

Zastosowanie metod biologii molekularnej w ocenie narażenia zawodowego na szkodliwe czynniki biologiczne¹

Molecular biology methods in assessing occupational exposure to harmful biological agents

mgr ALEKSANDRA BAKAL
e-mail: albak@ciop.pl
prof. dr hab. n. med. RAFAŁ L. GÓRNY
e-mail: ragor@ciop.pl
dr n. tech. ANNA ŁAWNICZEK-WAŁCZYK
e-mail: anlaw@ciop.pl
dr n. med. MARCIN CYPROWSKI
e-mail: macyp@ciop.pl
Centralny Instytut Ochrony Pracy –
Państwowy Instytut Badawczy
00-701 Warszawa
ul. Czerniakowska 16

Słowa kluczowe: szkodliwe czynniki biologiczne, ryzyko zawodowe, biologia molekularna, PCR, diagnostyka molekularna, genotypowanie drobnoustrojów, molekularny odcisk palca.

Keywords: harmful biological agents, occupational risk, molecular biology, PCR, molecular diagnostic, microorganisms genotyping, molecular fingerprint.

Streszczenie

Obowiązkiem każdego pracodawcy jest zapewnienie pracownikom bezpiecznych warunków w miejscu zatrudnienia. W tym celu niezbędna jest identyfikacja i eliminacja możliwych do usunięcia zagrożeń oraz zapewnienie odpowiednich środków ochrony zarówno zbiorowej, jak i indywidualnej. Wśród szkodliwych czynników środowiska pracy, jednymi z bardziej istotnych są czynniki biologiczne. Stanowią one częstą przyczynę chorób

zawodowych w Polsce. Mogą oddziaływać na organizm człowieka, powodując dolegliwości o charakterze: alergicznym, drażniącym, zakaźnym, toksycznym oraz rakotwórczym. Do tych czynników biologicznych zaliczamy: mikroorganizmy (bakterie, grzyby), wirusy, pasożyty człowieka oraz aktywne biologicznie substancje chemiczne będące produktami metabolizmu drobnoustrojów (np. mykotoksyny).

¹ Publikacja przygotowana na podstawie wyników uzyskanych w ramach projektu pt. „Ocena potencjału biologicznego grzybów pleśniowych do produkcji mykotoksyn w warunkach zakładów gospodarki odpadami z zastosowaniem metod biologii molekularnej” realizowanego w ramach działalności statutowej Centralnego Instytutu Ochrony Pracy – Państwowego Instytutu Badawczego.

W laboratoryjnej identyfikacji zagrożeń biologicznych najczęściej są obecnie wykorzystywane metody: hodowlane, mikroskopowe i biochemiczne. Mimo niewątpliwych zalet i rozpowszechnienia, mają one jednak swoje ograniczenia. Większość z nich pozwala na identyfikację jedynie mikroorganizmów żywych, zdolnych do wzrostu w warunkach laboratoryjnych. Jak wskazują wyniki badań, takie drobnoustroje stanowią jedynie niewielki odsetek (w ekstremalnych przypadkach zaledwie 1%) społeczności występującej w danym środowisku.

W artykule zostały przedstawione metody biologii molekularnej (wykorzystujące analizę DNA) pozwalające na: identyfikację jakościową i ilościową drobnoustrojów, określenie ich cech biochemicznych oraz uzyskanie profilu gatunkowego mikroorganizmów występujących w danym środowisku, bez konieczności ich hodowli w warunkach laboratoryjnych. Zastosowanie tych metod pozwala na dokładniejszą identyfikację drobnoustrojów występujących w środowisku pracy, umożliwiając bardziej precyzyjną ocenę narażenia na szkodliwe czynniki biologiczne.

Summary

All employers are responsible for ensuring safe working conditions for employees in their workplace. It is necessary to accurately identify and eliminate all hazards that are possible to remove and to ensure proper collective and personal protective measures. Among occupational hazards, biological agents are one of the most important. They are considered as the most frequent cause of occupational diseases in Poland. They can affect human body and cause various adverse health outcomes such as allergies, irritations, infections, toxicoses or even a cancer. Among them we can distinguish harmful microorganisms (bacteria, viruses, fungi), human parasites and biologically active chemical compounds produced by microorganisms (e.g., fungal mycotoxins). Currently, the most frequent used laboratory procedures to identify biological hazards are culture-based, microscopic and biochemical methods. Despite their unquestionable

advantages and widespread presence, these techniques have also important limitations. They only enable identification of microorganisms which are viable and capable to grow in laboratory conditions. As the studies have shown, such microorganisms constitute (in extreme cases) merely 1% of their population present in the environment. This paper presents an overview of molecular biology methods (based on DNA analysis) which allow the qualitative and quantitative identification of microorganisms, determining their biochemical features and enabling to obtain their environmental species profile without the need for their culturing in laboratory conditions. Application of these methods provides more accurate identification of microorganisms present in occupational environment, allowing more precise analysis of potential health risks derived from exposure to harmful biological agents.

WPROWADZENIE

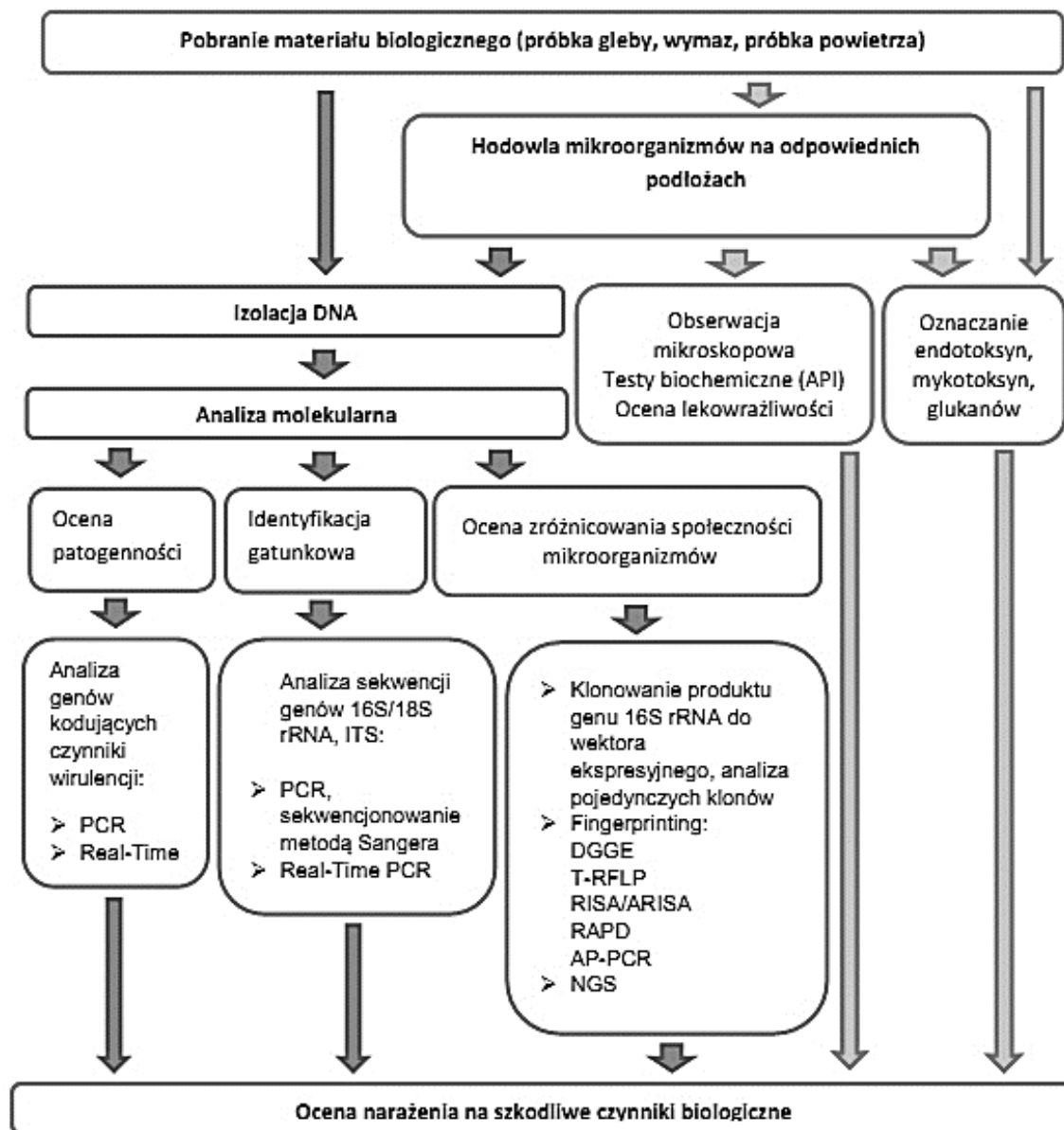
Według danych OECD (ang. Organisation for Economic Co-operation and Development) w 2015 r. każdy zatrudniony Polak pracował 1963 h, co pod względem liczby przepracowanych godzin w roku stawia Polskę na drugim miejscu wśród państw europejskich. Ze względu na dużą ilość czasu spędzonego w miejscu zatrudnienia, kluczowym wymaganiem jest zapewnienie pracownikowi bezpiecznych warunków pracy. W 2015 r. odnotowano w Polsce 2094 przypadki chorób zawodowych, czyli 19,6 przypadków na 100 000 zatrudnionych (Szeszenia-Dąbrowska, Wilczyńska 2016). Wśród tych chorób, pierwsze miejsce (31,1%) stanowią

przypadki wywołane przez czynniki pochodzenia biologicznego, tj. choroby zakaźne lub pasożytnicze, lub ich następstwa. Do szkodliwych czynników biologicznych występujących w środowisku pracy zalicza się: bakterie, grzyby, wirusy, pasożyty człowieka oraz biologicznie aktywne związki chemiczne, które są wydzielane lub uwalniane przez te organizmy do środowiska (m.in. endo- i egzotoksyny bakteryjne i mykotoksyny).

W praktyce, laboratoryjna identyfikacja szkodliwych czynników biologicznych obejmuje analizę ilościową i jakościową materiału pobranego na terenie badanego zakładu pracy. Najczęściej

stosowanymi metodami analizy tego typu zagrożeń są nadal metody: hodowlane, metody mikroskopowe (mikroskopia świetlna i fluorescencyjna) oraz testy biochemiczne (np. API[®],

bioMérieux, Francja), pozwalające na określenie przynależności gatunkowej mikroorganizmów, a także umożliwiające oszacowanie liczby drobnoustrojów obecnych w badanej próbce (rys. 1.).



Rys. 1. Schemat postępowania w ocenie narażenia na szkodliwe czynniki biologiczne

Metody, w których wykorzystuje się hodowle drobnoustrojów, mimo rozpowszechnienia oraz łatwości wykonania i stosunkowo niewielkiego kosztu, mają również pewne istotne ograniczenia. Szacuje się, że w skrajnych przypadkach liczba drobnoustrojów występujących w środowisku, niezdolnych do wzrostu na podłożach hodowlanych, może sięgać aż 99% (Amann i in. 1997).

Wynika to, między innymi, z trudności zapewnienia drobnoustrojom w warunkach laboratoryjnych wszystkich wymagań środowiskowych. Zauważono również, że mikroorganizmy występujące w środowisku, w odpowiedzi na różnorodne czynniki zewnętrzne, mogą tworzyć formy żywe, lecz niezdolne do wzrostu – VBNC (ang. *viable but not culturable*). Bakterie patogenne występujące

w formie VBNC, mimo braku zdolności do wzrostu na podłożach hodowlanych, mogą zachować zdolność kolonizacji gospodarza. Czynniki determinującymi przejście komórki bakteryjnej w taki stan mogą być, m.in.: przebywanie w środowisku wodnym (Roszak i in. 1984), obniżenie temperatury otoczenia (Oliver i in. 1991) czy też występowanie w formie aerozolu (Heidelberg i in. 1997). Z technicznego punktu widzenia, istotnymi czynnikami mającymi wpływ na żywotność mikroorganizmów są rodzaj przyrządu pomiarowego oraz sposób pobierania materiału biologicznego. Urządzenia stosowane do pobierania próbek powietrza (np. impaktory, impingery czy poborniki z filtrem) mogą uszkadzać komórki, obniżając tym samym ich zdolność do wzrostu (Li 2011).

Warto podkreślić, że do szkodliwych czynników biologicznych, oprócz patogennych bakterii aktywnie penetrujących tkanki gospodarza oraz toksycznych związków będących produktami ich metabolizmu, zaliczamy również, tzw. pyły organiczne (Dutkiewicz, Górny 2002). Stanowią one mieszaninę unoszących się w powietrzu cząstek roślin, zwierząt oraz mikroorganizmów, które ze względu na swoje rozmiary (często poniżej 1 μm) są w stanie wnikać do pęcherzyków płucnych, gdzie mogą wywołać reakcję immunologiczną o charakterze alergicznym (np. alergiczne zapalenie pęcherzyków płucnych) czy toksycznym (np. syndrom toksyczny wywołany pyłem organicznym

– ang. *organic dust toxic syndrome*, ODTs), (Seifert i in 2003). W rutynowej, laboratoryjnej analizie mikrobiologicznej są one bardzo często pomijane. Wszystkie te cechy sprawiają, iż istnieje potrzeba opracowania nowych metod, wspomagających ocenę narażenia na szkodliwe czynniki biologiczne, które pozwoliłyby je kompleksowo ilościowo i jakościowo scharakteryzować, eliminując również zależność od ograniczeń związanych z hodowlą drobnoustrojów.

Techniki biologii molekularnej, w tym metody oparte na analizie DNA i RNA, znalazły powszechne zastosowanie w wielu takich dziedzinach nauki, jak: diagnostyka medyczna, kryminalistyka czy paleobiologia. Stosowane są również w mikrobiologii środowiskowej i klinicznej, umożliwiając nie tylko identyfikację drobnoustrojów, lecz także analizę różnorodności gatunkowej oraz aktywności metabolicznej mikroorganizmów, bez konieczności ich hodowania w warunkach laboratoryjnych. Ze względu na dużą czułość, metody te znalazły też zastosowanie w analizie bioaerozoli (Hodspodsky i in. 2010). W artykule omówiono metody biologii molekularnej wykorzystywane w ocenie jakościowej i ilościowej szkodliwych czynników mikrobiologicznych w środowisku pracy. Opisano również techniki umożliwiające: identyfikację gatunkową drobnoustrojów, szacowanie ich liczby w badanym materiale, a także pozwalające na analizę różnic populacyjnych mikroorganizmów.

IDENTYFIKACJA GATUNKOWA DROBNOUSTROJÓW

Jednym z ważniejszych momentów w historii rozwoju biologii molekularnej było odkrycie przez Mullisa reakcji łańcuchowej polimerazy PCR (ang. *polymerase chain reaction*). To, uhonorowane w 1993 r. Nagrodą Nobla odkrycie, stało się fundamentem badań mających na celu poznanie sekwencji kodu genetycznego organizmów żywych oraz informacji w nim zawartych. Reakcja PCR oraz jej modyfikacje stanowią do dziś podstawę wielu metod, które znalazły zastosowanie w ocenie narażenia na szkodliwe czynniki biologiczne, w tym w analizie bioaerozoli.

Reakcja PCR to reakcja enzymatyczna polegająca na cyklicznym (30 ÷ 40 cykli) powielaniu wybranego fragmentu DNA, pozwalająca na otrzy-

manie nawet $10^6 \div 10^9$ kopii produktu w jednej próbkowce. Reakcja ta jest katalizowana przez termostabilny enzym polimerazę, izolowany z mikroorganizmów (*Thermus aquaticus*, *Pyrococcus furiosus*) zamieszkujących gorące źródła. Do reakcji niezbędne są również wolne deoksynukleotydy (dNTP), które zostają włączone do nowo powstającej nici DNA oraz krótkie, specyficzne oligonukleotydy – startery (ang. *primers*), których sekwencja determinuje początek i koniec powielanego fragmentu (Mullis, Faloona 1987). Matrycą w reakcji może być DNA wyizolowany z dowolnego materiału biologicznego, np. z krwi, wycinków tkanek, hodowli komórkowych, wymazów, popłuczyn, próbek środowiskowych czy bioaerozoli.

Reakcja PCR umożliwia zarówno identyfikację grup mikroorganizmów, jak i konkretnego gatunku drobnoustroju w analizowanej próbce. Odpowiednie zaprojektowanie starterów pozwala na: amplifikację regionów genomu odpowiedzialnych za posiadanie konkretnych cech metabolicznych drobnoustrojów, np. oporności na antybiotyki (Ramachandran i in. 2007), zdolności do produkcji toksycznych metabolitów (Leema i in. 2011) oraz innych czynników wirulencji, np.: adhezyn, hemolizyn czy związków cytotoksycznych (Yamamoto i in. 1995). Metoda ta pozwala więc nie tylko ocenić obecność danego gatunku drobnoustroju w badanym materiale, lecz także określić jego profil metaboliczny i potencjał patogenny.

W identyfikacji drobnoustrojów izolowanych z powietrza, ze względu na ich małe zazwyczaj stężenie (ok. $10^3 \div 10^4$ jtk/m³), stosuje się najczęściej, tzw. zagnieżdżony PCR (ang. *nested-PCR*), w którym przeprowadza się kolejno dwie reakcje. W pierwszej z nich startery są tak zaprojektowane, aby amplifikowały stosunkowo długi (ok. 1000 ÷ 1500 par zasad, pz) fragment. Po oczyszczeniu stanowi on matrycę dla drugiej reakcji, której produkt znajduje się w obrębie pierwszej sekwencji. Podejście takie pozwala na zwiększenie czułości metody nawet 10^4 razy (Stärk i in. 1998).

Po przeprowadzeniu reakcji PCR, niezbędna jest wstępna ocena jej czułości i specyficzności. Jakość uzyskanego amplikonu jest oceniana podczas analizy elektroforetycznej produktów w żelu agarozowym, umieszczonym w stałym polu elektrycznym. Usieciowanie żelu pozwala na rozdział fragmentów DNA o różnej długości – im dłuższy jest fragment, tym wolniej migruje w żelu. Analizując równolegle otrzymane produkty PCR oraz mieszaninę fragmentów DNA o znanej wielkości (tzw. markera DNA), można określić długość amplifikowanego fragmentu. Choć analiza elektroforetyczna umożliwia wstępną ocenę jakości przeprowadzonej reakcji, niezbędne jest potwierdzenie poprawności amplifikacji przez sekwencjonowanie i porównanie otrzymanej sekwencji do sekwencji umieszczonych w bazach nukleotydowych (np. GenBank – NCBI).

Sekwencjonowanie to metoda umożliwiająca poznanie kolejności nukleotydów w analizowanym fragmencie DNA. Opracowanie jej w latach 70. ubiegłego wieku przez Sanger (Sanger, Coulson 1975) zapoczątkowało zakrojone na

dużą skalę badania, których celem było stworzenie map genomowych organizmów żywych. Najśłynniejszym z nich był zakończony w 2003 r. projekt poznania ludzkiego genomu – Human Genome Project (IHGSC, 2001; Venter i in. 2001). Obecnie istnieje bardzo obszerna, ogólnodostępna baza zawierająca sekwencje genomowe pochodzące prawie z 260 000 gatunków organizmów (Benson i in. 2013) oraz różnorodne narzędzia bioinformatyczne służące do ich analizy „*in silico*”. Choć w ostatnich latach coraz większym zainteresowaniem cieszą się bardziej zaawansowane metody sekwencjonowania (sekwencjonowanie nowej generacji, ang. *next-generation sequencing*, NGS), to sekwencjonowanie *Sangera* nadal znajduje wszechstronne zastosowanie, zarówno w badaniach naukowych, jak i diagnostyce medycznej.

Identyfikacja mikroorganizmów za pomocą reakcji PCR wymaga amplifikacji takiego regionu genomu, którego sekwencja jest unikatowa dla danego gatunku. Najczęściej wykorzystywanymi w tego typu analizach „celami molekularnymi” są geny kodujące RNA małej podjednostki rybosomu, np. 16S rRNA dla bakterii i archeonów; 18S, 28S rDNA lub fragmenty zlokalizowane pomiędzy nimi, nazywane ITS (ang. *internal transcribed spacers*) dla grzybów. Geny te, ze względu na swoją budowę, zostały nazwane molekularnymi chromatrami (Woese 1987). Cechują się obecnością zarówno konserwowanych (wolno zmieniających się w toku ewolucji) fragmentów, jak i takich, które charakteryzują się zmiennością międzygatunkową. Ponadto, ich funkcja w organizmach żywych wszystkich królestw pozostała niezmienną. W obrębie sekwencji genu 16S rRNA znajduje się 9 regionów hiperzmiennych (V1-V9) charakteryzujących się największą zmiennością międzygatunkową. Uważa się, że zmienność genetyczna w ich obrębie wynika ze spontanicznie zachodzących mutacji. Fragmenty te różnią się między sobą stopniem zróżnicowania gatunkowego. Nie istnieje jeden region, którego analiza byłaby w stanie odróżnić od siebie wszystkie gatunki bakterii, ale największą heterogennością charakteryzuje się najkrótszy, 58-nukleotydowy fragment V6 (pozycje od 986 do 1043 genu 16S rRNA). Analiza jego sekwencji umożliwia identyfikację wielu gatunków bakterii, w tym patogennych, z wyłączeniem jednak niektórych blisko ze sobą spokrewnionych

mikroorganizmów, np. pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* (*Escherichia* spp., *Shigella* spp. i *Salmonella* spp.), (Chakravorty i in. 2007).

Analiza sekwencji genów kodujących 16S rRNA małej podjednostki rybosomalnej (ang. *small subunit*, SSU) stała się ogólnie przyjętą na świecie strategią służącą do badania zróżnicowania filogenetycznego mikroorganizmów, pozwalającą na określenie przynależności gatunkowej (Böttger 1996). Ze względu na dużą czułość oraz zdolność do identyfikacji rzadko izolowanych, słabo scharakteryzowanych lub zmiennych fenotypowo

gatunków stanowi znakomitą alternatywę dla testów biochemicznych (np. API), (Clarridge 2004; Bosshard i in. 2006). Szczególnie przydatna okazała się możliwość zastosowania analizy sekwencji genów SSU rRNA do różnicowania klinicznie istotnych, patogennych gatunków drobnoustrojów (Travis i in. 2000), a także identyfikacji gatunkowej mikroorganizmów, których detekcja metodami hodowlanymi jest długotrwała, np. *Helicobacter* spp. (Nilsson i in. 2000) czy *Mycobacterium* spp., którego identyfikacja za pomocą testów wzrostowych zajmuje nawet 6 ÷ 8 tygodni (Kox i in. 1995).

ANALIZA ILOŚCIOWA

Metody identyfikacji drobnoustrojów oparte na klasycznej reakcji PCR oraz sekwencjonowaniu, mimo że umożliwiają identyfikację gatunkową, nie pozwalają na określenie liczby mikroorganizmów w badanym materiale. Technika ilościowego PCR-qPCR (ang. *quantitative PCR*; *Real-Time PCR*), dzięki zastosowaniu wyznakowanych fluorescencyjnie oligonukleotydów (tzw. sond molekularnych) i odpowiednich systemów detekcji, umożliwiła monitorowanie przyrostu liczby kopii produktu w trakcie trwania reakcji (Heid i in. 1996). Zaletą takiej modyfikacji jest zarówno możliwość detekcji specyficznej sekwencji DNA w badanym materiale, jak i oznaczenie jej w sposób ilościowy.

Wybranie odpowiedniego celu molekularnego i zaprojektowanie sond molekularnych jest kluczowym etapem planowania doświadczenia wykorzystującego reakcję ilościowego PCR. Sekwencja użytych podczas reakcji starterów i sond warunkuje charakter przeprowadzanego eksperymentu. Ilościowe oznaczenie zawartości komórek danego gatunku jest możliwe, jeśli użyta sonda molekularna będzie wiązała specyficzną dla tego gatunku sekwencję (np. jednego z regionów hiperzmiennych genu 16S rRNA). Ilościowe oznaczenie liczby komórek danego drobnoustroju za pomocą techniki Real-Time PCR jest możliwe tylko wtedy, kiedy równolegle do przeprowadzonej reakcji są analizowane próbki o znanej liczbie

kopii badanej sekwencji, umożliwiające wykreślenie krzywej standardowej. Odpowiedni dobór i przygotowanie standardów są kluczowe podczas analizy ilościowej i mogą stanowić wyzwanie zarówno w warstwie technicznej, jak i naukowej dla laboratoriów zajmujących się badaniami jakości mikrobiologicznej środowiska pracy (Hospodsky i in. 2010). Zastosowanie sond, wiążących konserwowane regiony genu 16S rRNA, umożliwia natomiast oszacowanie ogólnej liczby drobnoustrojów w badanym materiale (Nadkarni 2002).

Technika qPCR w ostatnich latach coraz częściej jest stosowana w aerobiologii do szacowania ogólnej liczby: bakterii, grzybów czy archeonów. Jej wykorzystanie w badaniach dotyczących aerozoli biologicznych w różnych środowiskach pokazało, że liczba mikroorganizmów wyznaczana na podstawie tej metody była nawet o 100 ÷ 1000 razy większa niż ta, oznaczana metodami hodowlanymi (Blais-Lecours i in. 2015). Dlatego też metody biologii molekularnej umożliwiają bardziej precyzyjne szacowanie wielkości narażenia na szkodliwe czynniki biologiczne.

ANALIZA ZRÓŻNICOWANIA SPOŁECZNOŚCI DROBNOUSTROJÓW

Precyzyjna ocena narażenia na szkodliwe czynniki biologiczne powinna obejmować analizę ilościową i jakościową społeczności mikroorganizmów występujących w danym środowisku pracy. Analiza genu kodującego 16S rRNA umożliwia identyfikację gatunkową, wymaga jednak wcześniejszego otrzymania czystej kultury badanego drobnoustroju. Jeśli warunek ten nie zostanie spełniony, produktem reakcji będzie mieszanina sekwencji pochodzących od różnych, obecnych w badanym materiale mikroorganizmów (mieszanina fragmentów tej samej wielkości, ale różnej sekwencji). Rozdział takich produktów za pomocą klasycznej elektroforezy nie jest możliwy. W celu usunięcia tego mankamentu, wypracowano kilka strategii badawczych, umożliwiających ogólną ocenę składu gatunkowego mieszaniny społeczności drobnoustrojów na podstawie analizy produktów PCR genów kodujących 16S rRNA. Wśród nich są: klonowanie i analiza bibliotek genowych, techniki, tzw. genetycznego odcisku palca „*fingerprintingu*” (DGGE, TGGE, RISA, T-RFLP) oraz sekwencjonowanie nowej generacji – NGS.

Tworzenie bibliotek genowych obejmuje klonowanie produktu PCR kodującego 16S rRNA amplifikowanego z całkowitego DNA obecnego w materiale biologicznym do odpowiedniego wektora ekspresyjnego (np. pGEM-T). Przygotowaną w ten sposób biblioteką są transformowane bakterie. Po ich inkubacji są izolowane pojedyncze kolonie, a każda z nich niesie wektor z fragmentem pochodzącym od jednego drobnoustroju obecnego w materiale wyjściowym. Sekwencjonowanie fragmentów wektorów i ich analiza bioinformatyczna pozwalają na określenie zróżnicowania gatunkowego społeczności drobnoustrojów w badanym środowisku. Technika ta jest wykorzystywana do analizy bioróżnorodności mikroorganizmów, zarówno stanowiących zanieczyszczenie powierzchni, jak i zawieszonych w powietrzu (Ma i in. 2015). Zastosowanie odpowiednich sekwencji starterów pozwala na identyfikację zarówno grzybów, jak i bakterii oraz archeonów (Paez-Rubio i in. 2005; Nehmé 2009). Warto podkreślić, że wiedza na temat obecności tej ostatniej grupy drobnoustrojów w powietrzu oraz ich wpływu na organizm

ludzki jest bardzo ograniczona. Dopiero wykorzystanie metod biologii molekularnej oraz wyniki badań prowadzonych w ostatnich latach potwierdziły informacje o obecności archeonów w powietrzu różnych środowisk pracy i możliwym ich wpływie na stan zdrowia pracowników narażonych na ich duże stężenia (Nehmé i in. 2009; Blais-Lecours i in. 2011; 2014).

Standardową metodą analizy produktów PCR jest elektroforeza w żelu agarozowym lub poliakrylamidowym. Umożliwia ona rozdział fragmentów DNA o różnej wielkości, wykorzystując różnice prędkości ich migracji w żelu umieszczonym w stałym polu elektrycznym. Technika ta jest stosowana powszechnie do wstępnej, jakościowej analizy produktów PCR, ponieważ pozwala na określenie długości powstającego produktu oraz specyficzności użytych starterów. Jak już wspomniano, problemem w analizie produktów amplifikacji genu 16S rRNA po reakcji PCR, mimo różnic w sekwencjach nukleotydowych pochodzących od różnych organizmów, jest identyczna długość powstających produktów. W takim przypadku, klasyczna analiza elektroforetyczna nie pozwala na ich rozdział. W 1993 r. opracowano metodę (Muyzer i in. 1993), w której rozdział fragmentów kwasu nukleinowego przeprowadza się w żelu poliakrylamidowym w gradiencie stężenia czynnika denaturującego (ang. *denaturing gradient gel electrophoresis*, DGGE). W metodzie tej wykorzystano różnice w szybkości denaturacji (topnienia) fragmentów DNA o różnej sekwencji, wynikające z różnic w sile wiązania wodorowego między różnymi parami nukleotydów. Im więcej par GC (guanina-cytozyna) we fragmencie DNA, tym wolniej taki fragment denaturuje. Dzięki zastosowaniu rosnącego stężenia czynnika denaturującego (może nim być substancja chemiczna, np. mocznik, lub temperatura), nici DNA o różnej sekwencji, a takiej samej długości, migrują z różną prędkością w żelu. Do wykonania analizy DGGE stosuje się odpowiednio zmodyfikowane oligonukleotydy (startery), które na swoim końcu 5' posiadają kilkunastonukleotydowy, bogaty w pary GC fragment, który zostaje dodany do powstającego produktu. Dzięki niemu produkt PCR podczas elektroforezy, po osiągnięciu stężenia substancji denaturującej, w której obie nici powinny się całkowicie rozdzielić (punkt topnienia DNA), tworzy strukturę

przestrzenną przypominającą literę „Y”, gdzie podstawę tworzy fragment bogaty w pary GC. Powstanie takiej struktury powoduje drastyczny spadek prędkości migracji, którego moment zależy bezpośrednio od sekwencji DNA badanego fragmentu.

Analiza DGGE produktu PCR pozwala na określenie różnorodności filogenetycznej społeczności mikroorganizmów w danym środowisku przez otrzymanie charakterystycznego profilu (wzoru prążków) zmienności sekwencji genu kodującego 16S rRNA (w przypadku bakterii), 18S rRNA lub fragmentu ITS (w przypadku grzybów). Profil taki określa się mianem „molekularnego odcisku palca” (ang. „*molecular fingerprinting*”), ponieważ stanowi on odzwierciedlenie składu gatunkowego społeczności drobnoustrojów. Otrzymane podczas rozdziału elektroforetycznego prążki mogą zostać wycięte z żelu, oczyszczone i zsekwencjonowane w celu identyfikacji danego mikroorganizmu. Analiza DGGE jest mniej czasochłonna od klonowania, a rozdzielanie fragmentów na podstawie różnic ich sekwencji eliminuje możliwość wielokrotnej analizy tego samego ampliconu. Czułość takiej metody jest duża i pozwala na wykrycie drobnoustroju stanowiącego nawet 1% społeczności (Muyzer i in. 1993). Dodatkowo, analiza statystyczna porównująca średnie odległości pomiędzy prążkami w żelu (metoda średnich połączeń – ang. *unweighted pair group method with arithmetic mean*, UPGMA), umożliwia utworzenie dendrogramu (drzewa filogenetycznego) grupującego mikroorganizmy spokrewnione ze sobą na podstawie podobieństw sekwencji ich genów 16S, 18S rRNA lub ITS. Sekwencjonowanie otrzymanych fragmentów umożliwia jednoczesną identyfikację gatunków występujących w analizowanym materiale, także tych, które przy wykorzystaniu metod hodowlanych zostałyby pominięte. Analiza DGGE, ze względu na: liczbę danych jaką dostarcza, łatwość wykonania oraz stosunkowo niewielki koszt, jest powszechnie stosowana do oceny zróżnicowania społeczności drobnoustrojów oraz monitorowania zmian w nich zachodzących (Tanaka i in. 2015). Znalazła też swoje zastosowanie w badaniach bioaerozoli, pozwalając na szybką i precyzyjną analizę składu społeczności drobnoustrojów. Przygotowanie odpowiedniego markera w postaci wyizolowanego z czystych kultur genomowego DNA drobnoustrojów i jego równoległa analiza umożliwiają wykonanie screeningu na obecność

wybranego gatunku/gatunków w badanym materiale (Duarte i in. 2010). Dodatkowo, ze względu na fakt, że DGGE jest metodą półilościową (różnice w intensywności prążków na żelu zależą od stężenia DNA w materiale wyjściowym), pozwala ona na określenie dominujących w danym środowisku gatunków mikroorganizmów.

Oprócz analizy DGGE, opracowano także inne metody *fingerprintingu*, pozwalające na szybką analitycznie ocenę bioróżnorodności mikrobiologicznej badanego środowiska. Wykorzystywane są one głównie do monitorowania zmian w nim zachodzących lub porównania społeczności mikroorganizmów różnych środowisk. W technice RISA (ang. *ribosomal intergenic spacer analysis*) oraz jej zautomatyzowanej modyfikacji – ARISA (ang. *automated RISA*) w żelu poliakrylamidowym jest analizowana wielkość produktu PCR fragmentu genomu, zlokalizowanego pomiędzy genami kodującymi małą (16S) i dużą (23S) podjednostkę rybosomu (region IGS – ang. *intergenic spacer region*). Długość tego fragmentu charakteryzuje bardzo duża zmienność międzygatunkowa, wahająca się między 150 a 1500 pz. Zastosowanie wyznakowanych fluorescencyjnie starterów oraz automatyzacja elektroforezy (ARISA) znacznie zwiększa czułość metody (Fishe, Triplett 1999). W badaniach dotyczących aerozoli środowiska pracy metoda ta okazała się pomocna np. w określeniu źródła obecności w powietrzu szczepów *Clostridium* spp. przez ich porównanie ze szczepami izolowanymi z osadów ściekowych (Pillai i in. 1996).

T-RFLP (ang. *terminal restriction fragment length polymorphism*) to analiza elektroforetyczna (kapilarna lub tradycyjna w żelu poliakrylamidowym) wyznakowanych fluorescencyjnie produktów PCR, poprzedzona ich trawieniem odpowiednio dobranym enzymem restrykcyjnym, przecinającym podwójną nić DNA między nukleotydami w obrębie charakterystycznej, kilkunukleotydowej sekwencji (najczęściej 6 ÷ 8 pz). Rozdzielane są wówczas tylko te fragmenty, w których ujawniły się mutacje, skutkujące pojawieniem się nowych miejsc restrykcyjnych dla danego enzymu. Wykonując tego typu analizę, należy wziąć pod uwagę prawdopodobieństwo, że więcej niż jeden gatunek drobnoustroju może być reprezentowany przez jeden prążek (lub pik chromatogramu). Niemniej jednak, otrzymany profil fragmentów restrykcyjnych oddaje względne zróżnicowanie mikroorganizmów w badanym mate-

riale. Metoda T-RFLP jest wykorzystywana do analizy społeczności pochodzących z różnych środowisk, w tym i tych obecnych w powietrzu (Lee i in. 2010). Została ona wykorzystana m.in. do śledzenia rozprzestrzeniania się szczepów prątków *Mycobacterium tuberculosis* wśród personelu szpitalnego (Diel i in. 2005).

AP-PCR (ang. *arbitrarily primed polymerase chain reaction*) to metoda służąca do porównania podobieństwa szczepów drobnoustrojów w obrębie jednego gatunku. Wykorzystuje metodę PCR, która jest przeprowadzana w mało rygorystycznych warunkach, z zastosowaniem jednego startera (Ménard i in. 1992). Produkt jest rozdzielany w żelu agarozowym. Ta bardzo czuła metoda umożliwia śledzenie rozprzestrzeniania się szczepów drobnoustrojów w środowisku. Była wykorzystana m.in. w projekcie mającym na celu sprawdzenie możliwości przeniesienia szczepów drobnoustrojów obecnych w powietrzu oczyszczalni ścieków do organizmów pracowników tego typu zakładu (Orsini i in. 2002).

W technice RAPD (ang. *random amplified polymorphic DNA*) reakcja PCR jest przeprowadzana z krótkim starterem (8 ÷ 12 nukleotydów) przyłączającym się do matrycy w sposób losowy (Hadrys i in. 1992). Zaletą tej metody jest brak konieczności znajomości sekwencji genów analizowanych szczepów. Podczas wykonywania analizy RAPD należy pamiętać, by stosować stałe warunki reakcji, ponieważ zmiana stężenia któregośkolwiek ze składników (starterów, jonów magnezu, składników buforu), może skutkować pojawieniem się zmienionego profilu fragmentów. Technika RAPD znalazła zastosowanie m.in. w typowaniu istotnych klinicznie, trudnych do odróżnienia za pomocą metod hodowlanych, a występujących w powietrzu gatunków grzybów z rodzaju *Aspergillus* (Kermani 2016). Stosowano ją również do genotypowania i porównywania szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus* i *Staphylococcus* izolowanych z różnych miejsc w obrębie zakładu pracy przetwarzającego biomasę dla celów energetycznych. Udowodniono w ten sposób możliwość przenoszenia potencjalnie patogennych bakterii ze środowiska pracy na dłonie oraz maski, które były stosowane przez pracowników jako zabezpieczenie dróg oddechowych (Ławniczek-Walczuk i in. 2017).

Zaletą wszystkich metod *fingerprintingu* jest możliwość szybkiego uzyskania informacji na temat zróżnicowania mikroorganizmów w badanym

środowisku, bez konieczności ich hodowania w warunkach laboratoryjnych. Wśród ograniczeń tych metod można wymienić: słabą powtarzalność (zależną od bardzo wielu takich czynników, jak: jakość izolacji, sekwencja użytych starterów, warunki reakcji PCR czy warunki elektroforezy), brak zdolności do identyfikacji mikroorganizmów stanowiących niewielki odsetek w społeczności czy słabą zdolność do odróżnienia blisko ze sobą spokrewnionych mikroorganizmów. Techniki te stanowią jednak znakomite uzupełnienie innych metod laboratoryjnych, pozwalając na uzyskanie pełniejszej, bardziej precyzyjnej oceny narażenia na szkodliwe czynniki biologiczne.

Rozwój biologii molekularnej i zaawansowanych technik analizy bioinformatycznej doprowadziły do opracowania nowych metod sekwencjonowania umożliwiających poznanie kolejności nukleotydów coraz dłuższych fragmentów DNA w coraz krótszym czasie, coraz mniejszym nakładem pracy i przy znaczącej redukcji kosztów. Obecnie, technologia sekwencjonowania nowej generacji (ang. *next-generation sequencing*, NGS) pozwala na uzyskanie sekwencji fragmentu DNA długości od 1 do nawet 600 miliardów par zasad (w zależności od zastosowanej technologii) w czasie około 24 h (Liu i in. 2012). W celu porównania, można przypomnieć, że projekt poznania ludzkiego genomu, czyli zsekwencjonowanie całego ludzkiego DNA o długości około 3 Gpz (3 miliardów par zasad), prowadzony w latach 1990-2003 z wykorzystaniem sekwencjonowania metodą Sanger, zajął naukowcom prawie 13 lat. Obserwowany dziś postęp dokonał się m.in. dzięki zastosowaniu i udoskonaleniu strategii zwanej „*shotgun sequencing*” (sekwencjonowanie wielu krótkich, zachodzących na siebie fragmentów kwasów nukleinowych o długości 50 ÷ 500 pz, a następnie składanie ich w celu uzyskania całości sekwencji wyjściowej) oraz dostępności zaawansowanego systemu detekcji i oprogramowania będącego w stanie przetworzyć ogromną liczbę danych w krótkim czasie. Coraz większa dostępność oraz stale malejąca cena sprzętu i odczynników pozwalających na analizę NGS sprawiły, że na technologię tę mogą sobie coraz częściej pozwolić zarówno duże firmy biotechnologiczne, jak i mniejsze laboratoria. Choć do tej pory w rutynowo prowadzonej analizie narażenia na szkodliwe czynniki biologiczne metoda ta nie jest jeszcze powszechnie stosowana, warto podkreślić możliwość jej wykorzystania także i w tym obszarze. Analiza genów 16S/18S z użyciem technologii

NGS pozwala na analizę metagenomową dowolnej próbki środowiskowej i uzyskanie informacji na temat zróżnicowania gatunkowego, bez konieczności jej klonowania czy pracochłonnego rozdziału elektroforetycznego. O wszechstronności metody świadczy wykorzystanie technologii NGS do analizy

bioróżnorodności w wielu środowiskach, m.in.: wodnego (Yergeau i in. 2012), powietrznego (Be i in. 2015), glebowego (Bell i in. 2013) czy mikrobioty przewodu pokarmowego człowieka (Jünemann i in. 2012).

PODSUMOWANIE

Rozwój technik wykorzystujących analizę DNA oraz ich zastosowanie w mikrobiologii umożliwiło dostęp do informacji, które jeszcze kilkanaście lat temu, były dla badaczy niedostępne. Szybka analiza społeczności drobnoustrojów czy identyfikacja mikroorganizmu niezdolnego do wzrostu na podłożu hodowlanym to jedynie przykłady możliwości, jakie dają techniki oparte na analizie DNA.

W niniejszym artykule przedstawiono metody biologii molekularnej stosowane coraz częściej w

ocenie narażenia na szkodliwe czynniki biologiczne w środowisku pracy. Są to techniki umożliwiające określenie składu gatunkowego drobnoustrojów oraz szacowanie ich liczby na podstawie informacji zakodowanych w ich genomach. Wykorzystanie tego typu metod pozwala na pełniejsze, w porównaniu do tradycyjnych technik analitycznych, określenie ryzyka zawodowego związanego z obecnością czynników biologicznych w środowisku pracy.

PIŚMIENNICTWO

Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143.

Be N.A., Thissen J.B., Fofanov V.Y., Allen J.E., Rojas M., Golovko G., Fofanov Y., Koshinsky H., Jaing C.J. (2015). Metagenomic analysis of the airborne environment in urban spaces. *Microb. Ecol.* 69(2), 346–355.

Bell T.H., Yergeau E., Maynard C., Juck D., Whyte L.G., Greer C.W. (2013). Predictable bacterial composition and hydrocarbon degradation in Arctic soils following diesel and nutrient disturbance. *ISME J.* 7, 1200–1210.

Benson D.A., Cavanaugh M., Clark K., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J., Sayers E.W. (2013) GenBank, *Nucl. Acid Res.* 41(1), 36–42.

Blais-Lecours P., Duchaine C., Taillefer M., Tremblay C., Veillette M., Cormier Y., Marsolais D. (2011). Immunogenic properties of archaeal species found in bioaerosols. *PLoS One.* 6(8), e23326.

Blais-Lecours P., Perrot P., Duchaine C. (2015). Non-culturable bioaerosols in indoor settings. Impact on health and molecular approaches for detection. *Atmos. Environ.* 110(6), 45–53.

Blais-Lecours P., Veillette M., Marsolais D., Cormier Y., Kirychuk S., Duchaine C. (2014). Archaea des bioaérosols de fermes laitières, des poulaillers et des usines d'épuration des eaux usées. Leur rôle dans l'inflammation pulmonaire. *IRSST.* R-827.

Bosshard P.P., Abels S., Zbinden R., Böttger E.C., Altwegg M. (1996). Approaches for identification of microorganisms. *ASM News* 62, 247–250.

Bosshard P.P., Zbinden R., Abels S., Böddinghaus B., Altwegg M., Böttger E.C. (2006). 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 44(4), 1359–1366.

Cayer M.P., Veillette M., Pageau P., Hamelin R., Bergeron M.J., Mériaux A., Cormier Y., Duchaine C. (2007). Identification of mycobacteria in peat moss processing plants: application of molecular biology approaches. *Can. J. Microbiol.* 53(1), 92–99.

Chakravorty S., Helb D., Burday M., Connell N., Alland D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J. Microbiol. Meth.* 69(2), 330–339.

Clarridge J.E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 17(4), 840–862.

Diel R., Seidler A., Nienhaus A., Rüscher-Gerdes S., Niemann S. (2005). Occupational risk of tuberculosis transmission in a low incidence area. *Respir. Res.* 14(6), 35.

Duarte S., Pascoal C., Alves A., Correia A., Cássio F. (2010). Assessing the dynamic of microbial communities

- during leaf decomposition in a low-order stream by microscopic and molecular techniques. *Microbiol. Res.* 165, 351–362.
- Dutkiewicz J., Górny R.L. (2002). Biologiczne czynniki szkodliwe dla zdrowia – klasyfikacja i kryteria oceny narażenia. *Medycyna Pracy* 53(1), 29–39.
- Fisher M.M., Triplett E.W. (1999). Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(10), 4630–4636.
- Hadrys H., Balick M., Schierwater B. (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol. May* 1(1), 55–63.
- Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.* (6) 986–994.
- Heidelberg J.F., Shahamat M., Levin M., Rahman I., Stelma G., Grim C., Colwell R.R. (1997). Effect of aerosolization on culturability and viability of Gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(9), 3585–3588.
- Henry T., Iwen P.C., Hinrichs S.H. (2000). Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *J. Clin. Microbiol.* 38(4), 1510–1515.
- Hospodsky D., Yamamoto N., Peccia J. (2010). Accuracy, precision, and method detection limits of quantitative PCR for airborne bacteria and fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(21), 7004–7012.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409(6822), 860–921.
- Jünemann S., Prior K., Szczepanowski R., Harks I., Ehmke B., Goesmann A., Stoye J., Harmsen D. (2012). Bacterial community shift in treated periodontitis patients revealed by ion torrent 16S rRNA gene amplicon sequencing. *PLoS One* 7(8), e41606.
- Kermani F., Shams-Ghahfarokhi M., Gholami-Shabani M., Razzaghi-Abyaneh M. (2016). Diversity, molecular phylogeny and fingerprint profiles of airborne *Aspergillus* species using random amplified polymorphic DNA. *World J. Microbiol. Biotech.* 32(6), 96.
- Kox L.F., van Leeuwen J., Knijper S., Jansen H.M., Kolk A.H. (1995). PCR assay based on DNA coding for 16S rRNA for detection and identification of mycobacteria in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 33(12), 3225–3233.
- Lee S.H., Lee H.J., Kim S.J., Lee H.M., Kang H., Kim Y.P. (2010). Identification of airborne bacterial and fungal community structures in an urban area by T-RFLP analysis and quantitative real-time PCR. *Sci. Total Environ.* 408(6), 1349–1357.
- Leema G., Chou D.S., Jesudasan C.A., Geraldine P., Thomas P.A. (2011). Expression of genes of the aflatoxin biosynthetic pathway in *Aspergillus flavus* isolates from keratitis. *Mol. Vis.* 17(11), 2889–2897.
- Li K. (2011). Molecular comparison of the sampling efficiency of four types of airborne bacterial samplers. *Sci. Total Environ.* 409(24), 5493–5498.
- Liu L., Li Y., Li S., Hu N., He Y., Pong R., Lin D., Lu L., Law M. (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. *J. Biomed Biotech.* 2012, 1–11.
- Ławniczek-Walczak A., Gołofit-Szymczak M., Cyprowski M., Stobnicka A., Górny R.L. (2017). Monitoring of bacterial pathogens at workplaces in power plant using biochemical and molecular methods. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* DOI 10.1007/s00420-017-1197-z.
- Ma Y., Zhang H., Du Y., Tian T., Xiang T., Liu X., Wu F., An L., Wang W., Gu J.D., Feng H. (2015). The community distribution of bacteria and fungi on ancient wall paintings of the Mogao Grottoes. *Sci. Rep.* 5, 7752.
- Ménard C., Brousseau R., Mouton C. (1992). Application of polymerase chain reaction with arbitrary primer (AP-PCR) to strain identification of *Porphyromonas* (Bacteroides) gingivalis. *FEMS Microbiol. Lett.* 74(2-3), 163–168.
- Mullis K.B., Faloona F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335–350.
- Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(3), 695–700.
- Nadkarni M.A., Martin F.E., Jacques N.A., Hunter N. (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* 148, 257–266.
- Nehmé B., Gilbert Y., Létourneau V., Forster R.J., Veillette M., Villemur R., Duchaine C. (2009). Culture-Independent characterization of archaeal biodiversity in swine confinement building bioaerosols. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(17), 5445–5450.
- Nilsson H.O., Taneera J., Castedal M., Glatz E., Olsson R., Wadström T. (2000). Identification of *Helicobacter pylori* and other *Helicobacter* species by PCR, hybridization and partial DNA sequencing in human liver samples from patients with primary sclerosing cholangitis or primary biliary cirrhosis. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1072–1076.
- Oliver J.D., Nilsson L., Kjelleberg S. (1991). Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(9), 2640–2644.
- Orsini M., Laurenti P., Boninti F., Arzani D., Lanni A., Romano-Spica V. (2002). A molecular typing approach for evaluating bioaerosol exposure in wastewater treatment plant workers. *Water Res.* 36(5), 1375–1378.
- Paez-Rubio T., Viau E.J., Romero-Hernandez S., Peccia J. (2005). Source bioaerosol concentration and rRNA

- gene-based identification of microorganisms aerosolized at a flood irrigation wastewater reuse site. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(2), 804–810.
- Pillai S.D., Widmer K.W., Dowd S.E., Ricke S.C. (1996). Occurrence of airborne bacteria and pathogen indicators during land application of sewage sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(1), 296–299.
- Ramachandran D., Bhanumathi R., Singh D.V. (2007). Multiplex PCR for detection of antibiotic resistance genes and the SXT element: application in the characterization of *Vibrio cholerae*. *J. Med. Microbiol.* 56(3), 346–351.
- Rozsak D.B., Grimes D.J., Colwell R.R. (1984). Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Can. J. Microbiol.* 30(3), 334–338.
- Sanger F., Coulson A.R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94(3), 441–448.
- Seifert S.A., von Essen S., Jacobitz K., Crouch R., Lintner C.P. (2003). Organic dust toxic syndrome: a review. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 41(2), 185–193.
- Stärk K.D., Nicolet J., Frey J. (1998). Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by air sampling with a nested PCR assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(2), 543–548.
- Szeszenia-Dąbrowska N., Wilczyńska U. (2016). Choroby zawodowe w Polsce w 2015 r. Łódź, Instytut Medycyny Pracy.
- Tanaka D., Terada Y., Nakashima T., Sakatoku A., Nakamura S. (2015). Seasonal variations in airborne bacterial community structures at a suburban site of central Japan over a 1-year time period using PCR-DGGE method. *Aerobiologia* 31(6), 143–157.
- Venter J.C. i in. (2001). The sequence of the human genome. *Science*. 291(5507), 1304–1351.
- Woese C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221–271.
- Yamamoto S., Terai A., Yuri K., Kurazono H., Takeda Y., Yoshida O. (1995). Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunol. Med. Mic.* 12(2), 85–90.
- Yergeau E., Lawrence J.R., Sanschagrin S., Waiser M.J., Korber D.R., Greer C.W. (2012). Next-generation sequencing of microbial communities in the Athabasca River and its tributaries in relation to oil sands mining activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 7626–7637.