycznym. Badania te zostały opisane przez Gebhardta i innych, w pracy opublikowanej w FEMS Microbiological Letters., 2002, 217, 199-205.

W ostatnich kilku latach, popularnym modelem w badaniach nad odpornością bezkręgowców stały się pierścienice posiadające konserwatywne mechanizmy odporności nieswoistej, właściwej zarówno dla bezkręgowców jak i kręgowców.

Benkendorff i inni, w pracy opublikowanej w Journal of Invertebrate Pathology, 2001, 78, 109-118, stwierdzili aktywność przeciwbakteryjną białek z kokonów pierścienic, działających na takie patogeny człowieka jak: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Staphylococcus aureus*.

Dotychczasowe badania nad mikroorganizmami związanymi z pierścienicami, skupiają się głównie na poznaniu składu mikroflory bakteryjnej.

Badania z udziałem samej *Dendrobaena veneta*, dotyczyły głównie odporności komórkowej, a także wpływu metali ciężkich na ten typ odpowiedzi immunologicznej - Wieczorek-Olchawa i inni, Pedobiologia, 2003, 47, 702-709.

Nie ma opublikowanych danych o wykorzystaniu aktywności przeciwbakteryjnej białek wyizolowanych z dżdżownicy, wykazujących odporność skierowaną przeciwko patogenom z rodzaju *Mycobacterium*.

W preparatyce anatomicznej bezkręgowców, znanymi środkami anestezjologicznymi są octan etylu oraz eter. Opary tych związków powodują u dżdżownicy stres, objawiający się wyrzucaniem przez otwory nefrydialne dużej puli celomocytów i płynu celomatycznego wraz z częścią mikroflory organizmu.

Innym powszechnie stosowanym sposobem anestezji dżdżownic jest zanurzanie ich w gorącej, odtlenionej wodzie, jak opisali Byzov i inni oraz Molinares i inni w European Journal of Soil Biology 2007, 43, jednakże powoduje on wyginiecie części bakterii jelitowych.

Badania podjęte przez twórców wynalazku nad symbiotycznymi bakteriami jelitowymi dżdżownicy *Dendrobaena veneta*, miały na celu wyizolowanie z jej jelita, identyfikację i określenie właściwości mikroorganizmu wytwarzającego substancje antybiotyczne skierowane zwłaszcza przeciw bakteriom z rodzaju *Mycobacterium*.

Cel ten osiągnięto stosując nowy sposób izolacji mikroorganizmów, pozwalający na zachowanie całej mikroflory w organizmie dżdżownicy.

Nowym szczepem bakterii według wynalazku jest *Raoultella ornithinolytica*, wyizolowany z jelita dżdżownicy *Dendrobaena veneta* i zdeponowany w Narodowym Instytucie Leków w Warszawie pod numerem: 02/01/2009, wykazujący przeciwbakteryjne działanie skierowane na bakterie z rodzaju *Mycobacterium*, do których należą również prątki będące czynnikiem etiologicznym gruźlicy i choroby Leśniowskiego-Crohna.

Sposób wyizolowania nowego szczepu bakterii *Raoultella ornithinolytica*, nr depozytu - 02/01/2009, z jelita dżdżownicy *Dendrobaena veneta*, polegający na uspianiu żywego organizmu celem przeprowadzenia preparatyki anatomicznej i wyodrębnienia materiału do identyfikacji charakteryzuje się tym, że dojrzałe osobniki *Dendrobaena veneta* z uprzednio oczyszczonym jelitem znanymi sposobami, poddaje się łagodnej, bez objawów stresu anestezji, dla zachowania w organizmie całej mikroflory, z użyciem środka anestezjologicznego w postaci dwutlenku węgla otrzymywanego *in statu nascendi* w reakcji kwasu cytrynowego z węglanem sodowym. Z tak uspionej dżdżownicy wycina się środkowy odcinek jelita ok. 1 cm poniżej *clitellum*, płucze w soli fizjologicznej, a po osuszeniu i zważeniu zadaje porcją buforu fosforanowego Sörensena, korzystnie o pH= 6,4 w stosunku wagowym 1:2. Następnie preparat homogenizuje się w jałowych warunkach, posiewa na podłoże Sautona, zawierające prątki saprofityczne i inkubuje przez 3 doby w temp. 37 °C. Spośród wyrosłych mikroorganizmów wybiera się charakterystyczne śluzowe kolonie o białym kolorze z perłowym połyskiem, wokół których występują strefy przejaśnienia.

Wyizolowane bakterie namnaża się na skosach Hawigera, przygotowując do identyfikacji testami biochemicznymi: Api 20 E oraz testami w kierunku wytwarzania przez badane bakterie - histaminy i indolu oraz dekarboksylacji ornityny.

Wyniki testów świadczą o przynależności badanego szczepu bakterii do *Raoultella ornithinolytica*. Ostateczną identyfikację szczepu potwierdziła analiza sekwencji genu 16S rRNA, przeprowadzona przez certyfikowaną firmę Genomed w Warszawie.

Sposób wyizolowania nowego szczepu bakterii *Raoultella ornithinolytica* 02/01/2009 przedstawiono w przykładzie wykonania.

Osobniki *Dendrobaena veneta* pochodzące z jednej linii hodowlanej, utrzymywano przez co najmniej 2 lata, w warunkach laboratoryjnych, w temperaturze pokojowej, w ziemi ogrodowej przy całkowitym zaciemnieniu. Dojrzałe osobniki przekładano do pojemnika z jałową, wilgotną bibułą, gdzie przebywały przez 3 doby bez ziemi, aby przewód pokarmowy uległ oczyszczeniu. Ponownie dżdżownice płukano w jałowej wodzie, osuszano jałową bibułą i przenoszono do zamkniętego naczynia z odprowadzeniem umożliwiającym dostarczanie środka anestezjologicznego w postaci dwutlenku węgla, otrzymywanego *in statu nascendi*, w reakcji kwasu cytrynowego z węglanem sodowym. Z uśpionej dżdżownicy wycinano środkowy odcinek jelita ok. 1 cm poniżej *clitellum*, płukano go w soli fizjologicznej, a po osuszeniu i zważeniu, zadawano porcją buforu fosforanowego Sörensena, o pH = 6,4 w stosunku wagowym 1:2. Preparat rozcierano w jałowym szklanym homogenizatorze, a następnie homogenat posiewano na podłoże Sautona, zawierające prątki saprofityczne. Płytki z podłożem inkubowano przez 3 doby w temp. 37°C. Spośród wyrosłych mikroorganizmów wybierano śluzowe kolonie o białym kolorze z charakterystycznym perłowym połyskiem, wokół których zaobserwowano strefy przejaśnienia.

Wyizolowane szczepy, namnażano na skosach Hawigera, przygotowując do identyfikacji testami biochemicznymi: Api 20 E oraz testami w kierunku wytwarzania przez badane bakterie - histaminy i indolu oraz dekarboksylacji ornityny. Ostatecznie identyfikację potwierdzono analizą sekwencji genu 16S rRNA, dokonaną w certyfikowanej firmie Genomed w Warszawie.

Dla określenia właściwości nowego szczepu bakterii *Raoultella ornithinolytica* 02/01/2009 w kierunku wytwarzania substancji antybiotycznych skierowanych przeciw bakteriom z rodzaju *Mycobacterium* sporządzono ekstrakt białkowy.

Wyzolowane bakterie namnażano w podłożu Hawigera w temp. 37°C przez 24 godz. w termostacie z funkcją mieszania. Bakterie wirowano w temp. 4°C, przez 10 min, przy 14000 rpm. Supernatant zlewano, a uzyskany osad bakterii mieszano z buforem Sörensen o pH = 6,0, zawierającym inhibitory proteaz 1mM PMSF i Complete-Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche) (20 µl/1ml). Tak przygotowane próbki umieszczano w ciekłym azocie na 10 min, a następnie w lodzie. Czynność tę powtarzano trzykrotnie. Uzyskane próbki jeszcze raz wirowano w warunkach jak wyżej, a następnie supernatant przesączało przez sącze Millipore o średnicy porów 0,22 µm. Uzyskany ekstrakt białkowy o stężeniu białka określonym metodą Bradforda, używano dalej do inkubacji z prątkami saprofitycznymi.

Płynny ekstrakt białkowy z bakterii *Raoultella ornithinolytica* inkubowano z bakteriami z rodzaju *Mycobacterium* w płynnym podłożu Sautona zawierającym prątki saprofityczne: *M. butiricum*, *M. juho*, *M. phlei* i *M. smegmatis*. Preparaty inkubowano przez 4-9 dni w temp. 37°C, w termostacie z funkcją mieszania.

Otrzymaną zawiesinę mieszano w stosunku objętościowym 1:1 z 1% krzemowolframianem sodu i przenoszono pipetą na siatki z filmem formvarowym. Roztwór ponownie inkubowano na siatkach przez 10-15 minut, a następnie odsączało bibułą i suszono w próżni podczas transferu do kolumny mikroskopu. Zaadsorbowane na filmie komórki obserwowano po 6 dniach metodą kontrastu negatywowego pod transmisyjnym mikroskopem elektronowym Zeiss/LEO LEO912AB.

Obrazy spod mikroskopu dowodzą, że komórki *Mycobacterium* pęczniały, ulegały skróceniu, dzieliły się na mniejsze struktury o kształcie owalnym bądź okrągłym, czy też tworzyły struktury filamentowe, powstałe z połączenia się komórek w trakcie zaburzonego podziału.

Na załączonym rysunku przedstawiono wyżej opisane obrazy mikroskopowe, na którym:

Fig. 1 przedstawia: A - kontrolne komórki prątków *M. butiricum*, B i C - komórki prątków *M. butiricum* poddane działaniu ekstraktu z bakterii *R. ornithinolytica*.

Fig. 2 przedstawia: D - kontrolne komórki prątków *M. juho*, E i F - komórki prątków *M. juho* poddane działaniu ekstraktu z bakterii *R. ornithinolytica*.

Fig. 3 przedstawia: G - kontrolne komórki prątków *M. phlei*, H i I - komórki prątków *M. phlei* poddane działaniu ekstraktu z bakterii *R. ornithinolytica*.

Fig. 4 przedstawia: J - kontrolne komórki prątków *M. smegmatis*, K i L - komórki prątków *M. smegmatis* poddane działaniu ekstraktu z bakterii *R. ornithinolytica*.

Tak udokumentowane eksperymenty są dowodem na bakteriobójcze działanie szczepu *Raoultella ornithinolytica* 02/01/2009 w kierunku prątków z rodzaju *Mycobacterium*.

000001353
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Marii Curie-Skłodowskiej 5
20-031 Lublin

PROREKTOR

prof. dr hab. Ryszard Debiec