

Analiza wybranych czynników wirulencji bakterii i drożdży izolowanych ze środowisk pracy w kompostowniach, garbarniach, muzeach

Analysis of selected virulence factors of bacteria and yeast isolated from work environments in composting plants, tanneries, museums

Justyna Skóra^(b, c), Beata Gutarowska^(a, c)

Institut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Politechnika Łódzka
Dyrektor Instytutu: dr hab. B. Gutarowska prof. nadzw.

^(a) koncepcja pracy

^(b) przeprowadzenie badań i opracowanie wyników

^(c) opracowanie tekstu

STRESZCZENIE

Wstęp. Celem badań była ocena wytwarzania wybranych czynników wirulencji przez mikroorganizmy o potencjalnie chorobotwórczym, izolowane z miejsc pracy. Określano także wpływ materiału technicznego występującego w miejscu pracy na badane cechy bakterii i drożdży. **Materiał i metody.** Badano 11 szczepów bakterii i drożdży wyizolowanych z powietrza (metoda zderzeniowa) lub powierzchni (metoda odciskowa) ze środowisk pracy: garbarnia, kompostownia, muzeum. Identyfikację wykonano testami API oraz potwierdzono metodą genetyczną. Analizowano wybrane czynniki: wytwarzanie otoczki polisacharydowej, proteinazy, żelatynazy, lipazy, koagulazy, deoksyrybonukleazy, enterotoksyn, hemolizyn. Zastosowano podłoża standardowo używane w praktyce mikrobiologicznej oraz mineralne z dodatkiem materiału pochodzącego ze środowiska pracy (celuloza, skóra wet blue, wyciąg z kompostu). **Wyniki.** Wykazano, iż 8 spośród 11 szczepów wykazywało hemolizę, w tym 4 (*Bacillus cereus* 2 szczepy, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus haemolyticus*) hemolizę całkowitą. Otoczki polisacharydowe wykryto u drożdży *Cryptococcus albidus*. Właściwości proteolityczne oraz zdolność do produkcji żelatynazy wykazały głównie bakterie z rodzaju *Bacillus*. Ponadto szczepy *B. cereus* z kompostowni i garbarni wytwarzały enterotoksyny (NHE i HBL). Stwierdzono, iż obecność w pożywce skóry lub kompostu może stymulować lub hamować wytwarzanie toksyn w zależności od gatunku bakterii *Bacillus* i rodzaju toksyny. *S. haemolyticus* wyizolowany w muzeum był zdolny do produkcji lipazy i deoksyrybonukleazy. Stwierdzono, iż *Corynebacterium lubricantis* i *Candida parapsilosis* nie wytwarzają żadnych z badanych czynników wirulencji. **Wnioski.** W środowisku pracy kompostowni, garbarni, muzeów z wysoką częstością (56–100%) występują organizmy potencjalnie chorobotwórcze: *Bacillus cereus*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *Cryptococcus albidus*, *Pseudo-*

monas vancouverensis, *Staphylococcus haemolyticus* zdolne do wytwarzania czynników wirulencji (otoczki polisacharydowej, proteinazy, żelatynazy, lipazy, koagulat, deoksyrybonukleazy, enterotoksyn, hemolizyn).

Słowa kluczowe: szkodliwe czynniki biologiczne, czynniki wirulencji, miejsca pracy

ABSTRACT

Introduction. The aim of the study was to evaluate the production of selected virulence factors by potential pathogenic microorganisms isolated in workplaces. The influence of technical material present at the workplaces on strains virulence was also determined. **Material and methods.** 11 bacteria and yeast strains isolated from the air (impact method) or surface (RODAC method) in work environments. Identification was performed by API tests and molecular methods. The selected factors were analyzed: production of polysaccharide capsules, proteinase, gelatinase, lipase, coagulase, deoxyribonuclease, enterotoxins and hemolytic abilities. Apart from standard microbiological media, minerals media with addition of cellulose, wet blue leather, compost extract were used. **Results.** 8 from 11 tested strains produced hemolysis, including 4 bacterial strains (*Bacillus cereus* two strains, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus haemolyticus*) – β -hemolysis. Polysaccharide capsules were detected for yeast *Cryptococcus albidus*. Bacteria, mainly from the genus *Bacillus*, produced protease and gelatinase. Moreover, *B. cereus* strains from composting plants and tanneries produced enterotoxins (NHE and HBL). The presence of leather or compost in the medium can stimulate or inhibit toxin production, depending on the bacteria species and toxin type. *S. haemolyticus* from the museum produced lipase and deoxyribonuclease. It was found that *Corynebacterium*

lubricantis and *Candida parapsilosis* did not produce any of the tested virulence factors. **Conclusions.** In the work environment in composting, tanneries, museums with high frequency (56–100%) there are potentially pathogenic organisms: *Bacillus cereus*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *Cryptococcus albidus*, *Pseudomonas vancouverensis*, *Staphy-*

lococcus haemolyticus able to produce virulence factors (polysaccharide capsules, proteinase, gelatinase, lipase, coagulate, deoxyribonuclease, enterotoxins, haemolysins).

Key words: harmful biological agents, virulence factors, workplaces

WSTĘP

Człowiek w miejscu pracy narażony może być na szkodliwości zawodowe wynikające z oddziaływania substancji chemicznych, pyłów, czynników fizycznych i psychospołecznych oraz czynników biologicznych. Szacuje się, że w co najmniej 148 specjalistycznych grupach zawodowych przynależnych do 22 kategorii gałęzi gospodarki występują narażenia na czynniki biologiczne [1], przez co stały się one poważnym problemem medycyny środowiskowej. Problem ten coraz częściej dotyka pracowników w kompostowniach [2], garbarniach [3], oraz w muzeach [4]. Konsekwencją narażenia na czynniki biologiczne są głównie infekcje górnych dróg oddechowych, alergie, astma oskrzelowa wśród pracowników kompostowni [5, 6]; zakażenia chorobami odzwierzęcymi, podrażnienia skórne, alergie wśród pracowników garbarni [7, 8]; wodniste katar, łzawienie oczu, swędzące zmiany skórne, przewlekły kaszel i duszności u osób zatrudnionych w muzeach [9, 10].

Wirulencję drobnoustrojów określają kodowane genetycznie cechy biochemiczne i strukturalne organizmu umożliwiające wywołanie choroby: toksyczność obejmująca produkcję m.in. endo- i egzotoksyn; agresywność przejawiająca się wytwarzaniem otoczek (często pełnią one jednak rolę ochronną dla mikroorganizmów), enzymów proteolitycznych, inwazyj i innych substancji hamujących lub niszczących mechanizm obronny gospodarza. Istotne znaczenie ma adherencja warunkowana wytwarzaniem fimbrii, adhezyn, egzopolisacharydów i białek powierzchniowych, a także zróżnicowanie antygenowe [11–13]. Wirulencja (zjadliwość) drobnoustrojów może być różna dla poszczególnych szczepów i zależna od warunków panujących w środowisku [14]. W przypadku bakterii *Listeria monocytogenes* (częstej przyczyny zakażeń i zatruc pokarmowych) wykazano, iż od 12% do 79% szczepów wykazuje wyraźną zjadliwość w badaniach na myszach i liniach komórkowych. Przyczynę tego zjawiska upatruje się w ekspresji hemolizyn i internalin. Natomiast właściwości adhezyjne bakterii *Pseudomonas aeruginosa* mogą zależeć nawet od konsystencji podłoża hodowlanego i czasu prowadzenia

hodowli [15, 16]. Gutarowska i wsp. (2014) wykazali że obecność materiału technicznego w pożywce hodowlanej modeluje cytotoksyczne i toksynotwórcze właściwości pleśni wyizolowanych z miejsc pracy. Szczep *Penicillium chrysogenum* wyizolowany z garbarni był wysoce cytotoksyczny wobec komórek nerek świńskich, natomiast szczep *P. chrysogenum* pochodzący z archiwów i bibliotek nie wykazywał takich właściwości. Dodatek rozdrobnionej skóry do pożywki hodowlanej spowodował wytwarzanie brevicompaniny B, aurofusaryny i fumitremorginy C przez *P. chrysogenum* z garbarni; substancji tych nie identyfikowano na innych podłożach hodowlanych [17].

W Polsce podstawę w ocenie zagrożeń biologicznych na stanowiskach pracy stanowi Rozporządzenie Ministra Zdrowia z 2005 roku [18] zawierające wykaz 389 szkodliwych czynników biologicznych, których występowanie w miejscu pracy jest jednoznaczne z występowaniem zagrożenia dla pracowników, ale rzeczywista liczba czynników mogących oddziaływać negatywnie na zdrowie pracowników może być większa (Dutkiewicz podaje, że jest ich co najmniej 622 [19]). Ponadto, dotychczas nie prowadzono badań nad chorobotwórczością mikroorganizmów wyizolowanych z miejsc pracy, a także związkiem między specyfiką konkretnego środowiska pracy (przede wszystkim przechowywanym i/lub przetwarzanym materiałem technicznym) a czynnikami wirulencji drobnoustrojów.

Dlatego też celem pierwszych w tym zakresie badań była ocena zdolności do wytwarzania wybranych czynników wirulencji u jedenastu szczepów bakterii i drożdży wyizolowanych i wyselekcjonowanych ze względu na częstość występowania ze środowiska pracy w garbarni, kompostowni, muzeum oraz określenie wpływu materiału technicznego występującego w miejscu pracy (kompostu, skóry, celulozy) na wzrost drobnoustrojów charakteryzujących się wytwarzaniem wybranych czynników wirulencji.

Prezentowana praca jest próbą odpowiedzi (badania wstępne) na pytanie w jaki sposób środowisko pracy wpływa na wirulencję mikroorganizmów chorobotwórczych.

MATERIAŁ I METODY

Miejsca izolacji bakterii i drożdży

Badane szczepy bakterii i drożdży pochodziły z pomieszczeń magazynowych w muzeum oraz produkcyjnych w kompostowniach i garbarniach, o różnej specyfice produkcji. Charakterystykę badanych szczepów wraz z opisem miejsc izolacji zamieszczono w tabeli I.

Metody izolacji i identyfikacji szczepów

Izolaty z powietrza uzyskano z próbek powietrza (50 i 100 l) pobranych metodą zderzeniową, z użyciem aparatu MAS100 (Merck Millipore, Niemcy). Próbki powietrza pobrano w odległości 1–2 m od potencjalnego źródła zanieczyszczenia mikrobiologicznego (przetwarzana skóra, kompost poddany procesom technologicznym i składowany, magazynowane eksponaty muzealne) podczas rutynowych czynności wykonywanych przez pracowników w czasie pracy. Zastosowano podłoże TSA (Tryptic Soy Agar, Merck Millipore, Niemcy) z nystatyną (0,2%), do hodowli bakterii oraz MEA (Malt Extract Agar, Merck Millipore, Niemcy) z chloramfenikolem (0,1%), do hodowli drożdży.

Izolaty z powierzchni uzyskano z wykorzystaniem płytek odciskowych RODAC Envirocheck (Merck Millipore, Niemcy) z podłożem TSA z neutralizatorami (bakterie) i podłożem Sabouraud (drożdże). Próbki pobierano z takich powierzchni jak: skóra wstępnie garbowana, skóra wykończona, urządzenia stosowane do produkcji kompostu, meble i eksponaty w muzeum, przegrody budowlane we wszystkich badanych zakładach. Próbyki z powietrza i powierzchni inkubowano w 28° C przez 48 godz. (bakterie) oraz w 30° C przez 3–5 dni (grzyby). Po inkubacji liczono wyrosłe kolonie, a uzyskany wynik przeliczono na jednostki tworzące kolonie (jtk), z uwzględnieniem objętości pobranego powietrza i powierzchni badanego obiektu, (jtk/m³ i jtk/100 cm²). Za wynik końcowy przyjęto średnią arytmetyczną z 3 powtórzeń w każdym pomieszczeniu w zakładzie pracy (badano 3 miejsca w 3–6 pomieszczeniach magazynowych/produkcyjnych, co daje liczbę prób: 27–54 w zależności od zakładu).

Wszystkie uzyskane izolaty bakterii i drożdży charakteryzowano na podstawie cech makroskopowych i mikroskopowych kolonii, pogrupowano w szczepy i przeprowadzono identyfikację z użyciem testów biochemicznych API (API 50 CH, API STAPH, API 20 E, API 20 NE, API CORYNE, API C AUX) (BioMérieux, Francja). Przeprowa-

Tabela I. Charakterystyka mikroorganizmów wykorzystywanych w badaniach
Table I. Characteristics of tested microorganisms

Nr szczepu [n]	Numer akcesyjny*	Gatunek	Liczba komórek w środowisku pracy	Częstość występowania w środowisku pracy [%]	Opis środowiska pracy, z którego wyizolowano szczep	Zanieczyszczenie mikrobiologiczne środowiska pracy		Miejsce izolacji szczepu wytypowanego do badań
						Powietrze [jtk/m ³]	Powierzchnie [jtk/100 cm ²]	
1 (n=2/1)	KF725719	<i>Bacillus cereus</i> <small>IMW</small>	2,9 × 10 ² jtk/m ³	56	kompostownia I produkująca podłoże pod uprawę pieczarek ze słomy, gipsu, odchodów końskich, wody i gnojowicy	Śr: 2,5 × 10 ⁴ Min: 7,6 × 10 ² Max: 7,9 × 10 ⁴ OS: 2,5 × 10 ⁴ N = 16/18	Śr: 2,9 × 10 ² Min: 1,5 × 10 ¹ Max: 6,2 × 10 ² OS: 2,5 × 10 ² N = 7/8	powietrze zewnętrzne przy przyrmach składowanych surowców do produkcji kompostu
10 (n=2/1)	KF725723	<i>Pseudomonas vancouverensis</i> <small>IMW</small>	3,8 × 10 ¹ jtk/m ³	100	kompostownia II produkująca podłoże pod uprawę pieczarek ze słomy, gipsu, odchodów końskich, wody i gnojowicy	Śr: 6,0 × 10 ⁴ Min: 1,8 × 10 ² Max: 5,7 × 10 ⁴ OS: 1,3 × 10 ⁴ N = 17/17	Śr: 4,1 × 10 ² Min: 1,5 × 10 ¹ Max: 4,5 × 10 ² OS: 1,3 × 10 ⁴ N = 15/4	powietrze w hali sprzedażowej
3 (n=2/1)	KC182056	<i>Bacillus pumilus</i> <small>IMW</small>	1,1 × 10 ³ jtk/m ³	86	kompostownia III przetwarzająca odpady zielone z terenów miejska, przyrmowa	Śr: 1,8 × 10 ⁴ Min: 2,3 × 10 ³ Max: 5,5 × 10 ⁴ OS: 1,4 × 10 ⁴ N = 10/12	Śr: 3,3 × 10 ³ Min: 2,8 × 10 ³ Max: 4,1 × 10 ³ OS: 6,9 × 10 ² N = 6/6	powietrze w pobliżu przyrm kompostowych przerzucanych mechanicznie

2 (n=4/1)	KC182060	<i>Bacillus cereus</i> IMW	3,51 x 10 ¹ jtk/m ³	79	garbarnia I przetwarzająca skóry surowe do skór wstępnie garbowanych oraz wykończonych	Śr: 3,7 x 10 ³ Min: 5,8 x 10 ² Max: 6,1 x 10 ³ OS: 4,6 x 10 ² N = 26/13	Śr: 3,7 x 10 ² Min: 3,2 x 10 ² Max: 4,3 x 10 ² OS: 7,6 x 10 ¹ N = 9/11	powietrze w pomieszczeniu produkcyjnym przy paletach ze skórą surową
4 (n=3/1)	KC182057	<i>Bacillus pumilus</i> IMW	2,3 x 10 ² jtk/m ³	57				powietrze w pomieszczeniu produkcyjnym przy strugarce do skóry wet blue
8 (n=2/0)	KF725720	<i>Corynebacterium lubricantis</i> IMW	1,1 x 10 ² jtk/m ³	79				powietrze w pomieszczeniu produkcyjnym przy bębnie do barwienia skór
5 (n=2/2)	KC182059	<i>Bacillus subtilis</i> RMZ, IMW	1,0 x 10 ¹ jtk/100 cm ²	60				powierzchnia skóry wet blue składowanej na palecie w pomieszczeniu produkcyjnym
7 (n=3/1)	KC182053	<i>Candida parapsilosis</i>	4,6 x 10 ¹ jtk/m ³	62	garbarnia II specjalizująca się w wykańczaniu skór wet blue	Śr: 1,2 x 10 ³ Min: 4,1 x 10 ² Max: 3,6 x 10 ³ OS: 5,4 x 10 ² N = 17/22	powietrze w pomieszczeniu produkcyjnym w dziale mokrym, obok wieszaków z posortowaną skórą dogarbowaną	
9 (n=1/1)	KC182054	<i>Cryptococcus albidus</i>	2,1 x 10 ¹ jtk/100 cm ²	100	garbarnia III specjalizująca się w wykańczaniu skór wet blue	Śr: 1,2 x 10 ³ Min: 4,0 x 10 ¹ Max: 4,9 x 10 ³ OS: 6,9 x 10 ² N = 17/10	powierzchnia przetwarzanej skóry wet blue	
6 (n=2/3)	KC182058	<i>Bacillus subtilis</i> RMZ, IMW	1,2 x 10 ¹ jtk/100 cm ²	67				powierzchnia zażytkowej, drewnianej skrzyni przechowywanej w magazynie w piwnicy
11 (n=3/2)	KC182061	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1,9 x 10 ² jtk/m ³	100	muzeum I o charakterze archeologiczno-etnograficznym	Śr: 4,9 x 10 ² Min: 1,0 x 10 ¹ Max: 2,4 x 10 ³ OS: 5,1 x 10 ² N = 31/7	powietrze w magazynie przechowującym obiekty związane z gospodarstwem i przemyśleśm wiejskim (obiekty z drewna, wikliny, żelaza z XIX i XX w.)	

* - GenBank National Center for Biotechnology Information Database;

nd - nie dotyczy (not applicable);

RMZ - 2 klasa zagrożenia zdrowotnego dla pracowników wg Rozporządzenia Ministra Zdrowia z 2005 [15] (2nd class of health risk for workers acc. to the Edict of Minister of Health [15])

IMW - 2 klasa zagrożenia zdrowotnego dla pracowników wg klasyfikacji Instytutu Medycyny Wsi w Lublinie [16] (2nd class of health risk for workers acc. to classification of the Rural Institute of Medicine in Lublin [16]);

Śr - średnia arytmetyczna ze wszystkich powtórzeń (arithmetic mean of all repetitions);

Min/Max - minimalna/maksymalna wartość (minimum/maximum value);

OS - odchylenie standardowe (standard deviation);

N - liczba wszystkich izolatów bakterii/grzybów (number of all bacterial isolates/fungi);

n - liczba izolatów badanego szczepu w powietrzu/na powierzchni (number of isolates of tested strain in the air/ on the surface)

dzona analiza biochemiczna wykazała prawdopodobieństwo identyfikacji wynoszące 89,0–99,9% zgodności w zależności od szczepu. Do badań wyselekcjonowano szczepy charakteryzujące się najwyższą częstością występowania w rozpatrywanych środowiskach oraz potencjalną chorobotwórczością na podstawie literatury. Częstość występowania (f) szczepów obliczono według wzoru:

$$f = a/n \cdot 100\%$$

gdzie:

- a – liczba próbek, w których wystąpił dany szczep;
- n – liczba próbek (ze wszystkich powtórzeń) pobranych z powietrza lub powierzchni w danym środowisku pracy

Przynależność taksonomiczną szczepów wytypowanych do badań czynników wirulencji weryfikowano analizą genetyczną w oparciu o sekwencję nukleotydową genu 16S rRNA (bakterie) oraz sekwencje regionu ITS rDNA (drożdże). Izolację genomowego DNA wykonano przy użyciu zestawu „Bead-beat micro gravity” (A&A Biotechnology, Polska). Użyto następujących starterów – dla bakterii: B-all For: GAG TTT GAT CCT GGC TCA G; B-all Rev: ACG GCT

ACC TTA CGA CTT; dla drożdży ITS 1: TTC GTA GGT GAA CCT GCG G; ITS4: TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC. Reakcję PCR prowadzono w objętości 50 l. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziło: 5 l (~50 ng) genomowego DNA wyizolowanego z próbki, 25 l 2xPCR Master Mix Plus High GC (A&A Biotechnology, Polska) 0,1 l startera B-all For o stężeniu 100 mM i 0,1 l startera B-all Rev o stężeniu 100 mM oraz 23,8 l wody jałowej. Reakcję przeprowadzono w warunkach: denaturacja wstępna (94° C, 2 min) oraz następnie po 30 cyklach: denaturacja właściwa (94° C, 30 s), hybrydyzacja primerów (58° C dla bakterii, 52° C dla drożdży, 45 s); elongacja (72° C, 1 min) i elongacja właściwa (72° C, 5 min). Fragmenty DNA uzyskane w wyniku reakcji amplifikacji oczyszczano za pomocą zestawu Clean-Up AX firmy A&A Biotechnology i sekwencjonowano. Uzyskane sekwencje nukleotydowe dla badanych mikroorganizmów analizowano i porównywano z sekwencjami opublikowanymi w bazie danych The National Center for Biotechnology Information (NCBI) za pomocą programu BLASTN 2.2.27+. Uzyskane w wyniku analizy genetycznej sekwencje (zgodność identyfikacji 99,9%) zostały opublikowane w GenBank NCBI database (tab. I).

Tabela II. Pożywki stosowane w badaniach

Table II. Media used in the study

Lp.	Rodzaj pożywki	Zastosowanie
1	Bulion tryptonowo sojowy z peptonem kazeinowym i peptonem (TSB); pH 7,3±0,2 (Merck Millipore, Polska)	Do aktywacji i namnażania szczepów bakterii
2	Bulion z ekstraktem słodowym (MEB) pH 4,8±0,2 (Merck Millipore, Polska)	Do aktywacji i namnażania szczepów drożdży
3	Agar z krwią pH 7,4 ± 0,2 (Oxoid, Niemcy)	Badania właściwości hemolitycznych drobnoustrojów
4	Podłoże M0 ze skórą wet blue (M0+ skóra wet blue) Rozdrobniona skóra wet blue 10% pH 6,7±0,2	Badanie toksynotwórczości oraz zdolności drobnoustrojów wyizolowanych z garbarni do wytwarzania otoczek polisacharydowych na podłożach środowiskowych
5	Podłoże M0 z kompostem (M0+kompost). Wyciąg z kompostu (zawiesina 100 g kompostu w 1000 ml wody destylowanej wytrząsana 30 min, filtrowana próżniowo i sterylizowana, dodatek 50%) pH 6,4±0,2	Badanie toksynotwórczości oraz zdolności do wytwarzania otoczek polisacharydowych przez drobnoustroje wyizolowane z kompostowni na podłożu środowiskowym
6	Podłoże M0 z celulozą (M0+celuloza) Carboxymethylcellulose sodium salt 5% (Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone) pH 6,6±0,2	Badanie zdolności wytwarzania otoczek polisacharydowych przez drobnoustroje wyizolowane z muzeum na podłożu środowiskowym
7	Hydrolizat kazeiny z wyciągiem glukozowym (CGY) pH 6,8 ± 0,2 (Merck Millipore, Polska)	Badanie toksynotwórczości bakterii z rodzaju <i>Bacillus</i>
8	Podłoże TSB z dodatkiem mleka pH 7,5	Badanie zdolności do wytwarzania proteiny drobnoustrojów wyizolowanych z miejsc pracy
9	Podłoże Difco™ Spirit Blue Agar pH 6,8±0,2 (BD, Stany Zjednoczone)	Badanie zdolności do wytwarzania lipazy przez bakterie <i>Staphylococcus</i>
10	Podłoże TSB z dodatkiem żelatyny pH 6,8±0,2	Badanie zdolności do wytwarzania żelatynazy przez bakterie <i>Staphylococcus</i> i <i>Bacillus</i>
11	Podłoże z dodatkiem DNA pH 7,3±0,2 (GRASO BIOTECH-Polska)	Badanie zdolności do wytwarzania deoksyrybonukleazy przez bakterie <i>Staphylococcus</i>

Badane czynniki wirulencji

Analizowano wybrane na podstawie literatury [20, 21] następujące czynniki wirulencji badanych drobnoustrojów: wytwarzanie otoczek polisacharydowych, właściwości hemolityczne, wytwarzanie proteiny (wszystkie szczepy bakterii i drożdży), zdolność do produkcji żelatyny i enterotoksyn (bakterie z rodzaju *Bacillus*: *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. subtilis*), wytwarzanie żelatynazy, lipazy, koagulazy, deoksyrybonukleazy (bakterie *Staphylococcus haemolyticus*).

Stosowane w badaniach podłoża mineralne symulujące warunki środowiskowe

Wytwarzanie otoczek oraz właściwości toksynotwórcze określono z wykorzystaniem pożywek standardowo stosowanych w tym celu oraz podłoży symulujących warunki środowiskowe (opisane w tabeli II).

Wytwarzanie otoczek polisacharydowych

Wytwarzanie otoczek polisacharydowych określono z zastosowaniem metody Burri-Ginsa (barwienie roztworem nigrozyny) po hodowli szczepów na podłożu TSB (Tryptic Soy Broth, Merck Millipore) oraz podłożu symulującym warunki środowiskowe w temperaturze 37° C przez 24 godziny.

Badania właściwości hemolitycznych

Badanie hemolizy (występowanie oraz typ hemolizy) określono z zastosowaniem podłoża Columbia Blood Agar (Oxoid). Próbkę inkubowano w temperaturze 37° C przez 48 godzin.

Wytwarzanie proteiny

Właściwości proteolityczne wszystkich badanych szczepów badano na podłożu z dodatkiem mleka. Próbkę inkubowano w temperaturze 37°C przez 48 godzin.

Badanie toksynotwórczości bakterii z rodzaju *Bacillus*

Badanie toksynotwórczości – produkcji niehemolitycznej enterotoksyny (NHE) i hemolitycznej BL (HBL) wykonywano przy użyciu testów immunologicznych Duopath® *Cereus* (Merck Millipore). Przeprowadzenie testu poprzedzała 24-godzinna inkubacja szczepów w podłożu kontrolnym CGY (Caseinhydrolysate Glucose Yeast Extract Broth) (Merck Millipore) oraz podłożu środowiskowym (tabela III).

Wytwarzanie żelatynazy

Wytwarzanie żelatynazy określano na podłożu TSB z dodatkiem 20% żelatyny farmaceutycznej. Próbkę inkubowano przez okres 48 godzin w tem-

peraturze 37° C; wynik odczytywano po 2-godzinnej inkubacji w temperaturze 4° C.

Wytwarzanie lipazy

Wytwarzanie lipazy określano na podłożu Difco™ Spirit Blue Agar BD). Próby inkubowano w temperaturze 37°C przez 48 godzin.

Wytwarzania koagulazy

Badanie zdolności do wytwarzania czynnika zlepnego – clumping factor (CF) i koagulazy prowadzono z 24 godzinnej hodowli bakterii na podłożu TSA wykorzystując osocze królicze – metoda szkiełkowa oraz probówkowa.

Wytwarzanie deoksyrybonukleazy

Deoksyrybonukleazę wykrywano na podłożu DNA-se agar (GRASO BIOTECH Polska). Próby inkubowano w temperaturze 37° C przez 48 godzin, wynik odczytywano po zalaniu hodowli 1M roztworem HCl.

Tabela III. Typ hemolizy, wytwarzanie otoczek polisacharydowych oraz proteiny dla badanych szczepów wyizolowanych z miejsc pracy

Table III. Type of hemolysis, the production of polysaccharide capsules and proteinase for the tested strains isolated from workposts

Nr szczepu	Gatunek (miejsca izolacji)	Typy hemolizy	Otoczki polisacharydowe	Proteinaza
1	<i>Pseudomonas vancoverensis</i> (K)	α	-	-
2	<i>Bacillus cereus</i> (K)	β	-	-
3	<i>Bacillus cereus</i> (G)	α	-	-
4	<i>Bacillus pumilus</i> (K)	α	-	+
5	<i>Bacillus pumilus</i> (G)	α	-	+
6	<i>Bacillus subtilis</i> (G)	β	-	+
7	<i>Bacillus subtilis</i> (M)	α	-	+
8	<i>Corynebacterium lubricantis</i> (G)	-	-	-
9	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (M)	β	-	-
10	<i>Candida parapsilosis</i> (G)	-	-	-
11	<i>Cryptococcus albidus</i> (G)	-	+	-

K – kompostownia (*composting plant*);

G – garbarnia (*tannery*);

M – muzeum (*museum*);

„α” – niepełna hemoliza (*incomplete hemolysis*);

„β” – całkowita hemoliza (*complete hemolysis*);

* – cecha występująca także dla szczepu hodowanego w podłożu środowiskowym (*feature observed for the strain grown also on environmental substratum*);

„+” – wykryto (*detected*);

„-” – nie wykryto (*not detected*)

WYNIKI

Wytypowane do badań szczepy bakterii i drożdży pochodziły z powietrza lub powierzchni w środowiskach pracy o różnej specyficy: kompostownie produkujące podłoża pod uprawę pieczarek (2 szczepy); kompostownia bioodpadów z obszaru miejskiego (1); garbarnie skór surowych (3); garbarnie skór wet blue (3), muzeum o charakterze archeologiczno-etnograficznym (2). Rozpatrywane środowiska pracy były w różnym stopniu zanieczyszczone mikrobiologicznie. Najwyższą liczbę drobnoustrojów w powietrzu odnotowano w kompostowniach ($1,8 \times 10^4 - 6,0 \times 10^4$ jtk/m³), nieznacznie niższą w garbarniach ($1,2 \times 10^3 - 3,7 \times 10^3$ jtk/m³), najniższą w muzeum ($4,9 \times 10^2$ jtk/m³). Liczba drobnoustrojów na powierzchniach w badanych zakładach kształtowała się na poziomie od $7,6 \times 10^1$ do $5,9 \times 10^2$ jtk/100 m²) (tabela I).

Szczepy wytypowane do badań występowały w zakładach pracy z wysoką częstością, wynoszącą 56–100% (tab. II). W wysokiej liczbie w rozpatrywanych obiektach występowały szczepy *Bacillus pumilus* ($2,3 \times 10^2 - 1,1 \times 10^3$ jtk/m³), *B. cereus* ($3,5 \times 10^1 - 2,9 \times 10^2$ jtk/m³) oraz *Staphylococcus haemolyticus* ($1,9 \times 10^2$ jtk/m³) pozostałe szczepy

występowały w powietrzu w liczbie $2,1 \times 10^1 - 1,1 \times 10^2$ jtk/m³ i na powierzchniach $1,0 \times 10^1 - 2,1 \times 10^1$ jtk/100 cm² (tabela I).

Wykazano, iż 8 spośród 11 poddanych badaniom szczepów wykazywała właściwości hemolityczne (tab. III). Dla 5 bakterii (*Bacillus cereus* i *Pseudomonas vancoverensis* – szczepy z garbarni, *Bacillus pumilus*: z garbarni i kompostowni oraz *Bacillus subtilis* z muzeum) wykryto hemolizę typu α .

Wśród badanych drobnoustrojów trzy szczepy wykazywały zdolność hemolizy typu β : *Bacillus cereus* (kompostownia), *Bacillus subtilis* (garbarnia), a także *Staphylococcus haemolyticus* (muzeum). Pozostałe testowane mikroorganizmy nie wykazywały właściwości hemolitycznych.

Badania zdolności do wytwarzania otoczek polisacharydowych wykazały, iż cechą tą wykazuje jedynie *Cryptococcus albidus* (izolat z garbarni) (tabela III). Wytwarzanie otoczek odnotowano po hodowli drożdży w podłożu TSB, jak również w podłożu mineralnym zawierającym strużyny skóry wet blue (symulującym środowisko pracy).

Właściwości proteolityczne wykazały jedynie bakterie z rodzaju *Bacillus*: *B. pumilus* i *B. subtilis* (wyizolowane z garbarni) oraz *B. pumilus* (z kompostowni), *B. subtilis* (z muzeum) (tabela III).

Dla szczepów środowiskowych należących do rodzaju *Bacillus* zweryfikowano wytwarzanie żelatyny oraz analizę toksyczności zmierzającą do wykrycia niehemolitycznej enterotoksyny (NHE) i hemolizyny BL (HBL). Wszystkie badane szczepy *Bacillus* wykazywały zdolność do rozkładu żelatyny w podłożu hodowlanym (tabela IV), natomiast właściwości toksynotwórcze wykryto dla *B. cereus*. Szczep *B. cereus* z kompostowni produkował NHE,

Tabela IV. Toksynotwórczość i wytwarzanie żelatynazy dla bakterii z rodzaju *Bacillus* wyizolowanych z miejsc pracy
Table IV. Toxigenicity and gelatinase production for bacteria of the genus *Bacillus* isolated from workposts

Gatunek (miejsce izolacji)	Wytwarzanie żelatynazy	Produkcja toksyn	
		Podłoże CGY	Podłoże M0 z dodatkiem wyciągu z kompostu lub strużyn skóry wet blue
<i>Bacillus cereus</i> (K)	+	NHE (+)	NHE (+)
<i>Bacillus cereus</i> (G)	+	NHE (+), HBL (+)	–
<i>Bacillus pumilus</i> (K)	+	–	–
<i>Bacillus pumilus</i> (G)	+	–	–
<i>Bacillus subtilis</i> (M)	+	–	–
<i>Bacillus subtilis</i> (G)	+	–	–

K – kompostownia (*composting plant*);
G – garbarnia (*tannery*);
M – muzeum (*museum*);
NHE – niehemolityczna enterotoksyna (*non haemolytic enterotoxin*);
HBL – hemolityczna BL (termostabilna trójskładnikowa enterotoksyna) (*haemolytic BL – thermostable ternary enterotoxin*);
„+” – wykryto (*detected*);
„–” – nie wykryto (*not detected*).

Tabela V. Wytwarzanie lipazy, koagulazy, czynnika zlepnego, żelatynazy i deoksyrybonukleazy przez szczep *Staphylococcus haemolyticus* wyizolowany z muzeum
Table V. Production of lipase, coagulase, gelatinase and deoxyribonuclease by *Staphylococcus haemolyticus* isolated from the museum

Gatunek (miejsce izolacji)	Wytwarzanie enzymu				
	Lipaza	Koa-gulaza	CF	Żela-tynaza	Deo-ksyry-bonu-kleaza
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (M)	+	–	–	–	+

M – muzeum (*museum*);
CF – czynnik zlepnny (*clumping factor*);
„+” – wykryto (*detected*);
„–” – nie wykryto (*not detected*).

bez względu na rodzaj podłoża hodowlanego. Szczep z garbarni na podłożu kontrolnym wytwarzał obie poszukiwane toksyny, natomiast na podłożu z dodatkiem materiału ze środowiska pracy (strużyn skór wet blue) toksyn nie wykryto. Pozostałe badane szczepy nie produkowały żadnej z poszukiwanych toksyn (tabela IV).

S. haemolyticus ze środowiska muzealnego charakteryzował się produkcją lipazy i deoksyrybonukleazy, nie wykryto wytwarzania czynnika zlepnego, koagulazy oraz żelatynazy dla tego szczepu (tabela V).

DYSKUSJA

Celem pracy była ocena zdolności mikroorganizmów wyizolowanych z miejsc pracy (kompostowni, garbarni, muzeum) do wytwarzania wybranych czynników wirulencji.

Wg Rozporządzenia Ministra Zdrowia z 2005 r., spośród badanych mikroorganizmów, gatunek *Bacillus subtilis* należy do drugiej grupy zagrożenia zawodowego [18]. Szersza klasyfikacja szkodliwych czynników biologicznych opracowana została w 2007 r. przez Instytut Medycyny Wsi w Lublinie [19]. Wskazuje ona na zagrożenie zawodowe także ze strony bakterii należących do gatunku *Bacillus cereus* i *B. pumilus* oraz bakterii z rodzaju *Pseudomonas* i *Corynebacterium*.

Pomimo zaklasyfikowania *Staphylococcus haemolyticus*, *Candida parapsilosis* i *Cryptococcus albidus* do drobnoustrojów nie zagrażających zdrowiu pracowników przez obie klasyfikacje, można znaleźć w literaturze dane na temat ich zdolności do wzrostu w organizmie człowieka [20–24]. Podkreślić należy, iż szczepy wytypowane do badań izolowano z częstotnością wynoszącą 56–100%, a więc ryzyko kontaktu pracownika w miejscu pracy z badanymi drobnoustrojami było duże. W pracy nie badano uwarunkowań genetycznych szczepów determinujących ich chorobotwórczość, skupiono się na ekspresji najważniejszych czynników wskazujących, że szczepy tych gatunków potencjalnie mogą zagrażać zdrowiu ludzi.

Właściwości hemolityczne wykazano dla 8 szczepów bakteryjnych, najsilniejszymi właściwościami hemolitycznymi obdarzone były: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus haemolyticus*. Przyczyną uszkodzeń błony komórkowej czerwonych krwinek oraz innych komórek ssaków mogą być m.in. toksyny (hemolizyny) wytwarzane przez bakterie potencjalnie chorobotwórcze [23]. Bakterie z rodzaju *Bacillus*, wytwarzają cztery typy hemolizyn tj. hemolizynę II, hemolizynę BL, hemolizynę III czy

hemolizynę podobną do cereolizyny (cereolizyna-ciepłolabilna hemolizyna aktywowana przez grupy tiolowe, wykazuje podobieństwo do streptolizyny O) [23]. Dlatego też wyniki uzyskane dla bakterii z rodzaju *Bacillus* to przede wszystkim hemoliza niepełna oraz całkowita. Biorąc pod uwagę silne właściwości hemolityczne środowiskowych szczepów *Bacillus*, przeprowadzono badanie toksynotwórczości ukierunkowane na toksyny NHE i HBL. Szczepy z rodzaju *Bacillus* poddano badaniom określającym zdolność do produkcji żelatynazy oraz toksyn. Dla wszystkich szczepów potwierdzono zdolność do rozkładu żelatyny. Interesujący jest fakt, iż szczepy *B. cereus* nie wykazały zdolności proteolitycznych względem białek mleka, natomiast ujawniły zdolności do rozkładu żelatyny. Zaobserwowano ponadto różne zdolności do produkcji enterotoksyn przez *B. cereus*, w zależności od szczepu oraz podłoża hodowlanego. *B. cereus* z kompostowni zachowywał zdolność do produkcji niehemolitycznej enterotoksyny NHE, zarówno na podłożu standardowym dla przeprowadzonego testu (CGY), jak również na podłożu mineralnym z dodatkiem wyciągu z kompostu. Natomiast szczep wyizolowany z garbarni produkował obie badane toksyny (NHE oraz hemolizynę BL), jednakże wzrost na podłożu symulującym warunki środowiskowe (z dodatkiem rozdrobnionej skóry wet blue) zahamował jego toksynotwórczość.

Toksyna NHE jest produkowana przez ponad 90% szczepów *B. cereus*, natomiast HBL występuje u ok. 55% [28]. Obie toksyny mogą wywołać u pracowników zatrucia pokarmowe po spożyciu produktów zanieczyszczonych formami roślinnymi i przetrwalnikami *B. cereus* [23]. Obie toksyny także wywołują efekt cytotoksyczny, jednak HBL częściej powoduje letalność myszy [28]. Białkowe enterotoksyny (NHE i HBL), odpowiedzialne są za niszczenie błony plazmatycznej komórki gospodarza i wywoływanie lizy komórek. Dzięki tym właściwościom powodują wzrost inwazyjności i zjadliwości [23].

Badania przeprowadzone dla izolatu *S. haemolyticus* potwierdziły wytwarzanie hemolizyny. Hemolizyna produkowana przez gatunek *S. haemolyticus* może być odpowiedzialna za zjadliwość i patogenność wobec osób z zaburzeniami immunologicznymi [24, 25]. Hemolizy nie powodowały *Corynebacterium lubricantis*, *Candida parapsilosis* i *Cryptococcus albidus*.

Spośród 11 szczepów tylko dla drożdży *Cryptococcus albidus* wykryto wytwarzanie otoczki polisacharydowej, także na podłożu mineralnym ubogim w substancje odżywcze i zawierającym rozdrobnioną skórę wet blue pochodzącą z garbarni. Przyj-

muje się, iż wytwarzanie otoczek polisacharydowych przez drożdże z rodzaju *Cryptococcus* charakteryzuje szczepy chorobotwórcze [26]. W literaturze opisano nieliczne przypadki infekcji pochwy czy zapalenie ośrodkowego układu nerwowego wywołanych przez drożdże z rodzaju *Cryptococcus albidus* [26]. Skład chemiczny otoczek mikroorganizmów może być różny, najczęściej zbudowane są one z wielocukrów, u niektórych gatunków natomiast z polipeptydów. Większość gatunków otoczki tworzy dopiero w tkankach zakażonego ustroju, stanowią one tym samym element obronny przed odpornościowymi mechanizmami ustroju wyższego. W hodowlach na pożywkach laboratoryjnych otoczka u wielu gatunków zanika [20], zjawisko to mogło być powodem niewykrycia otoczek u pozostałych analizowanych szczepów.

Szczepy *Bacillus pumilus* i *B. subtilis* charakteryzowały się zdolnością do produkcji proteinaz. Uważane są one za czynniki zjadliwości w procesie patogenezy zakażeń. Prowadzą do enzymatycznego rozpadu białek gospodarza, z których patogen może czerpać aminokwasy do syntezy własnych białek, a co za tym idzie wzrastać i rozprzestrzeniać się w zakażonym organizmie [27]. Jednak wyjaśnienie tych zagadnień wymaga dodatkowych badań, gdyż aktywność proteolityczna jest popularna w świecie drobnoustrojów i nie zawsze musi oznaczać chorobotwórczość, ale również zdolność do zasiedlenia i degradacji białek w środowisku występowania szczepów. Według literatury szczepy z rodzaju *Bacillus subtilis* i *Bacillus pumilus* charakteryzują się wysoką zdolnością do wytwarzania enzymów proteolitycznych [20, 21].

Wytwarzanie lipaz jest jednym z najważniejszych produktów sekrecyjnych gronkowców odpowiedzialnych za ich patogenność [22, 24]. Wytwarzanie lipaz umożliwia gronkowcom efektywną kolonizację i uszkodzenie tkanek gospodarza; wśród szczepów *S. haemolyticus* jest to jedna z cech pozwalających zidentyfikować szczepy chorobotwórcze. *S. haemolyticus* z muzeum był zdolny do produkcji lipaz. Co więcej izolat ten wytwarzał deoksyrybonukleazę. Omawiane badania potwierdzają dotychczasowe nieliczne doniesienia na temat produkcji deoksyrybonukleazy przez gatunek *S. haemolyticus* [29].

Badany gronkowiec nie wytwarzał koagulazy, czynnika zlepnego i żelatynazy. Większość naukowców klasyfikuje bakterie *Staphylococcus haemolyticus* jako koagulazo-ujemne. Przeprowadzony test wykazał, iż *Staphylococcus haemolyticus* nie posiada zdolności do wytwarzania żelatynazy, potwierdza to wcześniejsze badanie prowadzone przez De Vos. [27].

Stwierdzono, iż *Corynebacterium lubricantis* i *Candida parapsilosis* nie wytwarzają żadnych z badanych czynników wirulencji. W literaturze jest niewiele informacji na temat chorobotwórczości *C. lubricantis*. Lei i wsp. (2007) [28] sygnalizują że wszystkie bakterie z rodzaju *Corynebacterium*, powinny być rozpatrywane jako potencjalnie chorobotwórcze, szczególnie jeśli izolowane są w liczbie powyżej 104 jtk/ml. Istnieją doniesienia, iż *Candida parapsilosis* może atakować układ pokarmowy oraz oddechowy, narządy rodne, skórę, błony śluzowe, a nawet wywoływać zaburzenia psychiczne u osób z zaburzeniami immunologicznymi [29]. Dlatego nie można jednoznacznie stwierdzić, że szczepy te nie są zdolne do powodowania dolegliwości i zachorowań w środowisku garbarni, skąd zostały wyizolowane. Prezentowane badania mają za zadanie zwrócić uwagę na problem zagrożeń biologicznych w miejscu pracy, powodowanych często przez mało zbadane szczepy, których właściwości pod wpływem warunków środowiska mogą ulegać modyfikacjom.

WNIOSKI

1. W środowisku pracy kompostowni, garbarni i muzeów istnieje potencjalne zagrożenie dla zdrowia pracowników, ze względu na występowanie z wysoką częstością bakterii i drożdży, które zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z 2005 r. i/lub danymi literaturowymi klasyfikowane są do szkodliwych czynników biologicznych.
2. Bakterie *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. pumilus* wyizolowane z kompostowni, garbarni i muzeum mogą być rozpatrywane jako patogenne ze względu na tworzenie toksyn (niehemolitycznej enterotoksyny NHE i hemolitycznej BL), hemolizyn, proteinaz i żelatynazy.
3. *Staphylococcus haemolyticus* wyizolowany z muzeum może być rozpatrywany jako drobnoustrój potencjalnie chorobotwórczy ze względu na właściwości hemolityczne, lipolityczne oraz wytwarzanie deoksyrybonukleazy.
4. Drożdże *Cryptococcus albidus*, wyizolowane z garbarni, ze względu na zdolność do wytwarzania otoczek polisacharydowych, mogą być traktowane jak potencjalne patogeny człowieka.
5. Warunki panujące w środowisku badanych szczepów z rodzaju *Bacillus* modyfikują zdolność do wytwarzania toksyn: niehemolitycznej enterotoksyny (NHE) i hemolitycznej BL (HBL). Obecność w pożywce skóry lub kompostu może stymulować lub hamować wytwarzanie toksyn, w zależności od gatunku bakterii i rodzaju toksyny.

6. Zaleca się przeprowadzenie analogicznych badań również dla mikroorganizmów izolowanych w innych miejscach pracy, korzystając z pożywek mikrobiologicznych symulujących warunki środowiska ich wzrostu.

Źródło finansowania: publikacja przygotowana na podstawie wyników uzyskanych w ramach programu wieloletniego „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy” – II etap, okres realizacji: lata 2011–2013, koordynowanego przez Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy.

PIŚMIENNICTWO

- Górny R.L., Dutkiewicz J.: Biologiczne czynniki szkodliwe dla zdrowia – klasyfikacja i kryteria oceny narażenia. *Med Pr* 2002; 53(1): 29-39.
- Buczyńska A., Sowiak M., Szadkowska-Stańczyk I.: Ocena ekspozycji zawodowej na drobnoustroje mezofile podczas prac związanych z produkcją podłoża do przemysłowej uprawy grzybów. *Med Pr* 2008; 59(5): 373-379.
- Gutarowska B., Piotrowska M.: Zanieczyszczenie mikrobiologiczne powietrza na stanowiskach pracy w garbarni. *Ekologia i Technika* 2008; 16(5): 224-228.
- Skóra J., Zduniak K., Gutarowska B. i wsp.: Szkodliwe czynniki biologiczne na stanowiskach pracy w muzeach. *Med Pr* 2012; 63(2): 153-165.
- Bünger J., Schappler-Scheele B., Hilgers R. i wsp.: A 5-year follow-up study on respiratory disorders and lung function in workers exposed to organic dust from composting plants. *Int Arch Occup Environ Health* 2007; 80(4): 306-312.
- Byeon J.H., Park C.W., Yoon K.Y. i wsp.: Size distributions of total airborne particles and bioaerosols in a municipal composting facility. *Bioresour Technol* 2008; 99(11): 5150-5154.
- Reid C.A., Small A., Avery S.M. i wsp.: Presence of foodborne pathogens on cattle hides. *Food Control* 2002; 13(6-7): 411-415.
- Biswas S., Rahman T.: The Effect of Working Place on Worker's Health in a Tannery in Bangladesh. *Advances in Anthropology* 2013; 3(1): 46-53.
- Wiszniewska M., Walusiak-Skorupa J., Pannenko I. i wsp.: Occupational exposure and sensitization to fungi among museum workers. *Occup Med* 2009; 59(4): 237-242.
- Tsangaras K., Greenwood A.D.: Museums and disease: Using tissue archive and museum samples to study pathogens. *Ann Anat* 2012; 194(1): 58-73.
- Witkowska D., Bartyś A., Gamian A.: Białka osłony komórkowej pałeczek jelitowych i ich udział w patogenności oraz odporności przeciwbakteryjnej. *Postepy Hig Med Dosw (online)* 2009; 63: 176-199.
- Casadevall A., Pirofski L.A.: Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J Infect Dis* 2001; 184(3): 337-344.
- Thomas S.R., Elkinton J.S.: Pathogenicity and virulence. *J Invertebr Pathol* 2004; 85(3): 146-151.
- Cross A.S. Commentary: What is a virulence factor? *Critical Care* 2008; 12(6): 196.
- Roche S.M., Gracieux P., Milohanic E. i wsp.: Investigation of specific substitutions in virulence genes characterizing phenotypic groups of low-virulence field strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(10): 6039-6048.
- Deptuła A., Mikucka A., Gospodarek E.: Wpływ warunków hodowli na hydrofobowe właściwości wielolekoopornych szczepów *Pseudomonas aeruginosa*. *Med Dośw Mikrobiol* 2004; 56: 359-364.
- Gutarowska B., Skóra J., Stępień Ł. i wsp.: Estimation of moulds contamination and mycotoxins production at the workplaces. *World Mycotoxin Journal* 2013; 7: 345-355.
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dn. 22 kwietnia 2005 (DzU z 2005, nr 81, poz.716 ze zm. DzU 2008, nr 48, poz.288) w sprawie szkodliwych czynników biologicznych dla zdrowia w środowisku pracy oraz ochrony zdrowia pracowników zawodowo narażonych na te czynniki.
- Dutkiewicz J., Śpiewak R., Jabłoński L. i wsp.: Biologiczne Czynniki Zagrożenia Zawodowego. Klasyfikacja, Narażone Grupy Zawodowe, Pomiary, Profilaktyka. Ad Punctum, Lublin 2007.
- Zaremba M.L.: Mikrobiologia lekarska: podręcznik dla studentów medycyny. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1997.
- Szewczyk E.M.: Diagnostyka bakteriologiczna. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.
- Jabłoński L.: Podstawy mikrobiologii lekarskiej. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1986.
- Bednarczyk A., Daczowska Kozon G.E.: Czynniki patogenności bakterii z grupy *Bacillus cereus*. *Post Mikrob* 2008; 47(1): 51-63.
- Jawetz E., Melnick J.L., Adelberg E.A.: Review of Medical Microbiology. Appleton & Lange, California 1987.
- Molnar, C., Hevessy, Z., Rozgonyi, F. i wsp.: Pathogenicity and virulence of coagulase negative staphylococci in relation to adherence, hydrophobicity, and toxin production in vitro. *J Clin Pathol* 1994; 47(8): 743-748.
- Kreger-van Rij N.J.W.: The yeast, a taxonomical study. Els Sci Publ BV, Amsterdam 1984.
- Travis J., Potempa J., Maeda H.: Are bacterial proteinases pathogenic factors? *Trends Microbiology* 1995; 3(10): 405-407.
- Lindbäck T., Fagerlund A., Rødland M.S. i wsp.: Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology* 2004; 150: 3959-3967.
- Simango C.: Characterisation of *Staphylococcus haemolyticus* isolated from urinary tract infections. *Cent Afr J Med* 2005; 51(11-12): 112-114.
- De Vos P., Garrity G., Jones D. i wsp.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, New York 2009.
- Lei M.N., Brown H.: *Corynebacterium accolens* isolated from breast abscess: possible association with granulomatous mastitis. *J Clin Microbiol* 2007; 45(5): 1666-1668.
- van Asbeck E.C., Clemons K.V., Stevens D.A.: *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Crit Rev Microbiol* 2009; 35(4): 283-309.

Adres do korespondencji:

Justyna Skóra
Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii
Politechnika Łódzka
ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź
tel. (42) 631-34-70; e-mail: justyna-skora@wp.pl