

Received: 2013.05.16
Accepted: 2013.09.10
Published: 2013.12.06

Identyfikacja aktynobakterii środowiskowych stanowiących potencjalne zagrożenie zawodowe*

Identification of environmental *Actinobacteria* representing an occupational health risk

Justyna Skóra¹, Bogumiła Szponar², Mariola Paściak², Beata Gutarowska¹

¹Institut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Politechnika Łódzka

²Institut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu

Streszczenie

Actinobacteria (promieniowce) wywołują wiele chorób, m.in. gruźlicę, promienicę, zakażenia układu oddechowego oraz patologiczne zmiany skórne, zaliczane są też do szkodliwych czynników biologicznych w środowisku pracy. Wysoki poziom aktynobakterii stwierdzano na stanowiskach pracy w kompostowniach, w zakładach gospodarki odpadami, a także bibliotekach i muzeach.

Prawidłowa identyfikacja aktynobakterii wymaga zastosowania wieloetapowej diagnostyki, obejmującej badanie cech morfologicznych, fizjologicznych, biochemicznych i chemiotaksonomicznych oraz genotypowania, w tym analizę sekwencji 16S rRNA i hybrydyzację DNA-DNA. Komercyjnie dostępne zestawy diagnostyczne często nie uwzględniają wielu gatunków izolowanych ze środowiska, dlatego poleca się ich uzupełnienie analizą markerów chemiotaksonomicznych: składników peptydoglikanu, kwasów tłuszczowych, lipidów polarnych (fosfo- i glikolipidów) oraz chinonów izoprenowych.

W pracy omówiono metody izolacji i identyfikacji aktynobakterii, ze szczególnym uwzględnieniem metod chemiotaksonomicznych. Postępowanie diagnostyczne przedstawiono na przykładzie izolatów środowiskowych – szczepów pochodzących z kompostowni i biblioteki.

Słowa kluczowe:

***Actinobacteria* • bioaerazol • biologiczne czynniki zagrożenia środowiska pracy • identyfikacja aktynobakterii • chemiotaksonomia**

Summary

Actinobacteria, the etiologic agents of tuberculosis, actinomycosis, respiratory infections and pathological skin lesions, are also classified as hazardous biological agents at the workplace. An increased number of *Actinobacteria* primarily occurs at the workplaces in composting plants, agriculture, waste management facilities, libraries and museums. Robust identification of *Actinobacteria* requires a polyphasic diagnostic strategy including an assessment of morphological, physiological, biochemical and chemotaxonomic features as well as genotyping. Commercially available diagnostic kits often do not include bacteria isolated from the environment and therefore analyses of chemotaxonomic markers – components of peptidoglycan, fatty acids, polar lipids (phospho- and glycolipids) and isoprenoid quinones are recommended.

*Praca powstała dzięki wsparciu finansowemu ze środków programu wieloletniego „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy” – II etap, okres realizacji: lata 2011-2013, koordynowanego przez Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy.

Keywords:	The paper discusses a comprehensive approach to the isolation and identification of <i>Actinobacteria</i> , with emphasis on chemotaxonomic methods. A diagnostic procedure is exemplified by environmental strains obtained from composting plants and libraries. <i>Actinobacteria</i> • bioaerosol • biological occupational risk • Actinobacteria identification • chemotaxonomic methods
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1079001
Word count:	6082
Tables:	5
Figures:	10
References:	52

Adres autorki: dr Mariola Paściak, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda, ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, e-mail: pasciak@iitd.pan.wroc.pl

WSTĘP

Zagrożenie związane z zawodową ekspozycją na mikroorganizmy dotyczy wielu miejsc pracy i zakładów produkcji żywności, występuje w rolnictwie, służbie zdrowia, w zakładach gospodarki odpadami, w oczyszczalniach ścieków, a także w muzeach, archiwach i bibliotekach. Po wejściu w życie Dyrektywy Parlamentu Europejskiego i Rady Unii Europejskiej 2000/54/WE [11] w sprawie ochrony pracowników przed ryzykiem związanym z narażeniem na działanie czynników biologicznych w miejscu pracy, powstała konieczność doboru metod oznaczania drobnoustrojów i ich szkodliwych produktów, odpowiednich do różnych środowisk zawodowych [9,14,40].

Narażenie zawodowe na czynniki mikrobiologiczne prowadzi głównie do schorzeń dróg oddechowych i płuc, ponieważ drobnoustroje wchodzące w skład bioaerozolu dostają się do organizmu drogą inhalacji, a także poprzez infekcje bezpośrednie, przebiegające w wyniku zanieczyszczenia uszkodzonej skóry drobnoustrojami patogennymi [17].

Zanieczyszczenie mikrobiologiczne powietrza wokół obiektów komunalnych stanowi zagrożenie nie tylko dla pracowników, ale także dla osób zamieszkujących w ich otoczeniu. Bioaerozol za pomocą konwekcyjnych prądów powietrza przemieszcza się bowiem na duże odległości, od kilku do kilkudziesięciu, a nawet kilkuset metrów. O stopniu zagrożenia decyduje obecność w powietrzu mikroorganizmów chorobotwórczych, których identyfikacja w przypadku szczepów środowiskowych jest niezwykle trudna.

Wśród szkodliwych czynników biologicznych są aktynobakterie, czyli drobnoustroje należące do klasy *Actinobacteria*, tradycyjnie nazywane także promieniowcami [42]. Promieniowce wykazują typową budowę komórek mikroorganizmów należących do domeny *Bacteria*, tj.

obecność nukleoidu, strukturę ściany komórkowej zbudowanej z peptydoglikanu, w ścianie komórkowej nie stwierdza się obecności steroli.

Podwyższony poziom aktynobakterii był oznaczany w obiektach kompostowania odpadów i w rolnictwie [36]. Wykazano, że podczas kompostowania (w fazie termofilnej) liczba aktynobakterii w kompoście może wynosić $1,7 \times 10^6$ jtk/g (jtk – jednostka tworząca kolonię), a ich koncentracja w powietrzu dochodzi do $6,8 \times 10^5$ jtk/m³ [24]. Wszechstronny aparat enzymatyczny, umożliwiający wykorzystywanie różnych substancji odżywczych, pozwala promieniowcom na zasiedlanie m.in. pomieszczeń archiwalnych, muzealnych i bibliotecznych, zwłaszcza o znacznym zawilgoceniu. Następuje biodeterioracja przechowywanych obiektów i infestacja promieniowcami, przejawiająca się zwykle charakterystycznym zapachem [20,43], pochodzącym od geosminy (1,10-dimetylodeka-9-ol), alkoholu bicyklicznego o wzorze sumarycznym C₁₂H₂₂O.

Ze względu na zdolność fragmentacji pseudogrzebni powietrznej oraz wytwarzanie zarodników aktynobakterie wchodzą w skład aerozolu w środowisku pracy i w konsekwencji mogą bardzo negatywnie oddziaływać na zdrowie pracowników. *Actinobacteria* są czynnikami etiologicznymi gruźlicy, trądu, błonicy, promienicy, zakażeń układu oddechowego oraz patologicznych zmian skórnych [22,23]. Za zakażenia oportunistyczne u osób z dysfunkcją układu odpornościowego mogą być odpowiedzialne bakterie z rodzajów *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, *Corynebacterium*, *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Nocardiosis*, *Rothia* i innych.

Identyfikacja aktynobakterii, niezwykle ważna w ustaleniu etiologii zakażeń oportunistycznych, nie jest zadaniem prostym i wymaga zastosowania wieloetapowej strategii diagnostycznej. Kompleksowa diagnostyka tych drobnoustrojów obejmuje ocenę cech morfologicznych, fizjologicznych i biochemicznych, różnicowanie skład-

ników osłon komórkowych oraz genotypowanie (analiza sekwencji 16S rRNA, hybrydyzacja DNA-DNA).

Ponieważ komercyjnie dostępne zestawy diagnostyczne (np. Vitek i API firmy bioMérieux) często nie uwzględniają drobnoustrojów izolowanych ze środowiska, analiza markerów chemiotaksonomicznych, która obejmuje oznaczanie wybranych składników peptydoglikanu, kwasów tłuszczowych, lipidów polarnych (fosfo- i glikolipidów) oraz chinonów izoprenowych [32] umożliwia identyfikację drobnoustrojów do poziomu rodzaju, a w niektórych przypadkach nawet gatunku.

W pracy przedstawiono przegląd metod stosowanych w diagnostyce środowiskowych izolatów aktynobakterii oraz praktyczną procedurę postępowania ze szczepami pochodzącymi z powietrza pobranego na terenie kompostowni, prób kompostu, jak i materiału zebranego z powierzchni sprzętów w bibliotece.

Metody izolacji aktynobakterii ze środowiska

Analiza mikrobiologiczna powietrza

Analiza mikrobiologiczna powietrza znajduje szerokie zastosowanie w badaniach środowiska pomieszczenia w różnych gałęziach przemysłu farmaceutycznego, spożywczego, w szpitalach i innych miejscach pracy.

Techniki izolacji aktynobakterii z powietrza oparte są na hodowli drobnoustrojów na odpowiednich podłożach mikrobiologicznych. Najprostszą metodą poboru prób powietrza jest metoda sedymentacji (metoda Kocha). Polega ona na grawitacyjnym osiadaniu mikroorganizmów na powierzchni pożywek agarowych na płytkach Petriego.

W metodzie syfonizacji powietrze przepuszczane jest przez aparat, a zassana próba rozpyła ciecz zawartą w zbiorniku. Następuje w ten sposób wychwytywanie zanieczyszczeń pyłowych, w tym mikroorganizmów znajdujących się w badanym powietrzu. W zbiorniku adsorpcyjnym powietrze i część płynu zawierającego mikroorganizmy są dodatkowo filtrowane. Pobrane próby płynu ze zbiornika syfonizacyjnego i adsorpcyjnego miesza się i wykonuje posiewy na podłoża hodowlane [15].

Metoda zderzeniowa (impakcyjna), obecnie najczęściej stosowana w badaniach terenowych, polega na zderzeniu zassanego przez próbnik strumienia powietrza wraz z drobnoustrojami z powierzchnią zestalonej pożywki. Wyróżnia się dwie odmiany próbników powietrza, które cechuje inny sposób przepuszczania i kierowania powietrza na pożywkę: jedne działają na zasadzie wirowania zassanego powietrza, inne na zasadzie zasysania powietrza przez szczeliny w głowicy próbnika [15].

Pobieranie prób powietrza metodą filtracji polega na przepuszczeniu określonej objętości powietrza przez

jałowy filtr membranowy lub inny czynnik (piasek, węgiel, bulion itp.). Najczęściej stosuje się sterylne filtry żelatynowe, które osadza się w głowicy próbnika. Po pobraniu prób powietrza filtr przenosi się na płytkę z pożywką i inkubuje. W przypadku dużego zanieczyszczenia powietrza filtr można rozpuścić (np. w wodzie lub roztworze soli fizjologicznej) i kilka razy rozcieńczyć przed wysiewem na podłoża stałe.

Z punktu widzenia higieny pracy ważne jest określenie liczby mikroorganizmów stanowiących frakcję respirabilną, które mogą wnikać do oskrzeli i płuc powodując zagrożenie zdrowia u pracowników. Przykładem aparatu pozwalającego na taki rozdział bioaerozolu jest 6-stopniowy impaktor Andersena (6STG Sampler) [1,10].

Do izolacji aktynobakterii z powietrza najczęściej stosuje się podłoża bogate w składniki odżywcze, np. agar z hydrolizatem kazeinowo-sojowym (TSA) i podłożę tioglikolanowe. Dodatek nystatyny do wymienionych podłoży pozwala zahamować wzrost grzybów i umożliwia izolację promieniowców, wymagających inkubacji przez 3-5 dni w temperaturze 37 i 44°C.

Izolacja aktynobakterii z powierzchni i z kompostu

Najczęściej stosowanym sposobem izolacji aktynobakterii z powierzchni jest metoda wymazów. Przeznaczona jest do pobierania prób z powierzchni o różnych kształtach, sprawdza się także w warunkach wysokiej kontaminacji, ponieważ umożliwia wykonanie kolejnych rozcieńczeń przed dalszą hodowlą na podłożach stałych.

Metoda odciskowa (płytki kontaktowe, testy łopatkowe) sprawdza się w przypadku powierzchni płaskich, gładkich, o niewielkich wymiarach i niskim lub średnim stopniu zanieczyszczenia.

Aktynobakterie z kompostu izoluje się metodą rozcieńczeń: materiał zawieszony w podłożu hodowlanym podlega wielokrotnemu rozcieńczeniu, po czym jest wysiewany na odpowiednie podłoża stałe.

Metody identyfikacji aktynobakterii środowiskowych

Wstępna identyfikacja morfologiczna

Czyste kultury drobnoustrojów otrzymane w wyniku izolacji z materiału wyjściowego należy przesiać na podłoża stałe i poddać inkubacji. Otrzymane pojedyncze kolonie różnicuje się klasycznymi metodami makro- i mikroskopowymi. W obrazie makroskopowym zwrócić należy uwagę na charakterystyczne cechy aktynobakterii: występowanie pseudogrzybni powietrznej i pseudospor. Istotna jest ocena morfologiczna preparatu mikroskopowego, ponieważ obecność polimorficznych, rozgałęzionych komórek może świadczyć o przynależności szczepu do aktynobakterii. Należy jednak pamiętać, że do mikroorganizmów tej klasy należą także maczugowce i prątki, więc również takie formy morfologiczne

powinny być brane pod uwagę we wstępnej identyfikacji izolatów środowiskowych [39].

Morfologia aktynobakterii

Do hodowli aktynobakterii zaleca się podłoże z wyciągiem mózgowo-sercowym (BHI) oraz podłoże z wyciągiem drożdżowym i glukozą (podłoże 79). Określenie cech morfologicznych wzrostu promieniowców wykonuje się na podłożach stałych: agarze odżywczym (NA), ekstrakcie słodowo-drożdżowym z dodatkiem glukozy (GYM), agarze owsianym (ISP 3), agarze skrobiowym z dodatkiem soli nieorganicznych (ISP 4), agarze glukozowo-ziemniaczanym (PDA), podłożu tryptozowo-drożdżowym (TSA), ekstraktach tryptozowo-drożdżowym (TYE), drożdżowo-słodowym (MYE), drożdżowym z dodatkiem peptonu i glukozy (YPG) [51].

W morfologii kolonii należy określić cechy kolonii: barwę, strukturę (gładkie, woskowate, śliskie, pofałdowane, pokryte meszkiem), strukturę brzegów (regularne, nieregularne), ich wielkość oraz formę (płaskie, wypukłe) i barwę od spodniej strony płytki. Aktynobakterie tworzą charakterystyczne kolonie: gładkie i błyszczące, albo skórzaste, garbowane, membranowe, pokryte pseudogrzebnią powietrzną z zarodnikami (tab. 1, ryc. 1, 2, 3, 4).



Ryc. 1. Kolonie *Streptomyces albus*; podłoże 79, wzrost 7 dni



Ryc. 2. Kolonie *Streptomyces flavisclerotis*; podłoże 79, wzrost 7 dni



Ryc. 3. Kolonie *Streptomyces griseus*; podłoże 79, wzrost 7 dni



Ryc. 4. Kolonie *Streptomyces hirosimensis*; podłoże 79, wzrost 7 dni

Niektóre rodzaje aktynobakterii wytwarzają pseudospory zdolne do ruchu za pomocą wici [37]. Pseudogrzebnia powietrzna tworzy łańcuszki spor [4].

Podstawowym kryterium morfologicznym jest obraz mikroskopowy po barwieniu metodą Grama. Promieniowce należą do bakterii Gram-dodatnich, ale ze względu na budowę ściany komórkowej niektóre barwią się Gram-zmiennie (tab. 2). Komórki promieniowców przypominają zwykle kształtem proste lub lekko zakrzywione formy o długości 10-15 μm oraz średnicy 1-1,5 μm . W obrazie mikroskopowym należy zwracać uwagę na obecność wydłużonych form - prostych lub rozgałęzionych oraz pseudospor o różnej wielkości, różnym kształcie i sposobie tworzenia [6]. Warto również wykonać barwienie bakterii metodą Ziehla-Neelsena, w której wybarwiają się zbudowane z grubej warstwy lipidowej prątki i inne kwasooporne aktynobakterie, zawierające kwasy mikołowe w ścianie komórkowej.

W artykule przedstawiono morfologiczne cechy wybranych aktynobakterii; są to mikroorganizmy typowo tlenowe, często izolowane ze środowiska naturalnego, wśród których klasyfikuje się wiele gatunków patogennych dla człowieka (tab. 1).

Oznaczanie cech fizjologicznych i biochemicznych

Do istotnych cech fizjologicznych i biochemicznych, pomocnych w identyfikacji aktynobakterii należy pro-

Tabela 1. Charakterystyka fenotypowa wybranych rodzajów aktynobakterii i bakterii termofilnych *Thermoactinomyces* - morfologia [2, 3, 13, 21, 30, 33-35, 41, 45, 47-50, 52]

	<i>Nocardia</i>	<i>Gordonia</i>	<i>Tsukamurella</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Saccharopolyspora</i>	<i>Nocardiopsis</i>	<i>Thermoactinomyces</i>
Komórki nitkowate, rozgałęzione	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Komórki pleomorficzne*	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Kolonie gładkie/szorstkie	-	+	+	-	+	-	+	-	-
Kolonie ziarniste/nieregularne	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Pseudogrzebnia powietrzna	+/-	-	-	-	-	+	+/-	+	+
Pseudosporę	+/-	-	-	-	-	+	+/-	+	+

* komórki od nitkowatych do kulistych, w nieregularnych skupiskach; (+) – występowanie cechy; (-) - brak występowania cechy; (+/-) – cecha zmienna

dukacja pigmentów, określenie optymalnej temperatury i pH wzrostu oraz rozkład azotanów, skrobi, żelatyny, kazeiny (przydatne zwłaszcza w diagnostyce rodzaju *Micromonospora*). W przypadku rodzajów *Nocardia* i *Rhodococcus* zwrócić należy uwagę na zdolność degradacji fenolu, naftalenu, benzyny, ropy naftowej, krezolu lub cytrynianów oraz wytwarzanie indolu, tworzenie katalazy i kwasów z glukozy, laktozy, sacharozy i glicerolu [17, 27, 33, 45, 48].

Przynależność do rodzaju *Streptomyces* określa się po uwzględnieniu rozkładu eskuliny i tyrozyny; hydroliza tłuszczów jest cechą diagnostyczną rodzaju *Thermoactinomyces* [18].

Dostępne są testy fizjologiczno-biochemiczne, różnicujące rodzajowe i/lub gatunkowe właściwości fenotypowe niektórych taksonów, np. test API Coryne (bioMérieux). W tabeli 2 zestawiono wybrane cechy fizjologiczne i biochemiczne przydatne w diagnostyce aktynobakterii.

Identyfikacja aktynobakterii - metody chemiotaksonomiczne

Analiza chromatograficzna ekstraktów surowych lipidów bakteryjnych

Aktynobakterie namnaża się na bogatych podłożach płynnych w hodowli podpowierzchniowej w celu uzyskania biomasy bakteryjnej, która posłuży do przeprowadzenia szczegółowych badań markerów chemicznych ściany i błony komórkowej. Przyjmuje się, że 2-10 g mokrej biomasy jest wystarczająca, aby uzyskać dokładną informację o właściwościach chemiotaksonomicznych badanego szczepu.

Zasadniczym badaniem jest analiza surowych lipidów, otrzymanych przez dwukrotne wytrząsanie ok. 500 mg mokrej biomasy w mieszaninie chloroform-metanol (2:1, v/v) w temperaturze pokojowej. Ekstrakt przesącza się, aby odrzucić debris komórkowe, po czym odparowuje, waży, a następnie rozpuszcza w chloroformie (50 mg/ml).

Profil lipidowy bakterii uzyskuje się przez naniesienie ekstraktu (ok. 20 µl) na płytki do chromatografii cienkowarstwowej (TLC) z żelom krzemionkowym, rozwijane standardowo w układzie rozpuszczalników chloroform-metanol-woda (65:25:4, v/v/v).

Do wywołania rozdzielonych w TLC substancji stosuje się odczynniki [32]:

- wanilinowy: 0,5% roztwór waniliny w 3% kwasie siarkowym w etanolu, wywołujący pełny profil lipidów polarnych i niepolarnych w badanych ekstraktach;
- ninhydrinowy: 0,25% roztwór ninhydriny w acetonie - związki lipidowe zawierające grupę aminową;
- molibdenowy Dittmera i Lestera - fosfolipidy;
- orcynolowy: 0,5% roztwór orcynolu w 3% kwasie siarkowym w etanolu - związki lipidowe zawierające cukry, glikolipidy.

Na tym etapie badania właściwości izolatu środowiskowego porównuje się ze znanymi, kolekcyjnymi szczepami aktynobakterii z rodzajów najczęściej występujących, np. *Saccharopolyspora*, *Nocardia*, *Nocardiopsis*, *Streptomyces*, *Rothia*, *Rhodococcus*. W przypadku fosfolipidów nanosi się standardy tych związków, które mają znaczenie chemiotaksonomiczne, tj. fosfatydyloetanolaninę (PE), fosfatydylocholinę (PC), fosfatydyloglicerol

Tabela 2. Charakterystyka fenotypowa wybranych rodzajów aktynobakterii i bakterii *Thermoactinomyces* – cechy fizjologiczne i biochemiczne [2, 3, 13, 21, 30, 33-35, 41, 45, 47-50, 52]

	<i>Nocardia</i>	<i>Gordonia</i>	<i>Tsukamurella</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Saccharopolyspora</i>	<i>Nocardiopsis</i>	<i>Thermoactinomyces</i>
Barwienie metodą Grama	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+
Kwasooporność	+/-	+/-	+	+/-	-/+	-	-	-	-
Katalaza	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hydroliza eskuliny	+	+	+	-	-	+	+	+/-	+/-
Hydroliza kazeiny	-	-	-	-	-	+	+	+/-	+
Hydroliza skrobi	-	+/-	-	-	+/-	+	+	+	-

+ występowanie cechy; - brak występowania cechy; +/- cecha zmienna

(PG), difosfatydyloglicerol (DPG), fosfatydyloinozytol (PI). Izolaty aktynobakterii zaklasyfikować można do jednego z pięciu typów fosfolipidowych: P I – niezawierające fosfolipidów, a zawierających azot; P II – zawierające PE; P III – zawierające PC; P IV – zawierające GlcNU (fosfolipid o nieznannej strukturze zawierający glukozaminę) i PE; P V – zawierające GlcNU i PG [25,28].

Analiza estrów metylowych kwasów tłuszczowych

Identyfikacja taksonomiczna bakterii z zastosowaniem analizy profilu estrów metylowych kwasów tłuszczowych (fatty acid methyl esters, FAMES) jest szeroko stosowana dla przedstawicieli wszystkich poziomów systematycznych. Niektóre kwasy tłuszczowe, jako unikalne w przyrodzie markery biochemiczne, służą do bezpośredniego jakościowego i ilościowego oznaczania drobnoustrojów danej grupy wprost w pobranej próbce środowiskowej lub w materiale klinicznym metodami analitycznymi, bez konieczności izolacji szczepu i namnażania na podłożach mikrobiologicznych. Przykładem jest analiza 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych, składników lipopolisacharydu budującego osłony komórkowe bakterii Gram-ujemnych; związki te oznaczano w bioaerolu, m.in. w badaniach środowiska pracy, za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GCMS) [44].

Oznaczanie profilu FAMES przebiega w dwóch etapach: bakterie (2 mg suchej lub około 50 mg mokrej biomasy bakteryjnej) poddaje się metanolizie w 4M metanolem w roztworze HCl, w temp. 80°C przez 1 godz., następnie poddaje ekstrakcji do mieszaniny heksan-woda (1:1), po czym fazę organiczną zawierającą uwolnione estry metylowe kwasów tłuszczowych suszy się pod strumieniem azotu. W drugim etapie uzyskaną próbkę analizuje się za pomocą GCMS. Identyfikacja poszczególnych kwasów tłuszczowych na ogół nie następuje trudności, ponieważ dostępne są biblioteki ich widm masowych,

a w przypadkach wątpliwych widmo i czas retencji danego związku porównuje się ze standardami chemicznymi. W wyniku analizy bakteryjnych FAMES otrzymuje się zestawienie składu procentowego kwasów tłuszczowych.

W identyfikacji aktynobakterii ważną rolę pełnią kwasy mikołowe – długołańcuchowe kwasy tłuszczowe, swoiste składniki budujące ścianę komórkową promieniowców, m.in. *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Tsukamurella*, *Corynebacterium*. Kwasy mikołowe są α -rozgałęzione, podstawione grupą hydroksylową w pozycji β ; zawierają 30-90 atomów węgla w łańcuchu. Najkrótsze łańcuchy występują w komórkach *Corynebacterium*, a najdłuższe u *Mycobacterium*, gdzie odpowiadają za kwasooporność komórek. Większość z nich jest estrowo związana z arabinogalaktanem, polisacharydem wchodzącym w skład osłon komórkowych, inne występują w stanie wolnym. Istnieje wiele metod oznaczania kwasów mikołowych. Występowanie w komórkach mikroorganizmów i długość łańcuchów kwasów mikołowych można oznaczać w zależności od dostępnej aparatury (po przeprowadzeniu w estry metylowe) za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC), jako estry *p*-bromofenacylowe w HPLC [7] lub za pomocą spektrometrii MALDI-TOF [26].

Oznaczanie chinonów izoprenoidowych

Chinony izoprenoidowe występują w błonie cytoplazmatycznej większości bakterii. Zalicza się do nich menachinony (oznaczane początkowo jako witamina K2) i ubichinony (koenzym Q). Taksonomicznie ważna jest liczba jednostek izoprenowych w łańcuchu poli-prenylovym; u aktynobakterii najczęściej występują menachinony zawierające 8-9 jednostek izoprenowych. Zakres swoistości taksonomicznej chinonów bywa szeroki i cecha ta powinna być rozpatrywana wraz z innymi właściwościami chemiotaksonomicznymi.

Chinony ekstrahuje się z suchej masy komórkowej mieszaniną chloroform-metanol i oczyszcza za pomocą TLC. Analiza tych związków wymaga użycia HPLC, kolumn z odwróconym układem faz i spektrometrii mas [8].

Analiza składników ściany komórkowej aktynobakterii

Analiza składu aminokwasowego i cukrowego peptydoglikanu, głównego składnika ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich, do jakich należą aktynobakterie, pozwala na określenie typu ściany komórkowej, charakterystycznej dla każdego rodzaju.

Izomery kwasu diaminopimelinowego (DAP), jednego z istotnych aminokwasów budujących mostki peptydowe w peptydoglikanie, wykrywane są w hydrolizatach komórkowych za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Izomery LL- i mezo-DAP charakteryzują się niższym niż inne aminokwasy współczynnikiem retencji w TLC oraz oliwkowo-zieloną barwą po wywołaniu odczynnikiem ninhydrynowym (ryc. 10). Wykrycie i określenie izomerii kwasu diaminopimelinowego w szczepie środowiskowym znacznie ułatwia jego identyfikację. W tabeli 3 zestawiono markery chemiotaksonomiczne wybranych rodzajów aktynobakterii.

Genotypowanie aktynobakterii

Analiza 16S rRNA i hybrydyzacja DNA-DNA

Identyfikacja aktynobakterii za pomocą analizy cech genetycznych obejmuje określenie podobieństwa

sekwencji 16S rDNA/rRNA, pomiędzy szczepami o różnym pokrewieństwie oraz hybrydyzację DNA-DNA, wykazującą stopień podobieństwa (w procentach) między pojedynczymi nićmi DNA szczepów reprezentujących pokrewne gatunki [46].

W celu uzyskania informacji o występowaniu konkretnego gatunku aktynobakterii przeprowadza się badanie z wykorzystaniem swoistych pramerów, które po amplifikacji za pomocą PCR porównuje się z posiadanymi wzorcami szczepów kolekcyjnych [38].

Identyfikacja szczepów środowiskowych – przykłady

Material biologiczny

Szczepy bakteryjne KM1, KM2, KM3, KM4, KM5 oraz KM31 były izolowane z miejskich kompostowni przyzmoowych, wytwarzających kompost z organicznej frakcji odpadów komunalnych oraz odpadów zielonych pochodzących z targowisk miejskich i giełd warzywno-owocowych. Izolat KM5 pozyskano z powietrza z bioaerozolu w hali załadunkowej, w czasie pracy urządzenia ładującego kompost. Szczepy KM1, KM2, KM3, KM4 i KM31 pochodziły z prób kompostu na różnych etapach kompostowania - odpowiednio był to kompost 7-, 6-, 4-, 7- i 12-tygodniowy.

Szczep BI10 wyizolowano z powierzchni drewnianej półki znajdującej się w magazynie bibliotecznym - pomieszczeniu bez wentylacji, gdzie zniszczone książki

Tabela 3. Markery chemiotaksonomiczne wybranych rodzajów aktynobakterii i bakterii termofilnych *Thermoactinomyces* [2,3,13,21,30,33-35,41,45,47-50,52]

Marker chemiotaksonomiczny	<i>Nocardia</i>	<i>Gordonia</i>	<i>Tsukamurella</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Saccharopolyspora</i>	<i>Nocardopsis</i>	<i>Thermoactinomyces</i>
Fosfolipidy									
Fosfatydylocholina	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Fosfatydyloglicerol	-	+	-	-	+	-	+	-	-
Fosfatydyloetanolamina	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Typ fosfolipidowy	P II	P II	P II	P II	P I	P II	P III	P III	P II
Glikolipidy									
główne	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Kwas diaminopimelinowy (DAP)									
Mezo-DAP	+	+	+	+	+	-	+	+	+
LL-DAP	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Kwasy tłuszczowe									
Mikolowe	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Prostołańcuchowe nasycone	+	+	+	+	+	-	+	-	+
Rozgałęzione (izo, anteizo)	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Kwas tuberkulostearynowy (MeC18:0)	+	+	+	+	-/+	-	-	+	-

+ występowanie cechy; - brak występowania cechy; +/- cecha zmienna

leżały na podłodze, na ścianach widoczne były ślady zalania i łuszcząca się farba.

Izolacja szczepów środowiskowych

Izolaty KM1, KM2, KM3, KM4 oraz KM31 z kompostowni miejskiej uzyskano z prób kompostu (10 g) przeniesionego do sterylnej soli fizjologicznej (90 ml) i poddanego wytrząsaniu (15 min). Z tak przygotowanego materiału wykonano rozcieńczenia w soli fizjologicznej (10^{-2} i 10^{-3}), które wysiewano na stałe podłoże tryptozowo-sojowe (TSA) i inkubowano w temp. 28 i 55°C przez 4 dni.

Izolat KM 5 uzyskano z próby powietrza pobranej metodą zderzeniową, z użyciem aparatu MAS100 (Merck-Millipore, Niemcy). Do analizy pobrano 100 l powietrza, a drobnoustroje zatrzymane na powierzchni pożywki TSA inkubowano w temperaturze 28 i 55°C przez 4 dni.

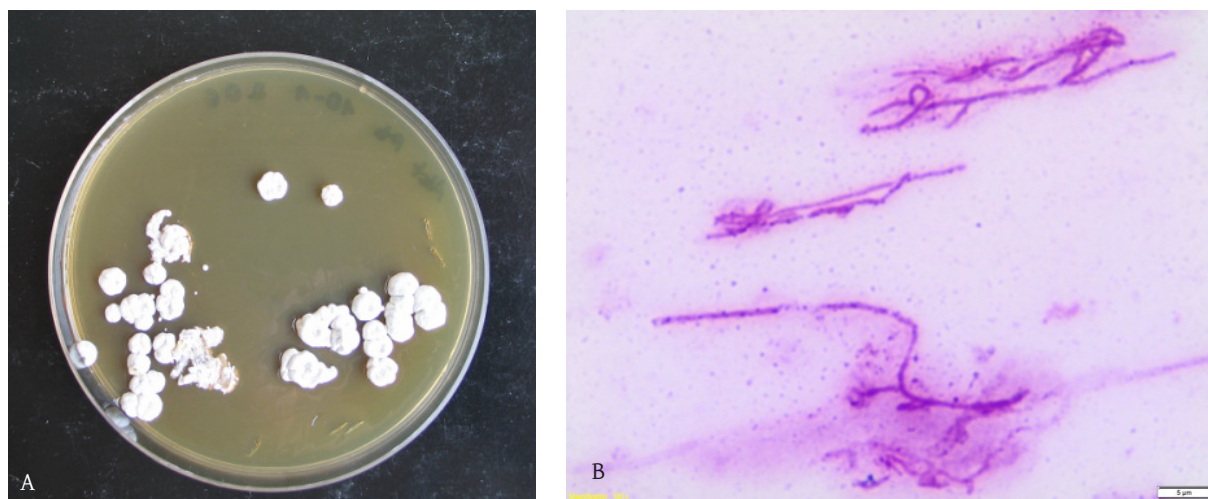
Szczep BI10 został wyizolowany w bibliotece z użyciem płytek odciskowych RODAC Envirocheck z podłożem TSA i neutralizatorami (Merck-Millipore, Niemcy) (inkubacja w temp. 28 i 55°C przez 4 dni).

Morfologia kolonii

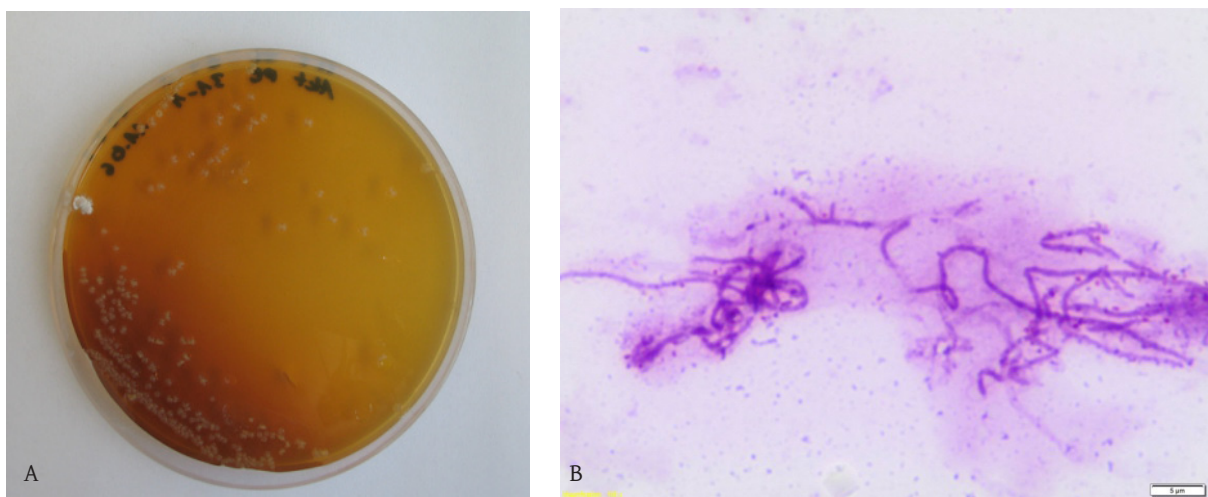
Na rycinach 5 i 6 przedstawiono morfologię komórek i kolonii szczepów środowiskowych na podłożach 79 i BHI.

W obrazie mikroskopowym wszystkie badane szczepy cechowały się wytwarzaniem pseudogrybni powietrznej oraz nitkowatymi komórkami Gram-dodatnimi z rozgałęzieniami.

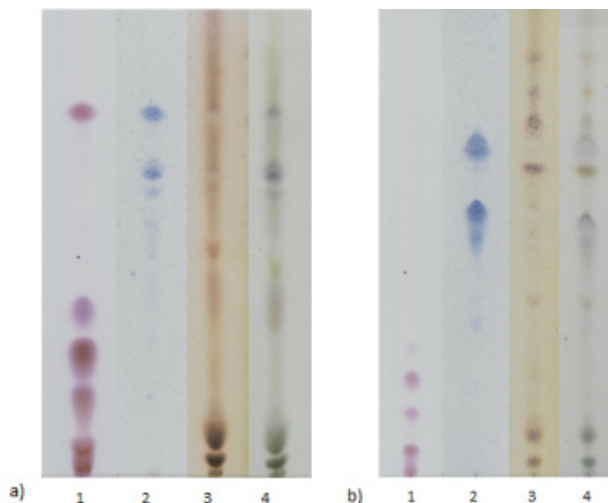
Izolat KM31 charakteryzował się wytwarzaniem brązowego pigmentu dyfundującego do podłoża.



Ryc. 5. Szczep BI10, wyizolowany z powierzchni półki bibliotecznej; a - kolonie na podłożu 79, inkubacja w 37°C, 15 dni; b - obraz mikroskopowy z hodowli płynnej w podłożu 79, inkubacja 37°C, 48 h, barwienie metodą Grama, powiększenie 1500×



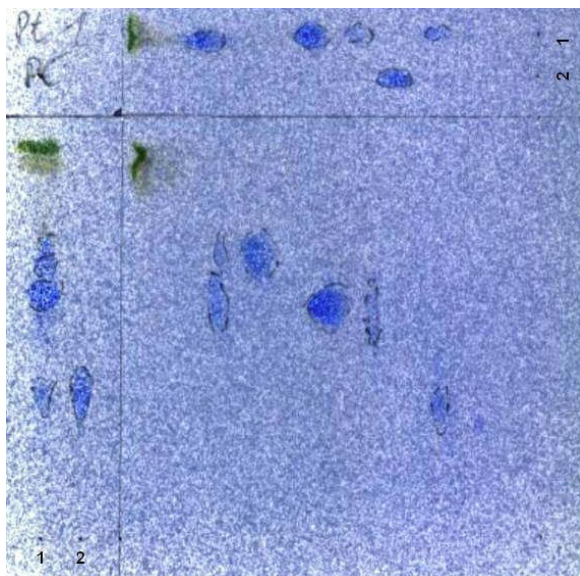
Ryc. 6. Szczep KM31, wyizolowany z prób 12-tygodniowego kompostu; a - kolonie na podłożu BHI, inkubacja 37°C, 14 dni; b - obraz mikroskopowy z hodowli płynnej w podłożu 79, inkubacja 37°C, 48 h, barwienie metodą Grama, powiększenie 1500×



Ryc. 7. Chromatogram TLC ekstraktu lipidowego pochodzącego ze szczepów środowiskowych: a - KM1; b - KM3; układ rozwijający: chloroform-metanol-woda (65:25:4, v/v/v); Wywoływacz: 1 - 0,5% ninhydrina, temp. pokojowa; 2 - odczynnik molibdenowy, temp. pokojowa; 3 - 0,5% wanilina, temp. 120°C; 4 - 0,5% orcyńol; temp. 120°C

Analiza chemiotaksonomiczna

Analizę chromatograficzną ekstraktów lipidowych siedmiu izolatów promieniowców przedstawiono na ryc. 7 - 9. Surowe ekstrakty lipidowe (50 mg/ml) nanoszono na płytki TLC Silica gel 60 (Merck-Millipore) i rozwijano w układzie chloroform-metanol-woda (65:25:4, v/v). Rozdziały chromatograficzne wywoływano odczynnikami pozwalającymi na detekcję lipidów zawierających grupę $-NH_2$, fosfolipidów, lipidów zawierających cukier i obrazujących pełny profil związków lipidowych (ryc. 7).



Ryc. 8. Cienkowarstwowa chromatografia dwukierunkowa ekstraktu lipidowego szczepu KM 1: a - wywołany odczynnikiem Dittmera–Lestera obrazującym związki zawierające fosfor; b - wywołany odczynnikiem ninhydrinowym obrazującym związki zawierające grupy aminowe. 1 – ekstrakt lipidowy szczepu KM1; 2 - fosfatydylocholina; 3 - fosfatydyloetaloamina [31]

Analiza chromatograficzna ekstraktu lipidowego pozyskanego ze szczepów KM1 (ryc. 7, 8) oraz KM2, KM4, KM5, BI10 i KM31 wykazała obecność fosfatydyletanolaminy, co świadczy o przynależności analizowanych szczepów do typu fosfolipidowego PII. W przypadku ekstraktu uzyskanego z biomasy szczepu KM3 nie stwierdzono fosfatydyletanolaminy, zatem należy on do typu fosfolipidowego PIII (ryc. 9).

Kwasy tłuszczowe proste i rozgałęzione (*izo* i *anteizo*) oraz kwas tuberkulostearynowy (10-metylostearynowy) wykryte w identyfikowanych szczepach zestawiono w tab. 4.

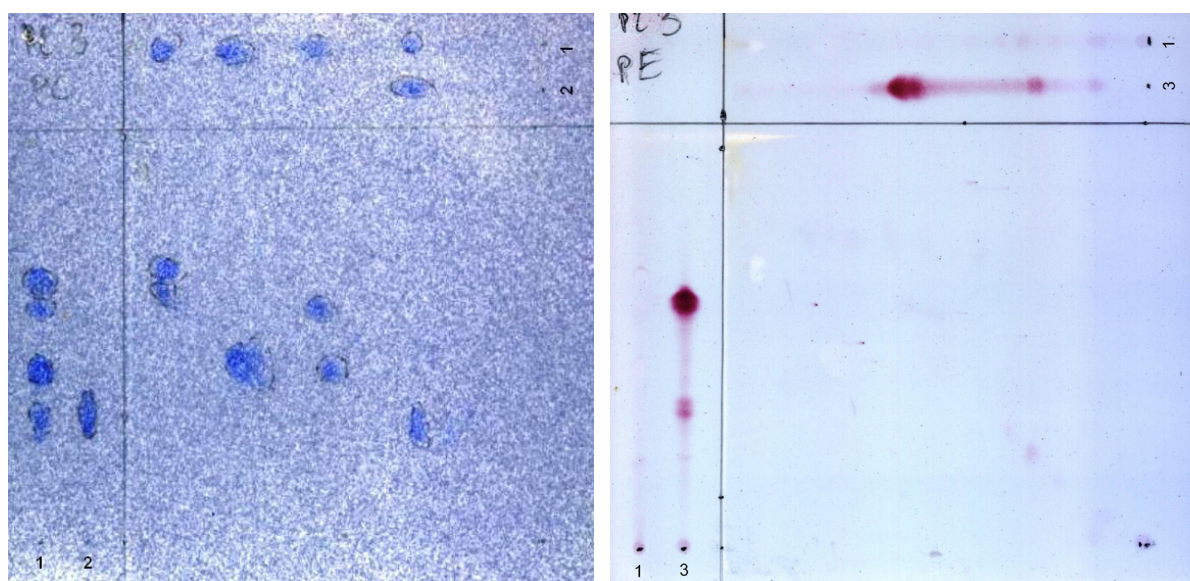
Ocena ilościowa kwasów tłuszczowych w biomase aktywnobakterii wykazała w przypadku wszystkich rozpatrywanych szczepów (z wyjątkiem izolatu KM3) dominację kwasów rozgałęzionych *anteizo*, szczególnie C15 i C17. Cechą charakterystyczną w przypadku szczepu KM3 okazało się występowanie w komórkach kwasu tuberkulostearynowego, który nie występował w pozostałych szczepach (tab. 4).

W izolatach aktywnobakterii oznaczano obecność kwasów mikołowych, w odniesieniu do szczepu referencyjnego *Nocardia* sp., zawierającego te związki. Żaden ze szczepów nie zawierał kwasów mikołowych.

Przeprowadzono analizę izomerów kwasu diaminopimelinowego (DAP). Izomery DAP charakteryzują się mniejszą ruchliwością chromatograficzną niż pozostałe aminokwasy i mają charakterystyczną oliwkowo-zieloną barwę. Szczepy KM1, KM2, KM5, BI10 oraz KM31 zawierały w ścianie komórkowej kwas LL-DAP, natomiast KM3 wykazał obecność mezo-DAP (ryc. 10).

Tabela 4. Skład procentowy kwasów tłuszczowych w biomacie wyizolowanych środowiskowych szczepów aktynobakterii

Kwas tłuszczowy	KM1	KM 2	KM 3	KM 4	KM 5	BI 10	KM 31
<i>izoC15</i>	0,01	0,02	0,01	0,06	0,01	0,01	0,03
<i>aizoC15</i>	43,01	35,71	13,50	36,21	44,91	56,15	41,14
<i>nC15</i>	1,57	2,34	1,09	1,41	0,01	4,70	0,78
<i>aizoC16</i>	22,01	16,57	20,36	33,95	17,42	9,64	20,14
<i>nC16</i>	2,07	13,03	2,62	1,69	4,55	6,93	7,00
<i>izoC17</i>	6,08	6,82	1,73	2,62	0,76	0,45	0,63
<i>aizoC17</i>	22,57	21,99	31,91	24,00	31,48	21,63	27,62
<i>nC17</i>	2,68	3,53	6,21	0,05	0,85	0,49	2,64
<i>nC18</i>	0,00	0,00	17,93	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>MeC18</i>	0,00	0,00	4,64	0,00	0,00	0,00	0,00



Ryc. 9. Cienkowarstwowa chromatografia dwukierunkowa ekstraktu lipidowego szczepu KM3: a - wywołany odczynnikiem Dittmera–Lestera obrazującym związki zawierające fosfor; b - wywołany odczynnikiem ninhydrynowym obrazującym związki zawierające grupy aminowe. 1 – ekstrakt lipidowy szczepu KM3; 2 - fosfatydylocholina; 3 – fosfatydyloetaloamina [31]

Na podstawie cech morfologicznych oraz charakterystyki chemiotaksonomicznej stwierdzono, że aktynobakterie badanych środowisk pracy należą do rodzajów *Streptomyces* (szczepy KM1, KM2, KM4, KM5, BI10, KM31) i *Nocardiosis* (KM3) (tab. 5).

PODSUMOWANIE

Ekspozycja pracowników na występujące w środowisku pracy drobnoustroje prowadzić może do schorzeń o różnym podłożu; opisywano infekcje o ostrym przebiegu [16], alergie wywołane przez zarodniki grzybów pleśniowych [35], podrażnienia skóry i oczu w wyniku działania lotnych związków organicznych wytwarzanych przez mikroorganizmy (MVOC) [19] oraz prawdopodobne zaburzenia funkcjonowania układu immunologicznego w wyniku kontaktu z mikotoksy-

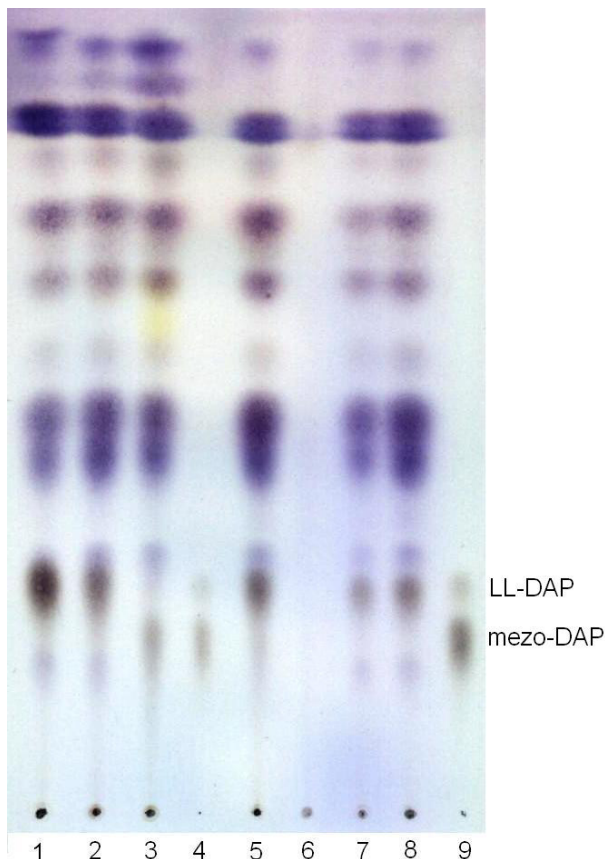
nami i β -glukanem, metabolitami grzybów [5]. Dlatego oznaczenie przynależności taksonomicznej mikroorganizmów izolowanych z tych środowisk jest zadaniem podejmowanym przez mikrobiologów i specjalistów medycyny pracy.

Specyfika promieniowców jako grupy bakterii dominujących w rolnictwie i kompostowniach przemysłowych dotyczy możliwości zakażenia przewlekłego lub (rzadziej) o ostrym przebiegu, jednak częstsze i ważniejsze są chroniczne stany chorobowe spowodowane stałym narażeniem na wysokie stężenia pseudospor i fragmentów bakterii wchodzących w skład bioaerozolu. Znane są związki aktynobakterii ze schorzeniami dróg oddechowych, np. *Saccharopolyspora rectivirgula* jest jednym z czynników powodujących alergiczne zapalenie pęcherzyków płucnych [12], *Nocardia* spp. i inne promie-

Tabela 5. Zestawienie cech diagnostycznych promieniowców izolowanych z badanych miejsc pracy

Cecha diagnostyczna	KM1/KM2/ KM4/ KM5/BI10/ KM31	KM3
Cechy morfologiczne		
Komórki nitkowate	+	+
Komórki pleomorficzne	-	-
Kolonie gładkie/szorstkie	-	+
Kolonie ziarniste/nierregularne	+	-
Pseudogryźnia powietrzna	+	+/-
Pseudospory	+	+/-
Cechy fenotypowe		
Barwienie metodą Grama	+	+
Kwasooporność	-	-
Katalaza	+	+
Hydroliza eskuliny	+	+
Hydroliza kazeiny	+	+
Hydroliza skrobi	+	+
Cechy chemiotaksonomiczne		
Fosfatydylocholina	-	+
Fosfatydyloglicerol	+	-
Fosfatydyloetanolamina	+	-
Typ fosfolipidowy	P II	P III
Glikolipidy główne	-	+
Mezo-DAP	-	+
LL-DAP	+	-
Kwasy tłuszczowe rozgałęzione (<i>izo, anteizo</i>)	+	+
Kwasy mkolowe	-	-
Kwas tuberkulostearynowy (MeC18:0)	-	+
Wynik identyfikacji	<i>Streptomyces</i> <i>sp.</i>	<i>Nocardioopsis</i> <i>sp.</i>

(+) – występowanie cechy; (-) – brak występowania cechy



Ryc. 10. Analiza izomerów kwasu diaminopimelinowego (DAP). 1 - KM1; 2 - KM2; 3 - KM3; 4 - standard LL- i mezo-DAP; 5 - KM4; 6 - KM5; 7 - BI10; 8 - KM31; 9 - standard LL- i mezo-DAP. Układ rozwijający: metanol-pirydyna-10M HCl-woda (80: 10: 2,5:17,5; v/v/v/v), wywoływacz: ninhydryna

niowce tlenowe wywołują nokardiozę płucną oraz aktywnicetozę zlokalizowane w płucach [17,29]. Izolowano także *Nocardioopsis dassonvillei* z ropnia w przebiegu ciężkiego zapalenia płuc [31].

Identyfikacja aktynobakterii środowisk zawodowych powinna klasyfikować drobnoustrój co najmniej na poziomie rodzaju. Metody hodowlane i chemiotaksonomiczne, zwłaszcza analizy chromatograficzne ekstraktów surowych lipidów bakteryjnych, estrów metylowych kwasów tłuszczowych i składników ściany komórkowej aktynobakterii umożliwiają skuteczne przeprowadzenie takiej procedury. Szczegółowa klasyfikacja gatunkowa jest w niektórych przypadkach celowa i polega na przeprowadzeniu identyfikacji za pomocą 16S rRNA i hybrydyzacji DNA-DNA szczepów podejrzewanych o wywołanie poważnych negatywnych skutków zdrowotnych u eksponowanych osób.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Andersen A.A.: New sampler for the collection, sizing, and enumeration of viable airborne particles. *J. Bacteriol.*, 1958; 76: 471-484
- [2] Arenskötter M., Bröker D., Steinbüchel A.: Biology of the metabolically diverse genus *Gordonia*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004; 70: 3195-3204
- [3] Beau F., Bollet C., Coton T., Garnotel E., Drancourt M.: Molecular identification of a *Nocardiosis dassonvillei* blood isolate. *J. Clin. Microbiol.*, 1999; 37: 3366-3368
- [4] Bibb M.J., Molle V., Buttner M.J.: ζ B1dN, an extracytoplasmic function RNA polymerase sigma factor required for aerial mycelium format in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.*, 2000; 182: 4606-4616
- [5] Bönisch U., Böhme A., Kohajda T., Mögel I., Schütze N., von Bergen M., Simon J.C., Lehmann I., Polte T.: Volatile organic compounds enhance allergic airway inflammation in an experimental mouse model. *PLoS One*, 2012; 7: e39817
- [6] Breed R.S., Murray E.G., Smith N.R.: *Bergey's manual of determinative bacteriology*, seventh edition. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, Md. 1957
- [7] Butler W.R., Guthertz L.S.: Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of *Mycobacterium* species. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2001; 14: 704-726
- [8] Collins M.D.: Isoprenoid quinones. W: *Chemical methods in prokaryotic systematics*, red.: M. Goodfellow, A.O'Donnell. John Wiley & Sons, Chichester. New York 1994, 265-310
- [9] Dutkiewicz J.: Dyrektywa 2000/54 WE a strategia wykonywania pomiarów czynników biologicznych zakładach pracy. *Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy*, 2004; 3: 9-16
- [10] Dutkiewicz J., Śpiewak R., Jabłoński L., Szymańska J.: *Biologiczne Czynniki Zagrożenia Zawodowego. Klasyfikacja, Narażone Grupy Zawodowe, Pomiar, Profilaktyka*. Lublin, Ad punctum, 2007
- [11] Dyrektywa 2000/54/WE Parlamentu Europejskiego oraz Rady Unii Europejskiej z dnia 18 września 2000 r. w sprawie ochrony pracowników przed ryzykiem związanym z narażeniem na działanie czynników biologicznych w miejscu pracy (siódma dyrektywa szczegółowa w rozumieniu art. 16 ust. 1 dyrektywy 89/391/EWG) (2002) Official Journal of the European Communities, L 262/21, Bruksela
- [12] Ferri F., Dottori M., Bedogni L., Perini S., Ligabue M.: Exposure to *Saccharopolyspora rectivirgula* among cattle breeders in the province of Reggio Emilia and the risk of extrinsic allergic alveolitis (farmer's lung). *Med. Lav.*, 2003; 94: 207-215
- [13] Goodfellow M., Lacey J., Athalye M., Embley T.M., Bowen T.: *Saccharopolyspora gregoriae* and *Saccharopolyspora hordei*: two new actinomycete species from fodder. *J. Gen. Microbiol.*, 1989; 135: 2125-2139
- [14] Górny R.L.: *Biologiczne czynniki szkodliwe: normy, zalecenia i propozycje wartości dopuszczalnych*, *Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy* 2004; 3: 17-39
- [15] Gutarowska B.: *Metody oceny zanieczyszczenia mikrobiologicznego powietrza - zalety i wady*. LAB, 2002; 2: 6-10
- [16] Haagsma J.A., Tariq L., Heederik D.J., Havelaar A.H.: Infectious disease risks associated with occupational exposure: a systematic review of the literature. *Occup. Environ. Med.*, 2012; 69: 140-146
- [17] Hidri N., Farina C., Mordarska H., Szponar B., Paściak M., Grzegorzewicz A., Gamian A., Boiron P.: *Nocardia*, *nocardioza* i *nokardiomikoza*. *Mikrobiologia Medycyna*, 2000; 24/25: 10-17
- [18] Iny D., Grossman S., Pinsky A.: Lipoygenase of the thermophilic bacteria *Thermoactinomyces vulgaris* - properties and study on the active site. *Int. J. Biochem.*, 1993; 25: 1325-1330
- [19] Jumpponen M., Rönkkömäki H., Pasanen P., Laitinen J.: Occupational exposure to gases, polycyclic aromatic hydrocarbons and volatile organic compounds in biomass-fired power plants. *Chemosphere*, 2013; 90: 1289-1293
- [20] Karbowska-Berent J.: Znaczenie promieniowców w biodeterioracji zabytków. *Ochrona przed Korozją*, 2012; 9s/A: 114-118
- [21] Kattar M.M., Cookson B.T., Carlson L.C., Stiglich S.K., Schwartz M.A., Nguyen T.T., Daza R., Wallis C.K., Yarfitz S.L., Coyle M.B.: *Tsakamurella strandjordae* sp. nov., a proposed new species causing sepsis. *J. Clin. Microbiol.*, 2001; 39: 1467-1476
- [22] Kumar V., Abbas A.K., Fausto N., Mitchell R.: *Robbins Basic Pathology*. Elsevier Ltd, Oxford 2007
- [23] Kumar V., Fausto N., Abbas A.: *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*, Seventh Edition. Elsevier 2004
- [24] Kutzner H.J., Kempf A.: Emissions of actinomycete spores in composting plants and other waste treatment industries. *Forum Städte-Hyg.*, 1994; 45: 326-330
- [25] Labeda D.P.: Actinomycete taxonomy: generic characterization. *J. Ind. Microbiol. Suppl.*, 1987; 2: 115-121
- [26] Laval F., Lanéelle M.A., Déon C., Monsarrat B., Daffé M.: Accurate molecular mass determination of mycolic acids by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 2001; 73: 4537-4544
- [27] Lechevalier H.A.: *Nocardioforms*. W: *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology*. red. Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G., Williams and Wilkins, Baltimore, 1986, 1458-1506
- [28] Lechevalier M.P., Stern A.E., Lechevalier H.A.: Phospholipids in the taxonomy of actinomycetes. W: *Actinomycetes*, red.: K.P., Schaal, G., Pulverer. *Zentbl. Bakteriol. Hyg.*, 1 Abt. Suppl. 11, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany 1981, 111-116
- [29] McNeil M.M., Brown J.M.: The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1994; 7: 357-417
- [30] Meyer J.: *Nocardiosis*, a new genus of the order Actinomycetales. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1976; 26: 487-493
- [31] Mordarska H., Zakrzewska-Czerwińska J., Paściak M., Szponar B., Rowiński S.: Rare, suppurative pulmonary infection caused by *Nocardiosis dassonvillei* recognized by glycolipid markers. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1998; 21: 47-55
- [32] Paściak M., Mordarska H., Szponar B., Gamian A.: Metody chemiotaksonomiczne w rozpoznawaniu zakażeń wywołanych przez aktywnobakterie. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 403-412
- [33] Prescott J.F.: *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1991; 4: 20-34
- [34] Qin S., Lia J., Zhao G.Z., Chen H.H., Xu L.H., Li W.J.: *Saccharopolyspora endophytica* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the root of *Maytenus austroyunnanensis*. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2008; 31: 352-357
- [35] Rainey F.A., Ward-Rainey N., Kroppenstedt R.M., Stackebrandt E.: The genus *Nocardiosis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: Proposal of *Nocardiosaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1996; 46: 1088-1092
- [36] Reponen T.A., Gazonko S.V., Grinshpun S.A., Willeke K., Cole E.C.: Characteristics of airborne Actinomycete spore. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998; 64: 3807-3812
- [37] Salomon E.P., Berg A., Berg J., Martin M., Villee D.: *Biologia*. Wyd. Multico, Warszawa 2000
- [38] Schäfer J., Jäckel U., Kämpfer P.: Development of a new PCR primer system for selective amplification of Actinobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2010; 311: 103-112
- [39] Shlegel H.G.: *Mikrobiologia ogólna*, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2008, 131-133
- [40] Skóra J., Zduniak K., Gutarowska B., Rembisz D.: Szkodliwe czynniki biologiczne na stanowiskach pracy w muzeach. *Med. Pr.*, 2012; 63: 153-165

- [41] Soriano F., Zapardiel J., Nieto E.: Antimicrobial susceptibilities of *Corynebacterium* species and other non-spore-forming gram-positive bacilli to 18 antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1995; 39: 208-214
- [42] Stackebrandt E.: Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1997; 47: 479-491
- [43] Strzelczyk A.B.: Observations on aesthetic and structural changes induced in Polish historic objects by microorganisms. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 2004; 53: 151-156
- [44] Szponar B., Larsson L.: Use of mass spectrometry for characterising microbial communities in bioaerosols. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 2001; 8: 111-117
- [45] Takai S., Ohbushi S., Koike K., Tsubaki S., Oishi H., Kamada M.: Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in isolates from soil and feces of horses from horse-breeding farms with and without endemic infections. *J. Clin. Microbiol.*, 1991; 29: 2887-2889
- [46] Tønnum T., Welty D.B., Jantzen E., Small P.L.: Differentiation of *Mycobacterium ulcerans*, *M. marinum*, and *M. haemophilum*: mapping of their relationships to *M. tuberculosis* by fatty acid profile analysis, DNA-DNA hybridization, and 16S rRNA gene sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 1998; 36: 918-925
- [47] Vimal V., Rajan B.M., Kannabiran K.: Antimicrobial activity of marine Actinomycete, *Nocardiopsis* sp. VITSVK 5 (FJ973467). *Asian J. Med. Sci.*, 2009; 1: 57-63
- [48] Weinstock D.M., Brown A.E.: *Rhodococcus equi*: an emerging pathogen, emerging infections. *Clin. Infect. Dis.*, 2002; 34: 1379-1385
- [49] Xu J., Rao J.R., Cherie Millar B., Stuart Elborn J., Evans J., Barr J.G., Moore J.E.: Improved molecular identification of *Thermoactinomyces* spp. associated with mushroom worker's lung by 16S rDNA sequence typing. *J. Med. Microbiol.*, 2002; 51: 1117-1127
- [50] Yallop C.A., Edwards C., Williams S.T.: Isolation and growth physiology of novel thermoactinomycetes. *J. Appl. Microbiol.*, 1997; 83: 685-692
- [51] Yassin A.F., Rainey F.A., Burghardt J., Gierth D., Ungerechts J., Lux I., Seifert P., Bal C., Schaal K.P.: Description of *Nocardiopsis synnemataformans* sp. nov., elevation of *Nocardiopsis alba* subsp. *prasina* to *Nocardiopsis prasina* comb. nov., and designation of *Nocardiopsis antarctica* and *Nocardiopsis alborubida* as later subjective synonyms of *Nocardiopsis dassonvillei*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1997; 47: 983-988
- [52] Zhou Z.H., Liu Z.H., Qian Y.D., Kim S.B., Goodfellow M.: *Saccharopolyspora spinosporotrichia* sp. nov., a novel actinomycete from soil, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1998; 48: 53-58

Autoroki deklaruja brak potencjalnych konfliktów interesów.