Kwartalnik
Tom 59
Zeszyt 2•2020
KWIECIEŃ – CZERWIEC

CODEN:
PMKMAV 59 (2)
2020

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Postępy Mikrobiologii

Advancements of Microbiology

Index Copernicus ICV = 101,48 (2017)
Impact Factor ISI = 0,298 (2018)
Punktacja MNiSW = 20,00 (2019)

http://www.pm.microbiology.pl

RADA REDAKCYJNA

JACEK BARDOWSKI (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN), DARIUSZ BARTOSIK (Uniwersytet Warszawski),
JACEK BIELECKI (Uniwersytet Warszawski), RYSZARD CHRÓST (Uniwersytet Warszawski),
JERZY DŁUGOŃSKI (Uniwersytet Łódzki), NADZIEJA DRELA (Uniwersytet Warszawski),
EUGENIA GOSPODAREK-KOMKOWSKA (Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu),
JERZY HREBENDA (Uniwersytet Warszawski), WALERIA HRYNIEWICZ (Narodowy Instytut Leków),
MAREK JAKÓBISIAK (Warszawski Uniwersytet Medyczny), JACEK MIĘDZOBRODZKI (Uniwersytet Jagielloński),
ANDRZEJ PIEKAROWICZ (Uniwersytet Warszawski), ANTONI RÓŻALSKI (Uniwersytet Łódzki),
ALEKSANDRA SKŁODOWSKA (Uniwersytet Warszawski), RADOSŁAW STACHOWIAK (Uniwersytet Warszawski),
BOGUSŁAW SZEWCZYK (Uniwersytet Gdański), ELŻBIETA TRAFNY (Wojskowa Akademia Techniczna),
STANISŁAWA TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA (Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego),
GRZEGORZ WĘGRZYN (Uniwersytet Gdański), PIOTR ZIELENKIEWICZ (Uniwersytet Warszawski)

REDAKCJA

JACEK BIELECKI (Redaktor Naczelny)
Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa;
tel. 22 5541304; e-mail: jbielecki@biol.uw.edu.pl

RADOSŁAW STACHOWIAK (Zastępca)
Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa;
tel. 22 5541312; e-mail: radeks@biol.uw.edu.pl

AGNIESZKA SOBOLEWSKA-RUTA (Sekretarz)
Instytut Biotechnologii i Antybiotyków, ul. Starościńska 5, 02-516 Warszawa
tel. 22 3786229, e-mail: post.mikrobiol@biol.uw.edu.pl

ADRES REDAKCJI

Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel.: 22 3786229, 22 5541312
e-mail: post.mikrobiol@biol.uw.edu.pl

REDAKTORZY

MONIKA ADAMCZYK-POPŁAWSKA (Uniwersytet Warszawski), GABRIELA BUGLA-PŁOSKOŃSKA (Uniwersytet Wrocławski)
ALEKSANDER DEPTUŁA (Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu)
HENRYK KRUKOWSKI (Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie), BOŻENA NEJMAN-FALEŃCZYK (Uniwersytet Gdański)
RENATA MATLAKOWSKA (Uniwersytet Warszawski), EDYTA PODSIADŁY (Uniwersyteckie Centrum Kliniczne WUM)
ADRIANNA RACZKOWSKA (Uniwersytet Warszawski)
AGATA GORYLUK-SALMONOWICZ (Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie)
AGNIESZKA KWIATEK (Uniwersytet Warszawski), AGNIESZKA SZCZEPANKOWSKA (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN)
PIOTR ZALESKI (Instytut Biotechnologii i Antybiotyków)

PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

Redaktor odpowiedzialny: STEFANIA GIEDRYS-KALEMBA (Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie)

Adres Redaktora działu Publikacje Metodyczne i Standardy
ul. Malinowa 11, 72-003 Wołczkowo
tel. 605031324; fax 91 3113186; e-mail: kalemba@mp.pl

ISBN 978 - 83 - 923731 - 3 - 1

Informacja o zdjęciu na okładce:

Adhezja komórek *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 do ludzkich komórek nabłonkowych linii HEC-1-B.
Preparatyka: mgr Jagoda Płaczkiewicz i dr Agnieszka Kwiatek, Zakład Wirusologii, Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet Warszawski.
Zdjęcie: dr Paweł Bącal, Pracownia Inżynierii Nanohybrydowych Biosystemów Regulacji, Instytut Biocybernetyki
i Inżynierii Biomedycznej im. M. Nałęcza Polskiej Akademii Nauk.
Obraz SEM uzyskano przy użyciu aparatury zakupionej w ramach projektu CePT POIG.02.02.00-14-024/08-00.

P O L S K I E T O W A R Z Y S T W O M I K R O B I O L O G Ó W

Skład i druk: *Zakład Wydawniczy Letter Quality*, tel.: 22 115 38 10, 607 217 879
e-mail: roma.walendzewicz@gmail.com; projekt okładki: *Jerzy Grzegorkiewicz*

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2020, 59, 2, 113–114
DOI: 10.21307/PM-2020.59.1.000

WSPOMNIENIE

Prof. dr. hab. nauk med. Mieczysław Metzger
1920–1984

W tym roku przypada setna rocznica urodzin mojego Taty, prof. dr. Mieczysława Metzgera, urodzonego 30.08.1920 r. w Przemyślu, wybitnego mikrobiologa i immunologa, cenionego w kraju i za granicą, którego osobę i osiągnięcia chciałabym przywołać w tym krótkim wspomnieniu.

Prof. Metzger ukończył wydział lekarski Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie w marcu 1949 r. Po odbyciu stażu w Klinice Chirurgicznej U.J. i w Szpitalu Powiatowym Cieplicach Śl., we wrześniu 1949 r. podjął pracę w Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej Śląskiej Akademii Medycznej w Rokitnicy, pracując równocześnie przez 3 lata w Szpitalu Miejskim w Bytomiu w charakterze asystenta.

Od 1954 r. aż do śmierci w 1984 r. pracował w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda we Wrocławiu i równocześnie do 1962 r. w Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej Akademii Medycznej we Wrocławiu.

Stopień naukowy doktora nauk medycznych uzyskał 22 czerwca 1957 roku za rozprawę doktorską zatytułowaną „Badania nad budową antygenową pałeczek *Shigella boydi*, ze szczególnym uwzględnieniem ciepłochwiejnych antygenów", której promotorem był prof. dr hab. nauk med. Stefan Ślopek.

Kolejne etapy Jego kariery naukowej to uzyskanie tytułów: docenta w 1959 r., profesora nadzwyczajnego w 1965 r. oraz profesora zwyczajnego w 1979 r.

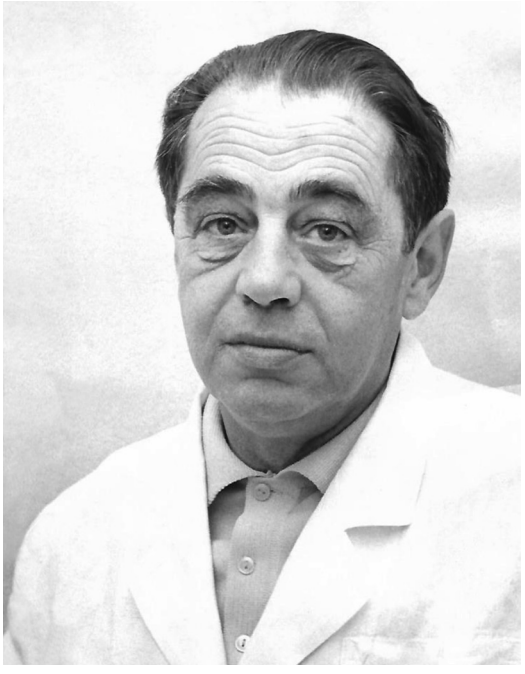
Od 1953 r. poświęcił się wyłącznie pracy naukowo-badawczej, w której można wyróżnić dwa zasadnicze okresy.

W pierwszym okresie Jego zainteresowania koncentrowały się wokół zagadnień związanych z biologią, diagnostyką i epidemiologią pałeczek *Shigella*, czego dowodem jest Jego rozprawa doktorska.

W drugim – od 1959 r. prowadził badania nad biologią i strukturą antygenową krętków bladych oraz immunologią zakażenia kiłowego.

W obu tych okresach dokonał licznych odkryć o znaczeniu poznawczym i praktycznym.

Do najistotniejszych osiągnięć należy zaliczyć wykazanie znamiennego wpływu niektórych enzymów



mukopolisacharolitycznych na kinetykę immobilizacji krętków bladych, a także wyniki uzyskane w badaniach nad istotą i mechanizmem działania neuraminidazy, enzymu rozkładającego powierzchniowe i nieantygenowe składniki krętka bladego, blokujące penetrację przeciwciał do głębiej leżących receptorów. Odkrycie tych zjawisk pozwoliło prof. Metzgerowi na opracowanie własnej modyfikacji odczynu unieruchamiania krętków, opisanego przez Nelsona i Mayera.

Modyfikacja ta jest znana w skali światowej pod nazwiskiem jej autora i została wprowadzona do diagnostyki serologicznej w licznych laboratoriach krajowych i zagranicznych.

Szczególną wartość mają badania prof. Metzgera nad strukturą antygenową *Treponema pallidum* oraz te Jego dokonania, które w dużej mierze pozwoliły na wyjaśnienie roli immunologicznej odpowiedzi komórkowej w patogenezie zakażenia kiłowego i w ochronie przeciwkiłowej.

Prof. M. Metzger, już jako kierownik Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej w IITD PAN we Wrocławiu,

prowadził wraz ze swoim zespołem, szeroko zakrojone badania nad odpowiedzią komórkową w przebiegu kiły doświadczalnej u królików oraz przebiegiem kiły u królików w warunkach immunosupresji.

Jego aktywność była skierowana na immunologię zakażeń krętkiem bladym. Prowadził też próby uzyskania szczepionki na ten patogen.

Uzyskane przez Niego wyniki badań dotyczące biologii krętków bladych i immunologii zakażenia kiłowego, wprowadziły prof. Metzgera do grona najwybitniejszych syfilidologów eksperymentalnych.

Swoją wiedzą i doświadczeniem chętnie się dzielił i przekazywał ją młodym uczonym, a pod Jego kierunkiem jako promotora zostało zrealizowanych i obronionych 5 rozpraw doktorskich.

Aktywnie reprezentował polską mikrobiologię i immunologię na kongresach, m.in. w Waszyngtonie i Brighton, na licznych zjazdach, sympozjach, konferencjach naukowych w kraju i za granicą.

Wyrazem uznania dla prof. Metzgera było m.in. zaproszenie Go przez ministra zdrowia USA do przeprowadzenia konsultacji prac badawczych z zakresu immunologii kiły, prowadzonych w różnych ośrodkach naukowych na terenie Stanów Zjednoczonych. Trzy amerykańskie uniwersytety: University of Columbia, University of Michigan, University of California zleciły Mu opracowanie ocen całokształtu dorobku naukowego swych pracowników.

Był członkiem Komitetu Ekspertów WHO ds. chorób wenerycznych i treponematoz, a także Międzynarodowego Towarzystwa Taksonomii i Nomenklatury Bakterii, Szwedzkiego Towarzystwa Dermatologicznego, Towarzystwa Paula Ehrlicha we Frankfurcie n/Menem.

W czasie swojej wieloletniej pracy w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN prof. Metzger pełnił szereg odpowiedzialnych funkcji. Był kierownikiem Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej, Ośrodka Badawczo-Diagnostycznego dla chorób wenerycznych, członkiem Rady Naukowej Instytutu, członkiem Komitetu Mikrobiologii PAN, Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, przewodniczącym Wrocławskiego Oddziału Towarzystwa, wiceprzewodniczącym Zarządu Głównego Towarzystwa, członkiem Polskiego Towarzystwa Immunologicznego, członkiem zwyczajnym Wrocławskiego Towarzystwa Naukowego, członkiem Komitetu Redakcyjnego „Postępy Higieny i medycyny Doświadczalnej" oraz Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, delegatem Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów do Europejskiej Federacji Towarzystw Mikrobiologicznych.

Prof. Mieczysław Metzger był wybitnym polskim naukowcem, o szerokiej wiedzy, dociekliwości, wybitnej inteligencji, fascynującej osobowości i dużym poczuciu humoru, z łatwością nawiązywał kontakty z ludźmi. Był człowiekiem uczciwym i prawym.

Miał żonę – Marię, mgr farmacji, córkę – Annę – lekarza-laryngologa, syna – Tadeusza – dr. inż. mech.

Czas wolny lubił spędzać w swoim domku w Szklarskiej Porębie, z rodziną i ukochanym psem.

Zmarł nagle 15.05.1984 r.

Córka – Anna

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2020, 59, 2, 115–127
DOI: 10.21307/PM-2020.59.2.009

MICROORGANISMS AS INDOOR AND OUTDOOR AIR BIOLOGICAL POLLUTION

Sylwia Siebielec[1]*, Małgorzata Woźniak[1], Anna Gałązka[1], Grzegorz Siebielec[2]

[1] Department of Agricultural Microbiology, Institute of Soil Science and Plant Cultivation – State Research Institute
[2] Department of Soil Science Erosion and Land Protection, Institute of Soil Science and Plant Cultivation – State Research Institute

Received in February, accepted in April 2020

Abstract: Air pollution is a major threat to human health. Biological air pollution is predominantly caused by the pollen of plants, fungi, bacteria and viruses. The main sources of microorganisms in the air include soil, water and the decomposition of organic matter, while anthropogenic sources are represented by landfills, wastewater treatment plants, composting facilities and traffic. Microorganism populations in the air can be seasonal or relatively constant, but the most frequent increase in their occurrence is recorded in the summer and autumn. Studies show that humidity, the presence of carbon monoxide and ozone concentrations are the main factors affecting the diversity of bacteria and the percentage of pathogenic bacteria present in outdoor air. Microorganisms in the air inside residential buildings are primarily concentrated on dust particles. Approximately 60% of dust microbiota are spores of mould fungi. The key emitters of microorganisms into the atmosphere are municipal wastewater treatment plants. The bacteria and pathogens released are potentially resistant to antibiotics, rendering the bioaerosols of wastewater treatment plants a possible hazard to human health. There is a need for further research aimed at explaining the magnitude of impacts of air microorganisms on human health.

1. Introduction. 2. Sources, transport and factors affecting the presence of microorganisms in the outdoor air. 3. Microorganisms in the air inside residential buildings. 4. Microorganisms in indoor air in offices and public spaces. 5. Microorganisms in the air of industrial facilities. 6. Bioaerosols within sewage treatment plants. 7. Air microorganisms as an important factor influencing human health. 8. Conclusions

MIKROORGANIZMY JAKO BIOLOGICZNE ZANIECZYSZCZENIA WEWNĘTRZNEGO I ZEWNĘTRZNEGO POWIETRZA

Streszczenie: Zanieczyszczenia powietrza stanowią jedno z głównych zagrożeń dla zdrowia człowieka. Zanieczyszczenia biologiczne powietrza to w głównej mierze pyłki roślin, grzyby, bakterie oraz wirusy występujące w powietrzu jako tzw. bioaerozole biologiczne. Do głównych źródeł zanieczyszczeń mikrobiologicznych powietrza należą źródła naturalne, takie jak gleba, woda czy rozkład materii organicznej, a do źródeł antropogenicznych składowiska odpadów, oczyszczalnie ścieków, kompostownie, a także ruch uliczny. Pojawiające się w powietrzu populacje mikroorganizmów mogą mieć charakter zarówno sezonowy, jak również całoroczny, jednakże najczęściej, wyraźne nasilenie narażenia ich występowania następuje w okresie letnim i jesiennym. Badania wskazują, że wilgotność, obecność tlenku węgla i stężenie ozonu są głównymi czynnikami, wpływającymi na różnorodność bakterii i odsetek występujących tam bakterii chorobotwórczych w powietrzu zewnętrznym. Mikroorganizmy w powietrzu wewnątrz budynków mieszkalnych znajdują się przede wszystkim w kurzu. Jak wykazano, około 60% mikrobioty kurzu stanowią zarodniki grzybów pleśniowych. Do istotnych emiterów drobnoustrojów do powietrza atmosferycznego należą oczyszczalnie ścieków komunalnych. Obecność uwolnionych bakterii i patogenów opornych na antybiotyki w oczyszczalni ścieków sprawia, że bioaerozole oczyszczalni stanowią potencjalne ryzyko zdrowotne. Koniecznością staje się prowadzenie kontroli oraz stałe monitorowanie jakości powietrza, zarówno w pomieszczeniach zamkniętych, jak i przestrzeniach otwartych, pod względem występujących w nim mikroorganizmów, szczególnie w odniesieniu do ich wpływu na zdrowie człowieka. Ponadto istnieje potrzeba dalszych badań, dla wyjaśnienia roli mikroorganizmów przenoszonych przez powietrze i ich wpływu na zdrowie człowieka.

1. Wprowadzenie. 2. Źródła, transport i czynniki wpływające na obecność mikroorganizmów w powietrzu zewnętrznym. 3. Mikroorganizmy w powietrzu budynków mieszkalnych. 4. Mikroorganizmy w wewnętrznym powietrzu biur i innych obiektów przestrzeni publicznej. 5. Mikroorganizmy w powietrzu zakładów przemysłowych. 6. Bioaerozole w obrębie oczyszczalni ścieków. 7. Mikroorganizmy w powietrzu jako istotny czynnik wpływający na zdrowie człowieka. 8. Wnioski

Key words: air, bacteria, health, human, microorganisms
Słowa kluczowe: bakterie, człowiek, mikroorganizmy, powietrze, zdrowie

1. Introduction

Atmospheric air, including indoor air, is a basic factor affecting the proper functioning of the human body. Air pollution constitutes one of the main threats to the environments in which people live. World Health Organization (WHO) and European Environment Agency (EEA) report that environmental risks such as air or water pollution have a significant impact on human health [26, 108]. Air pollution includes all substances in the Earth's atmosphere that are not natural components, as well as natural substances in significantly

* Corresponding author: Sylwia Siebielec, Department of Agricultural Microbiology, Institute of Soil Science and Plant Cultivation – State Research Institute, Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, Poland; tel.: +48-81-4786952; e-mail: ssiebielec@iung.pulawy.pl

increased quantities. The Earth's atmosphere is composed of gases and vapours of chemical compounds, acid rain, airborne ashes, dust, trace elements and biological contaminants [26].

Biological air pollutants, also known as bioaerosols, include pollen, fungi, bacteria and viruses [5]. Most are microorganisms that colonise the soil, water bodies, plant surfaces, rocks and buildings [85]. The components of the bioaerosol that make up the dispersed phase are particles ranging in size from 1 to 200 μm. For example, single bacterial cells with dimensions of 0.5–2.0 μm can constitute *Bacillus* sp. or *Pseudomonas* sp. In turn, many spores of mould are sized between 3.0 and 17 μm [71]. In addition, bacterial toxins, mycotoxins, enzymes and fragments of plant and animal tissues are present in the air [18]. Bioaerosols ranging from 1.0–5.0 μm usually float in the air, while larger ones tend to settle on surfaces [97]. The greatest implications to human health has so called respirable bioaerosol, which is defined as fraction smaller than 7 μm. This fraction can penetrate the human respiratory tract with the inhaled air. The smallest particles can even reach pulmonary brioncholes [18]. Larger particles of bioaerosols tend to deposit in the upper airways [22].

Microorganisms are found in virtually every environment, including at extreme temperatures, pressures, salinity and acidity. The atmosphere has been described as one of the last biological limits on Earth. The composition and biodiversity of the microbial community in the atmosphere is still poorly researched [85]. Interestingly, bacteria and fungi have been detected in various atmospheric layers, such as the boundary layer (up to 1.5 km high), the upper troposphere (up to 12 km high) and even the stratosphere at an altitude of over 20 km above sea level [35, 105]. In addition, the fungi *Penicillium notatum* have been collected at an altitude of 77 km, and *Micrococcus albus* and *Mycobacterium luteum* bacteria at an altitude of 70 km [44]. The movement of airborne microorganisms at different distances and through wind and precipitation means that they can spread in all ecosystems. Some may be pathogens or transmit allergens and consequently endanger the health of the population [36].

As we know, one of the main factors influencing human health is air quality. Therefore, the presence of microorganisms, in particular those causing infectious diseases, in both ambient air and indoor environments can be particularly dangerous. Scientists have demonstrated that most often, microorganisms living in the air are responsible for irregularities in the immune system, such as allergies and infections [23, 31, 41, 50]. WHO alerts that the exposure to mould and other dampness-related microbial agents increases the risks of hypersensitivity pneumonitis, allergic alveolitis or chronic rhinosinusitis which is supported by *in vivo* and *in vitro* studies [107]. In addition, as Cabral [14] claim, the number of microorganisms present in the air as well as indoors is one of the main indicators of air pollution. It should also be noted that a threat is posed not only by the presence of pathogenic microorganisms or toxins of microbiological origin in the air, but also by an excess of saprophytic microorganisms, especially when their composition is quite undifferentiated and dominated by microorganisms belonging to a single species [14, 23, 31, 41, 107].

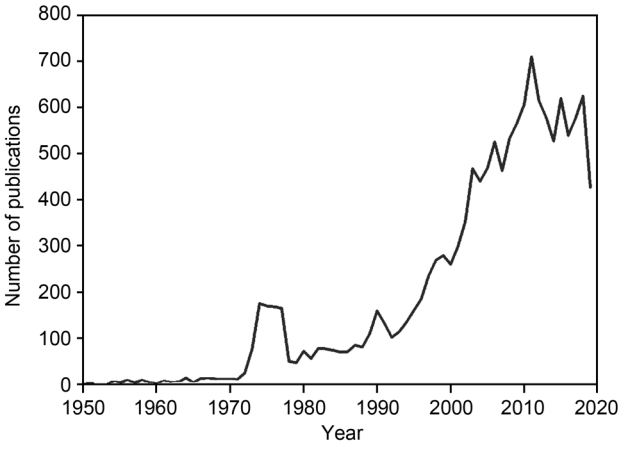


Fig. 1. Yearly number of scientific publications with keywords 'air' and 'microorganism' in the Scopus database – state for 13 Sept. 2019

Information on the presence of microorganisms in the air remains incomplete and numerous questions still need to be answered. The recent report of European Environment Agency (EEA) [26] describes sources and types of air pollution along with the potential health and ecosystem impacts, however it does not refer to biological agents in the air. Research on microorganisms in air have emerged only recently as documented by number of scientific publication. Figure 1 presents number of scientific papers in the Scopus database having 'microorganism' and 'air' as keywords. They are scattered within various research domains with environmental science, medicine, immunology and biochemistry subjects most often represented (Fig. 2).

The goal of this article was to provide recent information on presence of microorganisms in outdoor and indoor air, across residential, industrial and public spaces, with implications to human health.

2. Sources, transport and factors affecting the presence of microorganisms in the outdoor air

Viruses, cells or fragments of bacterial cells, as well as fragments of mycelium and fungal spores and protozoa are found in atmospheric air [5, 34]. The composition of atmospheric air in microbiological terms has become the subject of considerable research. The

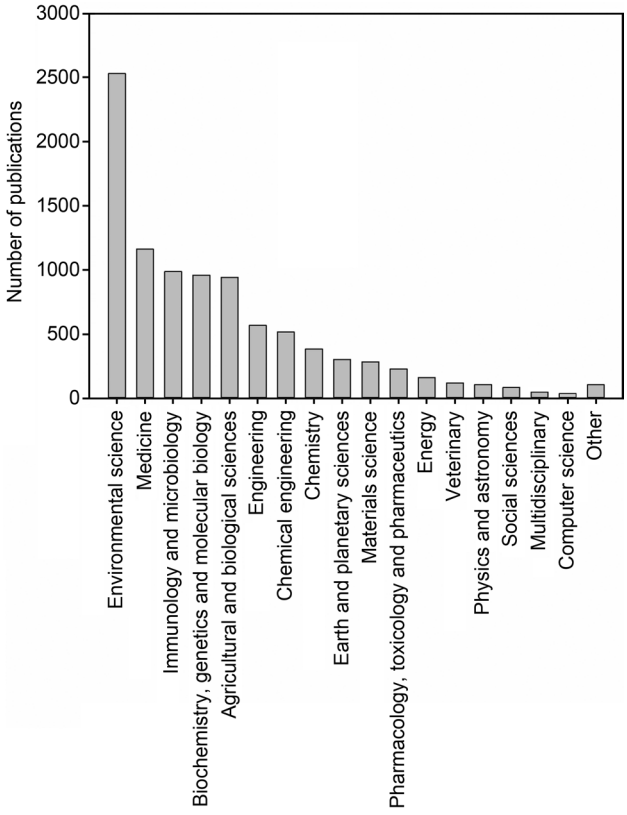


Fig. 2. Number of scientific publications with keywords 'air' and 'microorganism' as recorded in the Scopus database (date 13 Sept. 2019) across research subjects

main sources of microbiological air pollution include natural sources such as the soil, water, and plant surface contamination, including microorganisms transmitted by gusts of wind, dust in rain drops or insects. In turn, anthropogenic sources include various types of landfill, sewage treatment plants, composting plants and traffic. It should be mentioned that the microbiological composition of the atmosphere is significantly influenced not only by the source, but also by the volume of emissions, the distance from places of increased emissions, the type and survival of microorganisms, their spread and climatic conditions [11, 14, 31, 38, 90].

In addition, it is important to note that the main source of air pollution is human activity, including the transport. Humans also contribute to the production of biological aerosols through sneezing, coughing or physical exertion by introducing significant amounts of microorganisms into the atmosphere [33]. Further potential sources of microorganisms include domestic activities such as cooking or vacuuming as well as domestic objects like carpets. They can release spores of fungi of the genera *Alternaria* or *Cladosporium*. The soil of potted plants grown in apartments can also be a source of increased concentrations of fungal spores, for example from the genus *Aspergillus*. Sources of bioareozoles include rooms with high levels of humidity, which can also promote the development and subsequent spread of mould. Cellars, bathrooms and holiday cottages are all extremely attractive places for fungi to rapidly develop. Moreover, dust in places of everyday use can encourage fungi's development [40, 95]. Zyska [115] reports that fungal spores in the domestic environment constitute between 5 and 20% of household dust. Aquariums may also be a potential source of bioaerosols [82], as water fungi live on fish excrements, food remains or dead fish. Furthermore, some species of bacteria have learnt to function on the skin, gills and digestive tract of fish [1]. Mbareche *et al.* [70] reported the broad range of fungi pathogens including many known genera like *Aspergillus*, *Acremonium*, *Alternaria* and *Fusarium* in bioaerosols within dairy farms in Eastern Canada.

Recently, biological air pollution inside buildings has attracted growing attention of researchers. According to the literature, biological matter scattered in the air, such as microorganisms, their products, fragments of plants and animals directly connected with fine solid particles or droplets of liquid can constitute from 5 to approximately 34% of all contaminants present in the internal air [71, 30]. Overall assessment of the concentration of bioaerosols is very difficult, depending on numerous indicators that have a direct or indirect impact on general airborne microorganisms [15, 61].

Scientific research conducted over the years has rendered to link exposure to bioaerosols with the occurrence of adverse health effects, including infectious diseases, acute toxic effects, allergies and cancers [7–9, 23, 32, 97, 106].

According to literature data, in addition to harmful effects on health, bioaerosols can play an important role in the development, evolution and dynamics of ecosystems and atmospheric processes. Airborne bacteria, fungal spores and other bio-particles play a key role in the reproduction and spread of organisms, such as the long-range transportation of pollen over long distances and across geographical barriers. Furthermore, the dispersion of plant, animal and human pathogens can have serious consequences for agriculture and public health. Bioaerosols are therefore very important for the spread of organisms, allowing the exchange of genetic material in different habitats and latitudes [28]. Desert sandstorms have been shown to constitute an important source and the most efficient transport mechanism for bioaerosols, enabling the spread of microorganisms over distances greater than 5,000 km [54]. Therefore, an increasing number of studies are seeking to characterise the temporal and spatial variability of bioaerosols and their interactions with human health and air pollution.

Liu *et al.* [67] conducted an air quality study on the total number of bacteria and pathogenic bacteria. Air samples containing dust with different particle size and index values (relative humidity, carbon monoxide,

ozone concentration) of different quality were collected in Hangzhou (China) and then 16S rRNA sequencing was applied to classify the bacteria present. The study revealed that at the genus level, *Thiobacillus*, *Methylobacterium*, *Rubellimicrobium* and *Paracoccus*, all belonging to *Proteobacteria*, were the most abundant: with average relative abundances of 2.6%, 2.5%, 1.8% and 1.7% of the total community, respectively. The most dominant pathogenic bacteria genera in the airborne particulate matter (PM) samples were: *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter* and *Klebsiella* [67]. Their research demonstrated that humidity, carbon monoxide presence and ozone concentration were the main factors influencing the diversity of airborne bacteria and the percentage of pathogenic bacteria. Similar observations were made by Tsai and Liu [102], whose analyses showed that the air humidity index is an extremely important factor for the development of microorganisms. Analysis of the state of air pollution with PM dust of various diameters while considering the chemical state (relative humidity, carbon monoxide, ozone concentration) allowed the researchers to state that in the PM2.5 and PM10 samples (PM2.5 with particle diameters up to 2.5 μm and PM10 with particle diameters up to 10 μm), the relative abundance of pathogenic bacteria was greatest in heavy and medium air pollution, respectively [67].

As mentioned above, high concentrations of airborne particulate pollutants are one of the main environmental factors that have a harmful impact on the health of the population. Hwang *et al.* [43] conducted research on airborne concentrations in ambient air, dust and bacteria at day care facilities in Seoul (South Korea) in the context of indoor environmental factors. Room tests were carried out for temperature and relative humidity, PM10 dust in rooms with two or more windows, and PM10 dust concentration in heating, ventilation and air-conditioning systems. The aim of this study was to measure concentrations of PM10 and bacteria in the air in order to determine how they correlated with a specific indoor environment. The research demonstrated that certain meteorological factors are strongly related to the structure and diversity of pathogenic bacteria. The bacterial count was significantly higher in day care rooms, as they only had one window and solely relied on window ventilation. In addition, a correlation between relative air humidity and the number of bacteria was observed. In turn, Fröhlich-Nowoisky *et al.* [28] have stated that relative humidity affects the number of fungi occurring in an environment to a greater extent than temperature. Moreover, the bacterial level in ventilated areas is lower than in areas without ventilation systems [102].

As shown by Zhen *et al.* [113], meteorological factors have a greater impact on airborne bacteria than air pollution. During their study in Beijing (China), the authors analysed the relationship between the total number of bacteria in the atmospheric air and the structure of their population and weather factors. The examined factors included air temperature and humidity, wind speed, atmospheric pressure and the level of air pollution, expressed by indicators such as concentration of PM, ozone, oxides of sulphur and nitrogen as well as carbon monoxide. The factors exerting the greatest influence were atmospheric pressure (in winter), air temperature and relative humidity (in spring and summer) and water vapour pressure in the air (in autumn). Moreover, meteorological factors explained changes in the structure of the bacterial community to a greater extent than air pollution.

Xie *et al.* [110] have characterised the microorganisms present in the air of different levels of quality. Air samples were collected in Xi'an (China) from April 2016 to February 2017. The abundance of all microorganisms in the air, showed significant seasonal variations. In addition, the average bacterial content in the air on foggy days was much higher than on days without fog. Interestingly, the amount of bacteria in the air in the first period of research increased, before slightly decreasing with a deterioration in air quality. The largest number of microorganisms was observed at a moderate level of air pollution. In addition, it was noted that snowfall can improve air quality by reducing number of bacteria.

The movement of dust particles, microorganisms and other contaminants over long distances is caused by the movement of the air. Research on the quantity and species composition of airborne microorganisms is a key factor in explaining the ways in which they spread and interact [10, 54, 88]. Previous literature has confirmed that some bacteria (e.g. from the genus *Bacillus*) and most of fungi have endospores or latent forms. The resting form enables organisms to survive in adverse conditions (drought, low temperatures and nutrient deficiencies) [79]. In addition, it has been shown that many bacteria isolated from the air exhibit intense colouration associated with high pigment content involved in protecting the microorganisms from ultraviolet radiation [29, 53, 100]. In addition, microorganisms, pollen or mineral dust particles are removed from the atmosphere by natural physical phenomena such as mutual attraction [65, 66, 103].

Rajasekar and Balasubramanian [86] focused their research on the occurrence and structure of microbial populations in different places, depending on the prevailing conditions: temperature, relative humidity, population density, location (indoor/outdoor) and the presence of air conditioning. They showed that bacteria constituted 50.5% and fungi 49.5% of bioaerosol composition in the internal environment, while in the external environment they constituted 20.6%

on average, while the proportion of fungi was 79.4%. Moreover, they noted that population density is a factor that significantly affects the concentration of bacteria in the air. It should be noted that in the case of indoor air samples, measurements were taken at two points in each location, i.e. the bedroom, kitchen, toilet or work area. At these points, air samples were taken from a height of about 1 m above floor level. However, in the case of outdoor air, samples were taken from outside the place of residence at a height of 1.5 m. The authors summarised that the type of ventilation and activities performed in different places in the household may affect the level of biological pollutants in the air. Furthermore, the results of this study suggest that the cycle of replacement of used air with fresh air from outside and the types of human activities carried out in the outside environment represent important factors. The ventilation system should be continuous and efficient, reflected in its impacts on levels of endotoxins in the air and airborne microorganisms.

The speed of multiplication, resistance to adverse environmental conditions and differentiation of preferences as to environmental conditions allow for the spread of these bacteria in the environment. Hara and Zhang [39] conducted a study on the presence of airborne Asian dustborne bacteria in southwest Japan. Aerosol particles were collected in the form of dust on the campus of the University of Kumamoto in both high and low concentrations. The results of the study indicated that the total concentrations of bacterial cells in the dust were higher in the dusty air. In addition, it was found that dead bacterial cells were superior to dead bacterial cells in dust, but the concentrations of living bacterial cells were comparable or higher than in non-dusty air. Bacterial cells transported with airborne dust can be exposed to many adverse factors, including changes in the weather such as temperature and humidity, atmospheric pressure, wind speed and direction as well as solar radiation intensity. It should be noted that the presence of living bacterial cells may be dispersed over long distances [89].

3. Microorganisms in the air inside residential buildings

In residential buildings, biological factors in direct contact with humans may affect the human health. Due to the time spent in residential or office buildings (approximately 90 percent of time is spent by human in closed rooms) [109], indoor air quality has a greater impact on people's well-being and health than does outdoor air quality. The construction techniques of the 21st century, such as the installation of air-tight windows or ventilation systems, are causes of increased biological pollution. In addition, these pollutants can come both from inside residential buildings and from outside, flowing directly through chimneys, open windows, cracks or other leaks [56].

Nabrdalik i Latała [78] undertook research aimed at the quantitative and qualitative characterisation of fungi present in building structures. They demonstrated that it is necessary to develop test methods and criteria to assess the degree of air pollution in residential buildings due to the presence of potentially harmful fungi in the analysed objects. Excessive humidity, poor ventilation and insufficient insulation are reasons for the excessive development of filamentous fungi [107].

Microorganisms in the air inside residential buildings are mainly found in dust, which has become an increasingly frequent subject of research aimed at assessing the quality of indoor air. Dust is primarily characterised by the presence of organic compounds, trace elements and metabolites of mites, responsible for many hypersensitivity reactions in the form of allergies [75]. It has been shown that about 60% of dust microbiota are spores of mould fungi of the genera: *Alternaria, Aspergillus, Cladosporium, Fusarium, Mucor*, *Penicillium* and *Rhizopus*. On the other hand, bacteria constitute about 1 to 25% of microbiota, and about half of the bacterial population are *Micrococcus* spp. Moreover, staphylococci, rods and aerobic spore-forming bacteria from the genus *Bacillus* are quite common. Yeast, in turn, is represented by species of the genera *Rhodotorula* and *Candida* [16, 46, 104].

Staszowska [96] conducted research on dust samples from dwellings and educational institutions from a microbiological perspective. Samples were collected from various objects in Lublin (Poland). Dust samples were collected from places such as the floor (carpet) and from shelves with books from a height of 1 m. The most common bacteria were Gram-positive *Bacillus* spp. In dust samples from educational institutions, *B. subtillis* was characterised by the highest concentration. The second largest recognised group was Gram-positive bacteria, with *Micrococcus* sp. predominating, especially the *M. luteus*. Among fungi the dominant genera were *Aspergillus* (especially *A. nigeri*) and *Penicillium*. Fungi of the genus *Cladosporium* were also found.

Other authors have also demonstrated the presence of *Penicillium* sp. and *Aspergillus* sp. Fungi, as well as Gram-positive and Gram-negative bacteria, with the aim of assessing the effect of selected factors on the presence of microorganisms in the dust and the relationship between their presence indoors and human respiratory health. Significant dependence of concentration of microorganisms on humidity in rooms and presence of animals was shown. Both factors affect the functioning of the respiratory system, including the appearance of asthma [99]. Li *et al.* [63] have highlighted

the greater presence of fungi in bathrooms than in bedrooms whereas Buttner and Stezenbach [13] have similarly noted that the number of fungi in living rooms are higher than in bedrooms, which may be associated with the greater activity of people in the former.

Al-Hunaiti *et al.* [3] studied bacteria and fungi in floor dust in residential buildings and education rooms. Dust samples were taken from closed rooms in Amman (Jordan). Genetic identification of selected fungal and bacterial groups and chemical analysis of dust were undertaken. Concentrations of bacteria and fungi were directly correlated with those of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). The lowest concentrations of bacteria and fungi were found in the apartment that was the least used. The concentration of Gram-positive bacteria in the educational building was found to be lower than that observed in the living quarters. Gram-positive bacteria showed a positive correlation with phenanthrene concentration, while Gram-negative bacteria showed a positive correlation with fluoranthene and pyrene concentration. The content of fungi of the genera *Penicillium* and *Aspergillus* was moderately or strongly negatively correlated with concentrations of such hydrocarbons as anthracene, fluoranthene, benzo (b) fluoranthene and benzo (j) fluoranthene. The total number of fungi showed negative correlations with the concentration of anthracene, benzo (a) anthracene and dibenzo (a-h) anthracene. This means that there may be a high risk of exposure to the appearance of metabolites of aromatic hydrocarbons, which are carcinogens, in these rooms. The results obtained undoubtedly necessitate further study on the biodegradation of PAHs in house dust and on the presence of potentially health hazardous metabolites of PAHs, including a whole range of measurements with chemical and biological analysis of floor dust contamination and its occurrence in confined spaces.

4. Microorganisms in indoor air in office and public spaces

In enclosed spaces with a fairly high density of people, the number of microorganisms is much higher than in open spaces. The air inside buildings is richer in various microorganisms, including pathogenic microorganisms. Humans constitute a source of indoor bacteria. Bacteria are emitted from the human respiratory airways through talking, coughing or sneezing. They also get into the air with skin scales. Therefore the level of air contamination with bacteria is dependent on the number of people inside a room and efficiency of ventilation system [73]. Kubera *et al.* [60] carried out microbiological air quality tests in selected kindergartens. Air samples were collected in classrooms, both in the morning and in the afternoon. Samples collected outside the kindergartens were a control sample and the quality of indoor air was assessed according to Polish standards (PN-Z-04111-01:1989; PN-Z-04111-02:1989; PN-Z-04111-03:1989) based on groups of indicator microorganisms. Regardless of the research method applied, the total number of heterotrophic bacteria and staphylococci in the air exceeded the permissible values, although no excessive contamination with mould fungi was found. These studies suggest that air sanitation should be controlled with particular regard to biological agents that may directly or indirectly affect the health of indoor residents.

In the course of studies carried out in offices and laboratories, 20 different species of bacteria have been detected, belonging to genera such as *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Shigella*, *Escherichia*, *Moraxella*, *Paenibacillus*. Several genera of fungi have been also detected, including: *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus* and *Cladosporium* [114].

The results of biological research of air pollution in office buildings in Warsaw (Poland) equipped with or without air conditioning systems were presented by the team of the Central Institute for Labour Protection – National Research Institute [33]. Two genus of fungi predominated: *Penicillium* and *Aspergillus*. Such presence did not exceed the acceptable standards proposed by a panel of experts on the factors of recommended concentrations of microorganisms and endotoxins in indoor air. More concerning, however, was that the presence of fungi belonging to the risk group responsible for the occurrence of adverse health conditions for workers was found. In this group there were, among others, *Streptococcus viridans*, *Candida* spp., *C. glabrata, A. fumigatus*, *A. flavus* and *A. niger*. These fungi are classified as allergenic and toxic factors and cause infectious and invasive diseases. Research conducted in the 1980s by Morey *et al.* [76] demonstrated that the ventilation system affects the composition and concentration of bioaerosols in offices. Warm and dry conditions favour the passive dispersion of fungal spores such as *Cladosporium* sp. Spores in dry air conditions are mostly blown naturally by the air, and their concentrations are higher in places without a ventilation system.

Xu and Hao [111] reviewed the available literature on air quality in public metro spaces. Their data show that air quality in subways is particularly alarming. Airborne particles, aromatic hydrocarbons and airborne bacteria are classified as major air pollutants within metro systems. Despite the fact that metro passengers usually spend only a dozen or so minutes there, they are exposed to pollution emitted from various sources as well as directly from metro passengers. The harmfulness of the underground internal microenvironment

is associated with the exposure time resulting from its frequent and even daily use [55].

Subway air quality was also the subject of research by Robertson *et al.* [87], who determined the composition and diversity of microorganisms in bioaerosol samples in the New York metro. Their analyses showed the presence of various genera and species of microorganisms, characteristic of the soil and water environment and inhabiting the human body, including those occurring mainly on the skin. Among these latter microorganisms, 99% identity of the rRNA sequence with such species as *Staphylococcus* spp., *S. epidermidis* (the most abundant group of bacteria colonising the human skin surface, contributing to its protection against pathogen penetration) and *S. hominis*, *S. cohnii*, *S. caprae* and *S. haemolyticus* were found. The authors did not produce results regarding the presence of microorganisms that pose a threat to public health.

5. Microorganisms in the air of industrial facilities

Perez-Martin *et al.* [84] measured the abundance of lactic acid bacteria and yeasts in the air and wine produced in vineyards in order to assess the potential for microbial migration. Samples were taken from a vineyard in Castilla-La Mancha (Spain). The sampling period was as follows: air and wine samples were collected in September and November 2011 and September and October 2012. The *Leuconostoc mesenteroides* species was the most common lactic acid bacteria in the air, while the *Oenococcus oeni* species dominated in wine. *Saccharomyces cerevisiae* was the most frequently isolated yeast species in both air and wine. Furthermore, the presence of the same microorganisms in samples from the vineyard's air as well as in the wines themselves has confirmed that the transfer of microorganisms between the two environments is possible.

Tsai and Liu [102] conducted a study on workers' exposure to bioaerosols at a pasta plant in central Taiwan. The biological risks associated with pasta production had not previously been studied. The aim of the study was to characterise the biological composition and concentrations of bioaerosols at different locations in the pasta factory over a period of one year, as well as to investigate the impact of various environmental factors on the concentration of bioaerosols. Air samples were collected twice daily. Nine species of fungi were identified in the air and strains from the genera *Cladosporium*, *Penicillium* and *Aspergillus*, commonly regarded as fungi that cause allergic reactions, were the dominant fungi isolates in indoor and outdoor air samples. *Micrococcus* spp. and *S. xylosus* predominated among isolated strains of bacteria. In addition, significant seasonal differences were observed for most fungi, except for the genus *Fusarium*. The number of fungi of the genera *Aspergillus* and *Rhizopus* differed significantly during two sampling times (morning, afternoon), as did the levels of *Micrococcus* spp. and *S. arlettae*. It was found that the concentration of bacteria was higher in the morning; similar results have been obtained in other studies [27, 60, 65]. These results were important for the exposure assessment of workers. Due to the findings, increased ventilation was recommended to improve sanitation. Although study of Hwang [43] demonstrated the need for further detailed studies, especially regarding the relationship between the composition of bioaerosols and the possibility of allergic reactions.

Czerwińska and Piotrowski [20] conducted a risk assessment of microbiological contamination in a bakery in Koszalin (Poland). Microbiological analyses of the air were carried out in the warehouse, production hall and the room where the bread was stored in order to cool it down. Their results demonstrated that air pollution in the bakery area was negligible, with the most frequently appearing microorganisms being bacteria of *Bacillus* genus. Microbiological analyses of the presence of fungi indicated a fairly large variation in the occurrence of these microorganisms depending on the season (December – 1st term, March –X 2nd term). Analyses performed in the first term indicated contamination with these microorganisms, while in the second term the number of isolated fungi did not arouse any objections.

In 2016, a paper on bacterial and fungal aerosol concentration in the air in the production halls of a meat plant was published [11]. In the examined air the following indicators were determined: total number of bacteria and fungi, as well as *E. coli* and bacteria from genus *Listeria*. The studies showed that the presence of bacterial and fungal aerosols may potentially be a source of indirect microbiological contamination. The dominant fungi were *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp. and *Cladosporium* sp. The presence of *E. coli* and *Listeria* spp. was also found. Moreover, genetic identification confirmed the presence of *L. monocytogenes*.

6. Bioaerosols within the sewage treatment plants

As previous research has shown, municipal sewage treatment plants are significant emitters of microorganisms to atmospheric air. The presence of microorganisms in wastewater entering the air together with the droplets of wastewater that are formed during mixing and aeration creates a certain pathogenic risk. Breza-Boruta *et al.* [12] reported the sewage treatment plant originated pathogens in air samples collected 150 m from the plant border. However, it should be remembered

that not every treatment plant poses a risk to the environment [12, 47, 51, 52]. Paśmionka *et al.* [81] conducted research on microbiological atmospheric air pollution in the area of the Group Wastewater Treatment Plant in Chrzanów (Poland). The plant was identified as a potential cause of an increase in the number of microorganisms present in the air and of a localised deterioration in the sanitary conditions within the plant. Relationships between the number of microorganisms in the air and weather conditions were observed. The number of fungi in the air did not exceed the permitted values according to Polish standards (PN-Z-04111/02,1989; PN-Z-04111/03,1989). It should be noted, however, that the results attained indicated the existence of bioaerosols within the sewage treatment plant, which may adversely affect the state of the air and consequently pose a potential health hazard.

Of particular concern are pharmaceutical wastewater treatment plants, which have been identified as important reservoirs and sources of emissions to the natural environment of bacteria resistant to antibiotics [112]. Moreover, antibiotic-resistant microorganisms migrate within and around wastewater treatment plants in the form of biological aerosols, mainly produced by aeration equipment, which is the main reason for the release of bioaerosols in wastewater treatment plants [42, 57, 91].

According to Zhang *et al.* [112], pharmaceutical wastewater treatment plants are potential locations for concentrations of pathogenic bacteria resistant to antibiotics, which can be transferred to the natural environment. Analyses have shown that almost half (45%) of the bacteria floating in the air within the pharmaceutical wastewater treatment plant studied were resistant to three or more antibiotics. Some pathogenic strains were resistant to up to 16 different antibiotics. This fact proves that wastewater treatment plants are an important source of antibiotic-resistant bacteria. The dominant genera of such bacteria isolated from all bioaerosol samples are: *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Pseudomonas* and *Sphingomonas*. Previous research has indicated that measurements of bioaerosol emissions in pharmaceutical wastewater treatment plants are required, while sites inside and around wastewater treatment plants should be constantly monitored.

The presence of released antibiotic-resistant bacteria and pathogens in sewage treatment plants renders the bioaerosols of such plants a potential health risk. Despite new reports, there remains little systematic research regarding the exact composition, possible health consequences and resistance to antibiotics of pathogenic bacteria found in bioaerosols from sewage treatment plants. Existing studies primarily focus on the antibiotic resistance of pathogenic Gram-negative bacteria [4, 21, 37, 58, 59].

Gram-negative bacteria usually constitute a small proportion of the bacteria present in bioaerosols. It should also be remembered that pathogenic bacteria living in bioaerosols function in conditions that are not always favourable to them, affecting their survival. The air represents a challenging environment for such microorganisms. Variable meteorological conditions, such as sunlight and humidity, can inhibit their growth and even kill them [2, 59].

Korzeniewska *et al.* [58] conducted research on bacteriological atmospheric pollution in the area and surroundings of a mechanical-biological municipal sewage treatment plant, including sewage from the dairy industry. The study recognised a number of heterotrophic, psychrophilic, psychrotrophic and mesophilic bacteria as well as selected physiological groups of *Enterobacteriaceae* family, *Staphylococcus* and *Enterococcus* genera, *P. fluorescens* and *P. aeruginosa*, haemolytic bacteria and *Actinomycetes*. Significant differences were found in the number of groups of tested microorganisms depending on the season and the method of air sampling applied (sedimentation and collision method) at six sites located in the area of the treatment plant as well as five sites located in its vicinity. The exceptions were psychrophilic bacteria and *Enterobacteriaceae* family bacteria, in which no significant variability was found. The highest average numbers of microbial groups selected for the study were observed in air samples collected via the sedimentation method, especially in the autumn (with the exception of *Actinomycetes*, whose maximum numbers were seen in spring). The lowest average numbers were observed in winter and/or summer. In addition, it was shown that the concentration of bacteria in the air collected at various sites located in the area of sewage treatment plants differed. Higher bacterial numbers were observed in the following areas: sandstone, phosphate chamber, nitrification and denitrification chambers and secondary settling tank. In general, air in both the area and the surrounding environment of mechanical-biological sewage treatment plants was classified as slightly polluted, whereas in the spring and autumn there were more psychrophilic, psychrotrophic and mesophilic bacteria.

Korzeniewska *et al.* [57] determined the microbiological composition of air in a sewage treatment plant with a closed bioreactor. The air samples showed the presence of heterotrophic, psychrophilic, psychrotrophic, mesophilic and hemolytic bacteria, *Enterobacteriaceae* family bacteria and *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* genera, as well as colonies of *Actinomycetes*. The presence of fungi, including moulds, yeasts and yeast-like fungi was also demonstrated. The largest concentrations of microorganisms were detected in air collected in and near the bioreactor itself, as well as near the truss. The authors demonstrated that the presence

and diversity of *Enterobacteriaceae* family (including *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *E. coli, K. pneumoniae* and *K. ozaenae*) in or near the bioreactor may potentially affect the health of people working with and staying by the bioreactor for an extended period of time.

Seasonal changes in the number of bacteria occurring in the air within sewage treatment plants are mainly observed in the summer, when higher emissions are recorded due in particular to lower precipitation. Szyłak-Szydłowski *et al.* [98] carried out bioaerosol studies at a plant in different seasons of the year, collecting air samples using different technological processes at the plant. The most intensive emissions of microorganisms to the air were recorded in the summer, while among the technological processes, the highest concentrations of bacteria were generated by the primary settling tank and the sludge tank. Among the microorganisms isolated from the air, the presence of heterotrophic bacteria, mesophilic bacteria and coliforms was found.

7. Air microorganisms as an important factor influencing human health

At present, awareness is growing with regard to external and internal air pollution, as evidenced among others by recent studies on the influence of air quality on the prenatal and postnatal development of children [17, 19, 98, 101]. One example is a study by Shehab and Pope [93], which demonstrates the relationship between air quality and human cognitive performance. Air quality was assessed through annual average levels of nitrogen dioxide and indoor air by means of data on humidity and exposure to secondhand smoke. In terms of biological air quality, studies show that exposure to microorganisms and their derivatives (endotoxins, mycotoxins) in early childhood has a significant impact on the development of the immune system and the emergence of allergies, asthma and atopy [64, 77, 92]. Based on epidemiological data, it has been found that children living in rural areas on a farm are much less likely to develop allergies and asthma than are children raised in the same rural area but without exposure to farming environment [25].

Air is often considered an important carrier of bacterial pathogens such as *S. pneumoniae*, *S. pyogenes, Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *Mycobacteriaceae* family. In order to ascertain the source of the presence of these health-endangering pathogens in the air, it is important to identify the environment in which they live and reproduce. For more information on their ability to exist in the air and to spread, continuous monitoring and proper control are required. Undoubtedly, the occurrence of pathogenic bacteria in the air is characterised by seasonality. For example, meningococcal foci have been found throughout sub-Saharan Africa, where climatic conditions with strong droughts and sandstorms ending with the rainy season contribute to the occurrence of these life-threatening bacteria, which can cause dangerous invasive diseases [74, 94].

Numerous studies have shown that bioaerosols in the air may be potential causes of bodily dysfunctions. Airborne microorganisms, especially bacteria and fungi, can cause inter alia asthma, hay fever, bronchitis, chronic lung failure, lung cancer, cardiovascular diseases, gastrointestinal tract infections, tuberculosis, allergic reactions, sinus and conjunctivitis and acute viral infections [45, 62, 69]. As many as 80 types of fungi can cause respiratory allergies, and as many as 100 types of fungi can cause severe infections not only in humans and animals, but also in plants. These include fungi-representing genera such as *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium* [48].

Aside from pathogenic microorganisms in the air, attention should be paid to their biologically active products, such as endotoxins (toxins occurring in the outer membrane of Gram-negative bacteria) or mycotoxins (secondary metabolic products of mould fungi, which can also have a significant impact on human health). Airborne biological agents are becoming important issues for human safety and health [24, 68].

Pastuszka *et al.* [83] performed a study to determine the concentrations of bacterial and fungal bioaerosols in different types of buildings and to determine the risk of specific diseases that they can cause. They showed that in buildings with mould problems there was a risk of asthma symptoms. This risk most likely increased through the inhalation of fungal particles and other airborne compounds. In houses without mould, the relative concentration of the observed species, including *Penicillium* spp., ranged from 3 to about 50% of the fungal population, while in houses with mould, the highest concentration of *Penicillium* spp. was found in 90% of all fungi.

Biological factors are one of the main causes of the so-called "sick building syndrome" (SBS). The term is used to describe a situation in which residents of a given building experience health problems and a range of symptoms such as e.g. skin rashes, headache, itchy eyes, throat irritation, dry skin, rashes, dry cough, hoarseness of voice, asthma attacks and other. It is assumed that biological pollutants such as viruses, bacteria, dust, pollen, toxic black mold, insect body parts contribute to the SBS along with chemical pollutants, ozone produced by printers, electromagnetic radiation, inadequate ventilation [6]. A low level of fresh air in a room, a concentration of living organisms, poor ventilation, elements of building equipment and human physiology all affect the quality of life in buildings.

In general, factors responsible for so called thermal comfort in buildings are also decisive for biological quality of indoor air. They include ambient temperature and its fluctuations, relative humidity, air movement, average radiant temperature and personal parameters, describing metabolic activity or clothing [80]. The optimal humidity is defined in a range between 40–60%. In too dry conditions harmful substances enter human organism faster whereas in high humidity reproduction of microorganisms is accelerated. Ambient temperature most recommended for the thermal comfort is in the range 20–24°C, which is also conducive to good air quality [80]. Mniszek i Rogiński [72] reviewed the literature on structural defects in buildings as the causes of fungal infections in rooms. They concluded that moulds attack not only old, unheated houses but also new or recently renovated buildings. This is due to numerous factors appearing even in the initial stages of construction (incorrect construction of walls, roofs with inadequately protected wood, lack of adequate ventilation, leakage of water system, etc.). Moisture, which results in the appearance of mould, is linked to the presence of mycotoxins produced by certain species of mould from the genera *Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Rhizoctonia, Claviceps* and *Stachybotrys*. They are classified as dangerous or even carcinogenic and mutagenic substances that can cause changes in the proper functioning of the body. They inhibit DNA synthesis or instigate alterations in RNA metabolism. Their toxic secondary metabolites belong to the group of the most potent poisons. Mycotoxins can cause acute and chronic poisoning, allergies, mycoses, respiratory, digestive and liver diseases, as well as weakening of the immune system. These toxic substances disturb a number of vital functions, including disorders of the central nervous system, immune mechanisms, liver and kidneys. Metabolites produced by moulds can cause dermatitis and poisoning, with symptoms including headaches and diarrhoea [33, 72]. As such, exposure to moisture and mould has an undeniable impact on respiratory health [46].

Currently there are no binding legal instruments regulating the permissible content of microorganisms in Poland in both atmospheric and indoor air. Previous standards, such as PN-89/Z-04008/01; PN-89/Z-04008/08; PN-89/Z-04111/02; PN-89/Z-04111/03 have been waived and they have not been replaced by new instruments until now. However the waived standards are still occasionally used to interpret the results [18]. For example, the standard PN-89/Z-04111/02 specified the strong air contamination with bacteria as state when their total content exceeded 3000 CFU m^{-3} or the content of *P. fluorescens* was above 50 CFU m^{-3}. The contents of fungi were specified in the PN-89/Z-04111/03 – the strong contamination meant the total content of fungi above 10000 CFU m^{-3} [18].

There are no safe level values for exposure to microbiological contamination on the air specified by WHO. The WHO guidelines [107] specify the conditions that contribute to the health risk, emphasizing that microbial growth may result in greater numbers of spores, cell fragments, allergens, mycotoxins, endotoxins, β-glucans and volatile organic compounds in indoor air. The guidelines were formulated by WHO, such as the following: persistent dampness and microbial growth on interior surfaces and in building structures should be avoided or minimized; indicators of improper conditions include the presence of condensation on surfaces, visible mould, mouldy odour and frequent water leakage or penetration. The document also states that no quantitative health-based guideline values or thresholds can be recommended for acceptable levels of microorganisms in indoor air [107].

8. Conclusions

The composition of atmospheric air is an extremely important factor affecting human health. This review of literature from Poland and elsewhere has shown that biological aspects of the air significantly reflect the state of the environment in which we live and function on a daily basis. Humidity is an important indicator of air quality, because in most cases it contributes to the development of microorganisms, both naturally occurring and those that operate under conditions of excessive humidity. This can in turn cause allergic reactions. The most frequently mentioned allergens in the air include fungi such as *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp. and *Aspergillus* sp. Microbial populations in the air may be either seasonal or all-year in character, although their occurrence is generally most intense in summer and autumn. Further factors shaping the number and diversity of microbial communities include atmospheric phenomena (i.e. clouds, fog, rain and snow) and proximity to municipal sources of bioaerosol such as e.g. wastewater treatment plants. It is therefore essential to monitor air quality in both indoor and outdoor environments for microorganisms, in particular with regard to their effects on human health. Increased awareness of the threats posed by biological air pollution will enable greater care of the conditions in which people live every day. In particular, the proper ventilation of buildings, ventilation of rooms and prevention of excessive air humidity are all essential.

Funding:

This research was funded by the statutory program of the Institute of Soil Science and Plant Cultivation – State Research Institute (IUNG) – task 2.41: "Sources of exogenous organic matter in agriculture" and Task 1.4. "Evaluation and formation of biodiversity

of soil and microbial activity of soil with regard to habitat conditions and management system," Multi-Annual Programme IUNG – PIB (2016–2020).

References

1. Afzali, S.F.; Daud, H.H.M.; Sharifpour, I.; Shankar S. Experimental infection of *Aphanomyces invadans* and susceptibility in seven species of tropical fish. *Vet. World*, DOI: 1038–1044. 10.14202/vetworld.2015.1038-1044 (2015)
2. Agranovski V., Ristovski Z., Hargreaves M.J.B.P., Morawska L.: Performance evaluation of the UVAPS: Influence of physiological age of airborne bacteria and bacterial stress. *J. Aerosol. Sci.* **34**, 1711–1727 (2003)
3. Al-Hunaiti A., Arar S., Täubel M., Wraith D., Maragkidou A., Hyvärinen A., Hussein T.: Floor dust bacteria and fungi and their coexistence with PAHs in Jordanian indoor environments. *Sci. Total Environ*. **601–602**, 940–945 (2017)
4. Alpay-Karaoglu S., Ozgumus O.B., Sevim E., Kolayli F., Sevim A., Yesilgil P.: Investigation of antibiotic resistance profile and tem--type β-lactamase gene carriage of ampicillinresistant *Escherichia coli*, strains isolated from drinking water. *Ann. Microbiol*. **57**, 281 (2007)
5. An H.A., Mainelis G., Yao M.: Evaluation of a high-volume portable bioaerosol sampler in laboratory and field environments. *Indoor Air*, **14**, 385–393 (2004)
6. Babatsikou F.P.: The Sick Building Syndrome (SBS). *Health Sci. J.* **5**, 72–73 (2011)
7. Biermann J., Merk H.F., Wehrmann W., Klimek L., Wasem J.: Allergic disorders of the respiratory tract – findings from a large patient sample in the German statutory health insurance system. *Allergo J.* **22**, 366–373 (2013)
8. Blais-Lecours P., Perrott P., Duchaine C.: Non-culturable bioaerosols in indoor settings: Impact on health and molecular approaches for detection. *Atmos. Environ*. **110**, 45–53 (2015)
9. Bolashikov Z.D., Melikov A.K.: Methods for air cleaning and protection of building occupants from airborne pathogens. *Build. Environ*. **44**, 1378–1385 (2009)
10. Boyd P., Ellwood M.: The biogeochemical cycle of iron in the ocean. *Nat. Geosci*. **3**, 675–682 (2010)
11. Breza-Boruta B, Szala B., Kroplewska M.: Powietrze na liniach produkcyjnych zakładu mięsnego jako źródło zanieczyszczenia mikrobiologicznego. *Prace Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu*, **461**, 42–54 (2016)
12. Breza-Boruta B.: Ocena mikrobiologicznego zanieczyszczenia powietrza na terenie oczyszczalni ścieków. *Woda-Środowisko--Obszary Wiejskie*, **3**, 49–57 (2010)
13. Buttner M.P., Stezenbach L.D.: Monitoring airbone fungal spores in an experimental indoor environment to evaluate sampling methods and the effects of human activity on air sampling. *Appl. Environ. Microbiol*. **59**, 219–226 (1993)
14. Cabral J.P.S. Can we use indoor fungi as bioindicators of indoor air quality? Historical perspectives and open questions. *Sci. Total Environ*. **408**, 4285–4295 (2010)
15. Carducci A., Tozzi E., Rubulotta E., Casini B., Cantiani L., Rovini E., Muscillo M., Pacini R.: Assessing airborne biological hazard from urban wastewater treatment. *Water Resour*. **34**, 1173–1178 (2000)
16. Chao H.J., Milton D.K., Schwartz J. i Burge H.A.: Dustborne fungi in large office buildings. *Mycopathologia*, **154**, 93–106 (2002)
17. Chen R., Clifford A., Lang L., Anstey K.J. Is exposure to secondhand smoke associated with cognitive parameters of children and adolescents?a systematic literature review. *Ann. Epidemiol*. **23**, 652–661 (2013)
18. Chmiel M.J., Frączek K., Grzyb J.: Problemy monitoringu zanieczyszczeń mikrobiologicznych powietrza. *Woda-Środowisko--Obszary Wiejskie*, **49**, 17–27 (2015)
19. Clifford A., Lang L., Chen R., Anstey K.J., Seaton A.: Exposure to air pollution and cognitive functioning across the life course – A systematic literature review. *Environ. Res*. **147**, 383–398 (2016)
20. Czerwińska E., Piotrowski W.: Ocena ryzyka zanieczyszczenia mikrobiologicznego w piekarni z uwzględnieniem procesu wytwarzania pieczywa żytniego. *Nauka Przyroda Technologie*, **4**, 1–15 (2010)
21. Deredjian A., Colinon C., Brothier E., Favre-Bonté S., Cournoyer B., Nazaret S.: Antibiotic and metal resistance among hospital and outdoor strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Res. Microbiol*. **162**, 689–700 (2011)
22. Douglas P., Robertson S., Gay R., Hansell A.L., Gant T.W.: A systematic review of the public health risks of bioaerosols from intensive farming. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, **221**, 134–173 (2018)
23. Douwes J., Thorne P. S., Pearce N., Heederik D.: Bioaerosol health effects and exposure assessment: Progress and prospects. *Ann. Occup. Hyg*. **47**, 187–200 (2003)
24. Eduard W., Heederik D., Duchaine C., Green B.J.: Bioaerosol exposure assessment in the workplace: the past, present and recent advances. *J. Environ. Monit*. **14**, 334–339 (2012)
25. Ernst P., Cormier Y.: Relative scarcity of asthma and atopy among rural adolescents raised on a farm. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. **161**, 1563–1566 (2000)
26. European Environment Agency. Air quality in Europe – 2018 report, 2018. doi: 10.2800/777411
27. Fang Z., Ouyang Z., Zheng H., Wang X., Hu L.: Culturable airborne bacteria in outdoor environments in Beijing, China. *Microb. Ecol*. **54**, 324–331 (2007)
28. Fröhlich-Nowoisky J., Kampf C.J., Weber B., Huffman J.A., Pöhlker C., Andreae M.O., Pöschl U.: Bioaerosols in the Earth system: Climate, health, and ecosystem interactions. *Atmos. Res.* **182**, 346–376 (2016)
29. Garrison V.H.,. Shinn E.A., Foreman W.T, Griffin D.W., Holmes C.W., Kellogg C.A., Majewski M.S., Richardson L.L., Ritchie K.B., Smith G.W.: African and Asian dust: from desert soils to coral reefs. *Bioscience*, **53**, 469–480 (2003)
30. Gąska-Jędruch U., Dudzińska M.R.: Zanieczyszczenia mikrobiologiczne w powietrzu wewnętrznym, w Polska Inżynieria Środowiska pięć lat po wstąpieniu do Unii Europejskiej (w) Monografie Komitetu Inżynierii Środowiska, red. J. Ozonek, A. Pawłowski, PAN, Lublin, 2009, s. 31–40
31. Gładysz J., Grzesiak A., Nieradko-Iwanicka B., Borzęcki A.: Wpływ zanieczyszczenia powietrza na stan zdrowia i spodziewaną długość życia ludzi. *Probl. Hig. Epidemiol*. **91**, 178–180 (2010)
32. Goldman D.L., Huffnagle G.B.: Potential contribution of fungal infection and colonization to the development of allergy. *Medical Mycology*. **47**, 445–456 (2009)
33. Gołofit-Szymczak M., Skowroń J.: Zagrożenia mikrobiologiczne w pomieszczeniach biurowych. *Bezpieczeństwo pracy*, **3**, 29–31 (2005)
34. Górny R. L.: Aerozole biologiczne – rola normatywów higienicznych w ochronie środowiska i zdrowia. *Med. Środow*. **13**, 41– 51 (2010)
35. Griffin D.W., Kellogg C.A., Garrison V.H., Lisle J.T., Borden T.C., Shinn E.A.: Atmospheric microbiology in the northern Caribbean during African dust events. *Aerobiologia*, **19**, 143–157 (2003)
36. Griffin D.W.: Terrestrial microorganisms at an altitude of 20,000 m in Earth's atmosphere. *Aerobiologia*, **20**, 135–140 (2004)

37. Grisoli P., Rodolfi M., Villani S., Grignani E., Cottica D., Berri A., Picco A.M., Dacarro C.: Assessment of airborne microorganism contamination in an industrial area characterized by an open composting facility and a wastewater treatment plant. *Environ. Res*. **109**, 135–142 (2009)
38. Hameed A.A., Khoder M.I., Ibrahim Y.H., Saeed Y., Osman M.E., Ghanem S.: Study on some factors affecting survivability of airborne fungi. *Sci. Total Environ*. **414**, 696–700 (2012)
39. Hara K., Zhang D.: Bacterial abundance and viability in long-range transported dust. *Atmos. Environ.* **47**, 20–25 (2012)
40. Hargreaves M., Parappukkaran S., Morawska L., Hitchins J., He C., Gilbert D.: A pilot investigation into association between indoor aireborne fungal and non-biological particle concentrations in residential houses in Brisbane, Australia. *Sci. Total Environ*. **312**, 89–101 (2003)
41. Hospodsky D., Qian J., Nazaroff W.W., Yamamoto N., Bibby K., Rismani-Yazdi H., Peccia J.: Human occupancy as a source of indoor airborne bacteria. *PLoS One*, **7**, 34867 (2012)
42. Huang C.Y., Lee C.C., Li F.C., Ma Y.P., Su H.J.J.: The seasonal distribution of bioaerosolss in municipal landfill sites: a 3-yr study. *Atmos. Environ*. **36**, 4385–4395 (2002)
43. Hwang S.H., Kim I.S., Park W.M.: Concentrations of PM10 and airborne bacteria in daycare centers in Seoul relative to indoor environmental factors and daycare center characteristics. *Air Qual. Atmos. Health*, **10**, 139–145 (2017)
44. Imshenetsky, A.A., Lysenko, S.V., Kazakov, G.A. Upper boundary of the biosphere. *Appl. Environ. Microbiol*. **35**, 1–5 (1978)
45. Jo W.K., Kang J.H.: Workplace exposure to bioaerosols in pet shop, pet clinics and flower garden. *Chemosphere*, **65**, 1755–1761 (2006)
46. Kaarakainen P., Rintala H., Vepsalainen A. i Hyvarinen A.: Microbial content of house dust samples determined with qPCR. *Sci. Total Environ*. **407**, 4673–4680 (2009)
47. Kalisz L., Kaźmierczuk M., Sałbut J.: Ocena oddziaływania obiektów komunalnych na mikrobiologiczną jakość powietrza oraz rozprzestrzenianie się odorów. *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych*, **9**, 125–143 (1996)
48. Kalogerakis N., Paschali D., Lekaditis V., Pantidou A., Eleftheriadis K., Lazaridis M.: Indoor air quality bioaerosol measurements in domestic and office premises. *J. Aerosol. Sci*. **36**, 751–761 (2005)
49. Karra S., Katsivela E.: Microorganisms in bioaerosols emissions from wastewater treatment plants during summer at a Mediterranean site. *Water Res*. **41**, 1355–1365 (2007)
50. Karwowska E.: Microbiological air contamination in farming environment. *Pol. J. Environ. Stud*. **14**, 445–449 (2005)
51. Kaźmierczuk M., Kalisz L.: Bioaerozole w oczyszczalniach ścieków miejskich. *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych*, **17**, 121–135 (1999)
52. Kaźmierczuk M., Kalisz L.: Ocena warunków aerosanitarnych na terenie wysypisk odpadów komunalnych. *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych*, **21/22**, 25–35 (2001)
53. Kellogg C.A., Griffin D.W., Garrison V.H., Peak K.K., Royall N., Smith R.R., Shinn E.A.: Characterization of aerosolized bacteria and fungi from desert dust events in Mali, West Africa. *Aerobiologia*, **20**, 99–110 (2004)
54. Kellogg C.A., Griffin D.W.: Aerobiology and the global transport of desert dust. *Trends Ecol. Evol.* **21**, 638–644 (2006)
55. Klepeis N.E., Nelson W.C., Ott W.R., Robinson J.P., Tsang A.M., Switzer P., Behar J.V., Hern S.C., Engelmann W.H.: The National Human Activity Pattern Survey (NHAPS): a resource for assessing exposure to environmental pollutants. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol*. **11**, 231–252 (2000)
56. Korta-Pepłowska M., Chmiel M.J., Frączek K.: Zagrożenia mikrobiologiczne w środowisku pomieszczeń. *Med. Środow*. **19**, 48–54 (2016)
57. Korzeniewska E., Filipkowska Z., Gotkowska-Płachta A., Janczukowicz W., Dixon B., Czułowska M.: Determination of emitted airborne microorganisms from a bio-pak wastewater treatment plant. *Water Res*. **43**, 2841–2851 (2009)
58. Korzeniewska E., Filipkowska Z., Gotkowska-Płachta A., Janczukowicz W., Rutkowski B.: Bacteriological pollution of the atmospheric air at the municipal and dairy wastewater treatment plant area and in its surroundings. *Arch. Environ. Prot*. **34**, 13–23 (2008)
59. Korzeniewska E., Korzeniewska A., Harnisz M.: Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf*. **91**, 96–102 (2013)
60. Kubera Ł., Studzińska J., Dokładna W., Małecka-Adamowicz M., Donderski W.: Mikrobiologiczna jakość powietrza w wybranych przedszkolach oraz antybiotykooporność bakterii z rodzaju *Staphylococcus* spp. *Medycyna Pracy*, **66**, 49–56 (2015)
61. Kummer V., Thiel W.R.: Bioaerosols – Sources and control measures. *Int. J. Hyg. Envir. Heal*. **211**, 299–307 (2007)
62. Lee J.H., Jo W.K.: Characteristics of indoor and outdoor bioaerosols AT Korean high-rise apartment buildings. *Environ. Res*. **101**, 11–17 (2006)
63. Li D.W., Kendrick B.: A Year-round Comparison of Fungal Spores in Indoor and Outdoor Air. *Mycologia*, **87**, 190–195 (1995)
64. Liebers V., Raulf-Heimsoth M., Brüning T.: Health effects due to endotoxin inhalation (review). *Arch. Toxicol*. **82**, 203–210 (2008)
65. Lighthart B., Shaffer B.T.: Airborne bacteria in the atmospheric surface layer: temporal distribution above a grass seed field. *Appl. Environ. Microbiol*. **61**, 1492–1496 (1995)
66. Lighthart B.: The ecology of bacteria in the alfresco atmosphere. *FEMS Microbiol. Ecol*. **23**, 263–274 (1997)
67. Liu H., Zhang X., Zhang H., Yao X., Zhou M., Wang J., He Z., Zhang H., Lou L., Mao W., Zheng P., Hu B.: Effect of air pollution on the total bacteria and pathogenic bacteria in different sizes of particulate matter. *Environ. Pollut*. **233**, 483–493 (2018)
68. Martinez K., Rao C., Burton N.: Exposure assessment and analysis for biological agents. *Grana*, **43**, 193–208 (2004)
69. Maus R., Goppelsroder A., Umhauer H.: Survival of bacterial and mold spores in air filter media. *Atmos. Environ*. **35**, 105–113 (2001)
70. Mbareche H., Veillette M., Bilodeau G.J., DUCHAINE C.: Fungal aerosols at dairy using molecular and culture techniques. *Sci. Total. Environ*. **653**, 253–263 (2019)
71. Menetrez M.Y., Foarde K.K., Dean T.R., Betancourt D.A., Moore S.A.: An evaluation of the protein mass of particulate matter, *Atmos. Environ.* DOI:10.1016/j.atmosenv.2007.06.021. (2007)
72. Mniszek W, Rogiński J.: Wady konstrukcyjne budynków przyczyną zagrzybienia pomieszczeń. *Zeszyty naukowe wyższej szkoły zarządzania ochroną pracy w Katowicach*, **1**, 31–44 (2007)
73. Moldoveanu A.M.: Biological contamination of air in Indoor Spaces, Current Air Quality Issues, Farhad Nejadkoorki, Intech-Open, DOI: 10.5772/59727. Available from: https://www.intechopen.com/books/current-air-quality-issues/biological-contamination-of-air-in-indoor-spaces (2015)
74. Molesworth A.M., Cuevas L.E., Morse A.P., Herman J.R., Thomson M.C.: Dust clouds and spread of infection. *The Lancet*, **359**, 81–82 (2002)
75. Molhave L., Schneider T., Kjaergaard S.K., Larsen L., Norn S., Jorgensen O.: House dust in seven Danish offices. *Atmos. Environ*. **34**, 4767–4779 (2000)
76. Morey P., Otten J., Burge H., Chatigny M., Feeley J., LaForce F.: Airborne viable microorganisms in office environments: sampling protocol and analytical procedures. *Appl. Ind. Hyg.* **1**, R19–R23 (1986)

77. Mutius V.: Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. *Clin. Exp. Allergy*, **30**, 1230–1234 (2000)
78. Nabrdalik M., Latała A.: Występowanie grzybów strzępkowych w obiektach budowlanych. *Roczn. PZH*. **54**, 119–127 (2003)
79. Nicholson W.L.: Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cell. Mol. Life Sci*. **59**, 410–416 (2002)
80. Özdamar M., Umarogullari F.: Thermal comfort and indoor air quality. *Int. J. Sci. Res. Innov. Std*. **5**, 90–105 (2018)
81. Paśmionka I., Galus-Barchan A., Oleksiewicz B.: Mikrobiologiczne zanieczyszczenie powietrza atmosferycznego na terenie Grupowej Oczyszczalni Ścieków w Chrzanowie. *Polish J. Agron.* **20**, 3–8 (2015)
82. Pastuszka J.S., Górny R.L., Lis D.O.: Emission of bacterial aerosol from the fishaquarium. *J. Aerosol Sci*. **27**, 253–254 (1996)
83. Pastuszka J.S., Paw U.K.T., Lis D.O., Wlazło A, Ulfig K.: Bacterial and fungal in indoor environment in Upper Silesia, Poland. *Atmos. Environ*. **34**, 3833–3842 (2000)
84. Pérez-Martín F., Seseña S., Fernández-González M., Arévalo M., Llanos Palop M.: Microbial communities in air and wine of a winery at two consecutive vintages. *Int. J. Food Microbiol*. **190**, 44–53 (2014)
85. Polymenakou P.N: Atmosphere: A Source of Pathogenic or Beneficial Microbes? *Atmosphere*, **3**, 87–102 (2012)
86. Rajasekar A., Balasubramanian R.: Assessment of airborne bacteria and fungi in food courts. *Build. Environ*. **46**, 2081–2087 (2011)
87. Robertson C.E., Baumgartner L.K., Harris J.K., Peterson K.L., Stevens M.J., Frank D.N., Pacea N.R.: Culture-Independent Analysis of Aerosol Microbiology in a Metropolitan Subway System. *Appl. Environ. Microbiol*. 79, 3485–3493 (2013)
88. Rubin M., Berman-Frank I., Shaked Y.: Dust-and mineral-iron utilization by the marine dinitrogen-fixer *Trichodesmium*. *Nat. Geosci*. **4**, 529–534 (2011)
89. Rule A.M., Kesavan J., Schwab K.J., Buckley T.J.: Application of flow cytometry for the assessment of preservation and recovery efficiency of bioaerosol samplers spiked with *Pantoea agglomerans*. *Environ. Sci. Technol*. **41**, 2467–2472 (2007)
90. Russel S., Paluchowska-Święcka O.: Wpływ temperatury na zawartość grzybów w powietrzu pomieszczeń użytkowania rolniczego. *Ekologia i Technika*, **16**, 150–155 (2008)
91. Sánchez-Monedero M.A., Aguilar M.I., Fenoll R., Roig A.: Effect of the aeration system on the levels of airborne microorganisms generated at wastewater treatment plants. *Water Res*. **42**, 3739–3744 (2008)
92. Schuijs M.J., Willart M.A., Vergote K., Gras D., Deswarte K., Ege M.J., Madeira F.B., Beyaert R., van Loo G., Bracher F.: Farm dust and endotoxin protect against allergy through A20 induction in lung epithelial cells. *Science*, **349**, 1106–1110 (2015)
93. Shehab M.A., Pope F.D.: Effects of short-term exposure to particulate matter air pollution on cognitive performance. *Sci. Rep*. **9**, 8237 (2019)
94. Smets W., Moretti S., Denys S., Lebeer S.: Airborne bacteria in the atmosphere: Presence, purpose, and potential. *Atmos. Environ*. **139**, 214–221 (2016)
95. Srikanth P., Sudharsanam S., Steinberg R.: Bio-aerosols in indoor environment: composition, health effects and analysis. *Indian J. Med. Microbi*. **26**, 302–312 (2008)
96. Staszowska A.: Mikroorganizmy w kurzu z pomieszczeń na przykładzie miasta Lublina. *Proceedings of ECOpole*, **5**, 325–328 (2011)
97. Stetzenbach L.D., Buttner M.P., Cruz P.: Detection and enumeration of airborne biocontaminants. *Curr. Opin. Biotech.* **15**, 170–174 (2004)
98. Szyłak-Szydłowski M., Kulig A., Miaśkiewicz-Pęska E.: Seasonal changes in the concentrations of airborne bacteria emitted from a large wastewater treatment plant. *Int. Biodeterior. Biodegrad*. **115**, 11–16 (2016)
99. Tischer C., Zock J.P., Valkonen M., Doekes G., Guerra S., Heederik D., Jarvis D., Norbäck D., Olivieri M., Sunyer J., Svanes C., Täubel M., Thiering E., Verlato G., Hyvärinen A., Heinrich J.: Predictors of microbial agents in dust and respiratory health in the Ecrhs. *BMC Pulm. Med.* **15**, 1–11 (2015)
100. Tong Y., Lighthart B.: Solar radiation is shown to select for pigmented bacteria in the ambient outdoor atmosphere. *Photochem. Photobiol*. **65**, 103–106 (1997)
101. Tonne C., Elbaz A., Beevers S., Singh-Manoux A.: Traffic-related air pollution in relation to cognitive function in older adults. *Epidemiology*, **25**, 674–681 (2014)
102. Tsai, M.Y., Liu, H.M.: Exposure to culturable airborne bioaerosols during noodle manufacturing in central Taiwan. *Sci. Total Environ*. **407**, 1536–1546 (2009)
103. Tu K.W., Shaw O.J.: Experimental determination of interception collection efficiencies for small cloud droplets. *J. Colloid Interface Sci*. **62**, 40–47(1977)
104. Verhoeff A.P., van Wijnen J.H., van Reenen-Hoekstra E.S., Samson R.A., van Strien R.T., Brunekreef B.,: Fungal propagules in house dust. II. Relation with residential characteristics and respiratory symptoms. *Allergy*, **49**, 533–539 (1994)
105. Wainwright M., Wickramasinghe N.C., Narlikar J.V., Rajaratnam P.: Microorganisms cultured from stratospheric air samples obtained at 41 km. *FEMS Microbiol. Lett*. **218**, 161–165 (2003)
106. Walser S.M., Gerstner D.G., Brenner B., Bünger J., Eikmann T., Janssen B., Herr C.: Evaluation of exposure-response relationships for health effects of microbial bioaerosols – A systematic review. *Int. J. Hyg. Envir. Heal*. **218**, 577–589 (2015)
107. WHO. WHO guidelines for indoor air quality: dampness and mould. *World Health Organization, Germany,* **60**, 228 (2009)
108. World Health Organization. 2019, https://www.who.int/ (accessed 12 Sept. 2019).
109. www.europeanlung.org, accessed 20.03.2020
110. Xie Z., Li Y., Lu R., Li W., Fan C., Liu P., Wang J., Wang W.: Characteristics of total airborne microbes at various air quality Levels. *J. Aerosol. Sci*. **116**, 57–65 (2018)
111. Xu B., Hao J.: Air quality inside subway metro indoor environment worldwide: A review. *Environ. Int.* **107**, 33–46 (2017)
112. Zhang M., Zuo J., Yu1 X., Shi X., Chen L., Li Z.: Quantification of multi-antibiotic resistant opportunistic pathogenic bacteria in bioaerosols in and around a pharmaceutical waste. *J. Environ. Sci*. **72**, 53–63 (2017)
113. Zhen Q., Deng Y., Wang Y., Wang X., Zhang H., Sund X., Ouyanga Z.: Meteorological factors had more impact on airborne bacterial communities than air pollutants. *Sci. Total Environ*. **601–602**, 703–712 (2017)
114. Zhu H., Phelan P.E., Duan T., Raupp G.B., Fernando H.J.S., Che F.: Experimental study of indoor and outdoor airborne bacterial concentrations in Tempe, Arizona, USA. *Aerobiologia*, **19**, 201–211 (2003)
115. Zyska, B. Zagrożenia biologiczne w budynku; Arkady: Warszawa, 1999.

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2020, 59, 2, 129–137
DOI: 10.21307/PM-2020.59.2.010

RYZYKO TRANSMISJI CHORÓB ZAKAŹNYCH PRZENOSZONYCH PRZEZ KLESZCZE POPRZEZ TRANSFUZJĘ KRWI

Beata Fiecek, Marta Matławska, Elżbieta Gołąb, Tomasz Chmielewski*

Zakład Parazytologii i Chorób Przenoszonych przez Wektory NIZP-PZH

Wpłynęło w listopadzie 2019 r., zaakceptowano w marcu 2020 r.

Streszczenie: Obawa przed zakażeniami przenoszonymi przez transfuzję krwi była problemem od początku ery krwiolecznictwa. Jedną z faz wszystkich chorób zakaźnych, w tym przenoszonych przez kleszcze, jest okres wylęgania, podczas której nie ma objawów klinicznych wynikających z obecności drobnoustrojów we krwi. Z tego powodu, krew pobrana od zakażonego dawcy może stanowić w tym momencie potencjalne źródło zakażenia dla biorcy. Z danych literaturowych wynika, że brak jest udokumentowanych doniesień o możliwości przeniesienia zakażenia krętkami *B. burgdorferi* (czynnika etiologicznego boreliozy z Lyme) na człowieka zdrowego poprzez transfuzję krwi. Opisywano jednak przypadki po przetoczeniach takich zakażeń jak babeszjoza, anaplazmoza, riketsjozy z grupy gorączek plamistych, bartonelozy. Zakażenia przenoszone przez kleszcze nie znajdują się w kryteriach dyskwalifikacji stałej (oprócz tularemii) lub czasowej dla kandydatów na dawców krwi oraz w przeciwwskazaniach do pobrania krwi. Nie stosuje się także testów do rutynowego wykrywania patogenów odkleszczowych w krwiolecznictwie. Dlatego znajomość dynamiki faz tych chorób, okresy zakaźności i ich występowania we krwi w połączeniu z wywiadem lekarskim, badaniem przedmiotowym i wynikami pomocniczych badań diagnostycznych, mają podstawowe znaczenie dla bezpieczeństwa biorców krwi.

1. Wprowadzenie. 2. Zakażenia wywoływane przez krętki. 2.1. Borelioza z Lyme. 2.2. Zakażenia wywoływane przez *Borrelia myiamotoi*. 3. Gorączki plamiste. 4. Ludzka granulocytarna anaplazmoza 5. Zakażenia *Bartonella* sp. 6. Babeszjoza. 7. Podsumowanie

RISK OF TRANSMISSION OF TICK-BORNE DISEASES BY BLOOD TRANSFUSION

Abstract: The fear of blood transfusion-borne infections has been a problem since the beginning of the blood therapy era. One of the phases of all infectious diseases, including those transmitted by ticks, is the incubation period, during which there are no clinical symptoms due to the presence of microorganisms in the blood. For this reason, blood drawn from an infected donor can be a potential source of infection for the recipient at this time. Literature data show that there are no documented reports of the possibility of transmitting *B. burgdorferi* infection (Lyme etiological factor) to healthy man by blood transfusion. However, cases of transfusions of such infections as babesiosis, anaplasmosis, rickettsiosis, and fever, bartonellosis have been reported. Tick-borne infections are not included in the criteria for permanent (except tularemia) or temporary disqualification for blood donor candidates and for contraindications for blood sampling. Tests for routine detection of tick-borne pathogens in blood therapy are also not used. Therefore, knowledge of the dynamics of the phases of these diseases, periods of infectivity and occurring in the blood in conjunction with medical history, physical examination and the results of auxiliary diagnostic tests are of fundamental importance for the safety of blood recipients.

1. Introduction. 2. Spirochetes infections. 2.2. Lyme borreliosis. 2.2. *Borrelia myiamotoi* infections. 3. Spotted Fever Group rickettsioses. 4. Human granulocytic anaplasmosis 5. *Bartonella* sp. Infections. 6. Babesiosis. 7. Summary

Słowa kluczowe: Choroby przenoszone przez kleszcze, transfuzja krwi
Key words: Tick-borne diseases, blood transfusion

1. Wprowadzenie

Obawa przed zakażeniami przenoszonymi przez transfuzję krwi była problemem od początku ery banków krwi. Począwszy od dowodów na to, że kiła może być przenoszona przez transfuzję krwi, poprzez obawy dotyczące przenoszenia wirusowego zapalenia wątroby. Szczyt zainteresowania zakażeniami przenoszonymi przez transfuzję przypada na lata 80. XX wieku. Wtedy to największym problemem było rozprzestrzenianie się AIDS, a także wirusowego zapalenia wątroby typu C (HCV). Podstawowe informacje służące identyfikacji ryzyka i decyzjom zabezpieczających biorców, powinny uwzględniać epidemiologię chorób przenoszonych przez kleszcze, biologię patogenów je wywołujących oraz określenie możliwości diagnostycznych, ze szczególnym uwzględnieniem nowych i bardzo czułych metod ograniczających ryzyko transmisji poprzez transfuzję [27].

Jedną z początkowych faz wszystkich chorób przenoszonych przez kleszcze, jest obecność we krwi żywiciela transmitowanego patogenu. Bakteriemi czy parazytemii nie towarzyszą objawy kliniczne. Z tego powodu, krew pobrana od zakażonego dawcy może stanowić potencjalne źródło zakażenia dla biorcy.

* Autor korespondencyjny: Dr hab. n. med. Tomasz Chmielewski, Pracownia Chorób Przenoszonych przez Wektory, Zakład Parazytologii i Chorób Przenoszonych przez Wektory NIZP-PZH; ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa; e-mail: tchmielewski@pzh.gov.pl

Rutynowe postępowanie przy oddawaniu krwi polega na wypełnieniu kwestionariusza, a następnie na ocenie informacji w nim zawartych, wywiadzie lekarskim, badaniu przedmiotowym uwzględniającym wyniki pomocniczych badań diagnostycznych. Po tych procedurach następuje kwalifikacja do oddania krwi. Podczas zabiegu pobrania przeprowadzane są tylko niektóre testy w kierunku chorób zakaźnych, takie jak: test kiłowy, obecność przeciwciał anty-HCV, anty-HIV, antygenu HBs oraz kwasów nukleinowych HBV, HCV, HIV i parwowirus B19.

Choroby zakaźne przenoszone przez kleszcze nie znajdują się w kryteriach dyskwalifikacji stałej (oprócz tularemii i babeszjozy) lub czasowej dla kandydatów na dawców krwi oraz w przeciwwskazaniach do pobrania krwi.

Z danych literaturowych wynika, że brak jest udokumentowanych doniesień o możliwości przeniesienia zakażenia krętkami *B. burgdorferi,* czynnika etiologicznego boreliozy z Lyme, na człowieka zdrowego poprzez transfuzję krwi. Opisywano jednak po przetoczeniach przypadki takich zakażeń jak babeszjoza, anaplazmoza, riketsjozy z grupy gorączek plamistych. Obecnie nie ma jednoznacznych wyników badań, które uzasadniałyby konieczność wykonywania w krwiolecznictwie i transplantologii rutynowej diagnostyki w kierunku wykrywania patogenów odkleszczowych [39].

2. Zakażenia wywoływane przez krętki

2.1. Borelioza z Lyme

Borelioza z Lyme jest najczęściej występującym zakażeniem przenoszonym przez kleszcze na półkuli północnej. Co roku w Polsce rejestrowanych jest ponad 20 tys. przypadków. Przeniesienie krętków *Borrelia burgdorferi* w wyniku transfuzji krwi pozostaje dotychczas raczej teoretyczną niż rzeczywistą możliwością.

Krętki po wniknięciu w skórę rozprzestrzeniają się obwodowo tworząc rumień wędrujący (*erythema migrans* – EM). Uważa się, że przemieszczanie się bakterii *B. burgdorferi* ze skóry (z rumienia) do kolejnych narządów i układów następuje głównie poprzez krew, jednak tylko przez bardzo krótki czas. Obecność żywych krętków, udowodniono w krwi obwodowej dorosłych pacjentów z EM, którym nie włączono jeszcze leczenia antybiotykami [60, 61]. Około 30% pacjentów z EM nie ma poza zmianą skórną, żadnych innych objawów klinicznych. Ta grupa może stanowić potencjalne zagrożenie, zwłaszcza kiedy nie zauważą rumienia. Pozostali odczuwają miejscowe dolegliwości typu swędzenie, pieczenie, ból i/lub objawy ogólne, takie jak osłabienie, bóle głowy mięśni i stawów, zawroty głowy, gorączka [48, 49], co dyskwalifikuje ich jako dawców w danym momencie.

Krętki *B. burgdorferi* są bakteriami wolnorosnącymi na bardzo bogatym podłożu BSK-H w temperaturze 33–37°C w atmosferze 5% CO_2 [40]. W skład podłoża BSK_H wchodzi ponad 60 składników, takich jak: aminokwasy, witaminy, elektrolity i surowica królicza (6%). Inokulum nie może być mniejsze niż 5 komórek bakteryjnych. Gęstość zawiesiny bakteryjnej w podłożu BSK-H po inkubacji 14 dni nie przekracza 10^8 komórek w 1 ml, bowiem czas generacji wynosi około 12 godzin [40]. Wyniki eksperymentów prowadzonych w latach 90. XX wieku, wykazały, że *B. burgdorferi* dodawana do próbek krwi, może przetrwać warunki jakim jest ona poddawana w procesach przygotowywania do bankowania. Potwierdzono zdolność krętków do przeżycia w ludzkiej krwi, przetwarzanej do transfuzji, przez 36 dni przechowywania w 4°C, jeśli wyjściowa ich gęstość wynosiła 0,2 żywych komórek / ml krwi, lub 48 dni jeśli ich gęstość wynosiła minimum 20 żywych komórek / ml [13, 31]. Biorąc pod uwagę niska spirochetemię u zakażonych ocenianą na 0,1 komórki / ml zakażenie tą drogą jest praktycznie niemożliwe. Już w latach 90. XX wieku możliwość wyhodowania krętków z krwi u chorych z EM oceniano na 44% i na 20% u pacjentów we wczesnej rozsianej fazie zakażenia (do kilku tygodni) [34, 59].

Badania częstości występowania przeciwciał dla *B. burgdorferi* u krwiodawców na Słowacji i w Niemczech wykazały ich obecność u 15% (ELISA) i 9,4% (ELISA i Line-blot) [58, 63]. Seroprewalencja była istotnie wyższa u mężczyzn (13,0%) niż u kobiet (5,8%) oraz zależna od wieku [58]. W Polsce dotychczasowe badania były wykonywane na małych kilkudziesięcioosobowych grupach, będących najczęściej grupami kontrolnymi. W badaniu z 2002 roku na 1000 krwiodawcach, przeciwciała stwierdzono u 11–13% osób (ELISA) [7].

2.2. Zakażenia wywoływane przez *Borrelia myiamotoi*

Gatunek *Borrelia miyamotoi* to nowo opisane krętki przenoszone przez kleszcze. Zakażenia u ludzi charakteryzują się objawami grypopodobnymi oraz możliwymi nawracającymi epizodami gorączki. Zakażenie krętkami *B. miyamotoi* może przybrać ostrą formę, w postaci zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, u pacjentów z obniżoną odpornością. Badania sprawdzające zdolność krętków *B. miyamotoi* do przeżywania w standardowych warunkach przechowywania składników krwi, w bankach krwi, przeprowadzano na modelu zwierzęcym. Badania te wykazywały, że w krwi mysiej mogą one przeżyć przez 7 dni przechowywania w 4°C. Taką krew przetaczano z kolei myszom z obniżoną odpornością CB17 SCID (SCID – severe combined immunodeficiency) oraz myszom z prawidłową odpornością. W obu grupach obserwowano spirochetemię, przy czym u myszy z prawidłową odpornością tylko przejściową. To

pokazało, że transmisja *B. miyamotoi* poprzez transfuzję krwi może występować u zwierząt doświadczalnych, co sugeruje, że może ona również wystąpić u ludzi [24].

Kolejnym badaniem było dodanie do świeżo pobranej ludzkiej krwi żywych krętków *B. miyamotoi* lub zakażonego *B. miyamotoi* osocza. Rozdzielone składniki: czerwone krwinki, osocze i płytki krwi wstrzykiwano myszom z obniżoną odpornością gatunku CB17 SCID lub myszom immunokompetentnym typu dzikiego *Peromyscus leucopus*, a także hodowano *in vitro*, bezpośrednio po rozdzieleniu i po przechowywaniu w odpowiednich warunkach. W dwóch niezależnych eksperymentach *B. miyamotoi* wykrywano w rozmazie krwi u wszystkich myszy CB17 SCID zainfekowanych zakażonymi czerwonymi krwinkami, przechowywanymi przez 21 i 42 dni. Zakażenie obserwowano także u zwierząt, którym podano świeże osocze i płytki otrzymane z pełnej krwi zakażonej *B. miyamotoi*. Żadna z myszy, które otrzymały osocze przechowywane 30 dni w –20°C, nie miała jakichkolwiek oznak infekcji. U 9 z 10 myszy *P. leucopus* (dziki typ myszy) wykazano krążące krętki we krwi po podaniu świeżych oraz przechowywanych 21 dni w 4°C czerwonych krwinek. Krwinki czerwone przechowywane 42 dni w 4°C wywołały zakażenie u 5 z 10 myszy, którym je zaaplikowano. Próbki osocza i płytek krwi zaszczepione przed przechowywaniem zainfekowały odpowiednio 5 z 10 i 6 z 10 *P. leucopus.* Żadna z myszy typu dzikiego nie została zainfekowana zamrożonymi próbkami osocza. Myszy CB17-SCID wykazały spirochetemię w zakresie od 10^4 do 10^8/ml, a u myszy *P. leucopus* było znacznie niższe (najwyższe miano 10^5/ml). Badania te wskazały, że tylko część bakterii nie przeżywa dłuższego okresu przechowywania w krwinkach czerwonych. Ponadto, odpowiednia filtracja nie jest skuteczna i nie zapobiega obecności krętków w koncentratach krwinek płytkowych. Jedynie zamrożone osocze nie stanowi zagrożenia. [51]. Obserwacje te są szczególnie istotne w świetle opisanych, związanych z przetoczeniami krwi lub preparatów krwiopochodnych przypadków zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych u pacjentów z obniżoną odpornością.

Wzrost liczby zakażeń wywoływanych przez krętki przenoszone przez kleszcze u ludzi, wymaga monitorowania, a zakażenie *B. miyamotoi* należy umieścić na liście nowo pojawiających się patogenów (emerging pathogens), które mogą stanowić przyszłe zagrożenie dla bezpieczeństwa gromadzonych i przechowywanych rezerw składników krwi [51].

3. Gorączki plamiste

Ze względu na gatunek riketsji wywołujących zakażenie i miejsce występowania, grupa gorączek plamistych (Spotted Fever Group rickettsioses) to szereg chorób, z których najczęściej występującymi są: gorączka plamista Gór Skalistych (Rocky Mountain spotted fever – RMSF) występująca na terenie Ameryki Północnej i Południowej wywoływana przez *Rickettsia rickettsii* oraz występujące na terenie Eurazji gorączka guzkowa wywoływana przez *R. conorii*, TIBOLA/DEBONEL wywoływana przez *R. slovaca*, *R. raoultii* i *R. rioja*, zakażenia wywoływane przez *R. helvetica* i północnoazjatycka gorączka kleszczowa wywoływana przez *R. sibirica*. Charakterystycznymi objawami tych chorób są wysoka gorączka i towarzyszące jej zmiany skórne. Najczęściej stwierdza się zmianę pierwotną w postaci strupa, w miejscu ukłucia przez zakażonego stawonoga oraz wysypkę plamistą, grudkową lub plamisto-grudkową. Rezerwuarem zakażeń są różne gatunki zwierząt, z których bakterie przenoszone są na człowieka przez stawonogi [4, 43].

Komórkami docelowymi dla riketsji są komórki śródbłonka naczyń, do których wnikają i w których następuje ich namnażanie. W ich wyniku dochodzi do nacieków leukocytarnych w ścianach naczyń krwionośnych i w przestrzeniach okołonaczyniowych. Prowadzi to do uszkodzenia naczyń włosowatych, tętniczek i małych tętnic, a w konsekwencji do wybroczyn i wylewów. Przeżywalność riketsji w pobranej próbce krwi jest bardzo ograniczona. Z badań laboratoryjnych wynika, że nie przekracza ona 24 godzin przechowywania w temperaturze pokojowej czy w 4°C. Żywe bakterie izoluje się jedynie z próbek przechowywanych w –70°C [4].

Dotychczas opisano jeden przypadek zakażenia riketsjami z grupy gorączek plamistych związany z transfuzją. Przetoczona krew pochodziła od bezobjawowego dawcy, u którego objawy wystąpiły dopiero 3 dni później. Dawca zmarł po sześciu dniach od pojawienia się objawów gorączki plamistej Gór Skalistych. U chorego na anemię biorcy, gorączka niewiadomego pochodzenia i ból głowy wystąpiły po 6 dniach od transfuzji. Po informacji ze szpitala o zachorowaniu dawcy krwi natychmiast rozpoczęto skuteczne leczenie RMSF u biorcy. Zakażenie *R. rickettsii* u biorcy potwierdzono laboratoryjnie metodami serologicznymi, próbą biologiczną i hodowlą komórkową [57].

4. Ludzka granulocytarna anaplazmoza

Gram-ujemna bakteria *Anaplasma phagocytophilum*, to wewnątrzkomórkowy patogen wystepujący w granulocytach obojętnochłonnych i neutrofilach, wywołuje ludzką granulocytarną anaplazmozę (human granulocytic anaplasmosis – HGA). Objawy anaplazmozy zwykle pojawiają się w ciągu 1–2 tygodni po ukłuciu zakażonego kleszcza. Objawy to gorączka powyżej 39°C, dreszcze, bóle mięśni i silne bóle głowy, nudności

oraz wymioty, biegunka, a także utrata apetytu. Rzadko występuje powiększenie wątroby i śledziony, u ok. 33% chorych obserwuje się wysypkę. Anaplazmoza może mieć ciężki przebieg u pacjentów nieleczonych i z chorobami przewlekłymi. Około jedna trzecia do połowy przypadków objawowych w USA wymaga hospitalizacji, a 3% do 7% ma powikłania zagrażające życiu [8, 12, 32, 38].

W Polsce zgłaszane są pojedyncze przypadki anaplazmozy. Od stycznia 2009 roku do lipca 2019 roku odnotowano 31 przypadków zachorowań (zapadalność 0,01–0,02 na 100 tys. mieszkańców) podanych ogólnie jako występowanie gorączek plamistych i innych riketsjoz (Meldunki Epidemiologiczne Zakładu Epidemiologii Chorób Zakaźnych i Nadzoru, NIZP-PZH). Przypuszcza się, że zgłoszona liczba przypadków anaplazmozy jest wysoce zaniżona, ze względu na nietypowe objawy kliniczne oraz ograniczony dostęp do diagnostyki laboratoryjnej.

Patogen *A. phagocytophilum* po przeniknięciu do organizmu rozprzestrzenia się drogą naczyń krwionośnych oraz chłonnych. Atakuje krwinki białe, komórki układu krwiotwórczego oraz siateczkowo-śródbłonkowego, gdzie namnaża się w wakuolach cytoplazmatycznych. W wątrobie, śledzionie, sercu, nerkach i płucach a czasem w oponach mózgowo-rdzeniowych, pojawiają się okołonaczyniowe nacieki limfocytarne. Rozpad zakażonych komórek prowadzi do uwolnienia drobnoustrojów do krwi i dalszego rozprzestrzeniania się zakażenia. Zgodnie z badaniami *A. phagocytophilum* pozostaje zdolna do życia w próbce krwi i zakażania do 18 dni przechowywania w temperaturze 2–8°C [2, 32].

Rozpoznanie ludzkiej anaplazmozy granulocytarnej opiera się głównie na badaniach serologicznych, identyfikacji charakterystycznych moruli tj. wewnątrzcytoplazmatycznych agregatów komórek bakteryjnych, widocznych w granulocytach, w rozmazach krwi obwodowej (25% do 75% pacjentów) i wykrywaniu DNA metodą PCR (67% do 90% pacjentów). Czułość metod bezpośrednich jest najwyższa w pierwszym tygodniu zakażenia [8].

Dotychczas udokumentowano szereg przypadków zakażeń HGA poprzez transfuzję w USA, a badania 992 dawców krwi z Connecticut i Wisconsin wykazały obecność przeciwciał dla *A. phagocytophilum* u 0,4% do 0,9% osób. Brak procedur do kontroli produktów krwi w kierunku zakażenia *A. phagocytophilum,* stąd w latach 2007–2015 odnotowano co najmniej 9 przypadków występowania anaplazmozy nabytej poprzez transfuzję zakażonych produktów krwiopochodnych, zawierających zredukowaną liczbę leukocytów [2, 6].

W Wisconsin w 2012 roku hospitalizowany z powodu ciężkich urazów mężczyzna otrzymał 25 składników krwi. W rozmazach krwi obwodowej pacjenta 16 dni po transfuzji zaobserwowano charakterystyczne morule. Rozpoznanie HGA potwierdzono również metodą PCR i wykryciem swoistych przeciwciał klasy IgM i IgG dla *A. phagocytophilum*. PCR dał wynik pozytywny w 22 dniu. Testy serologiczne były ujemne dla obydwu klas przeciwciał IgM i IgG od 14 do 23 dnia po transfuzji. Zbadano także próbki kontrolne wszystkich 12 dawców. Dostarczone sześć próbek kontrolnych od 52-letniej kobiety (dawcy koncentratów krwinek czerwonych i płytek krwi) dały wyniki wysoko dodatnie w klasie IgG; w jednej próbce wykryto DNA *A. phagocytophilum*. Kobieta pochodziła z Nowego Jorku, regionu endemicznego dla anaplazmozy. Zgłaszała ona ukąszenie kleszcza jesienią 2012 r. i deklarowała, że nie wyjeżdżała poza Nowy Jork w tym czasie. Zakażenie przeszła bezobjawowo i nie była leczona [53].

W 2015 opisano przypadek 34-letniej ciężarnej kobiety z Massachusetts z cechami β-talasemii. Kobieta otrzymała dziewięć transfuzji ubogoleukocytarnych koncentratów krwinek czerwonych. W 32 tygodniu ciąży zdiagnozowano u niej HGA związane z transfuzją krwi. Skutecznie leczona rifampicyną, urodziła zdrowe dziecko, które po porodzie miało ujemny wynik w kierunku HGA. Chory dawca krwi został zidentyfikowany i poddany odpowiednim procedurom [47]. W 2013 roku, opisano 64-letniego pacjenta z ostrym krwawieniem do przewodu pokarmowego. Był on hospitalizaowany i otrzymał 5 jednostek ubogoleukocytarnych krwinek czerwonych. Jego stan ustabilizował się i został wypisany. Po 2 dniach został przyjęty ponownie z bólem głowy, gorączką i dreszczami. W 5 dniu od ponownego przyjęcia wykryto u niego w rozmazie krwi obwodowej, polimorfojądrowe leukocyty zawierające morule z *A. phagocytophilum* [1]. Źródłem zakażenia *A. phagocytophilum*, może być ubogoleukocytarny koncentrat płytek krwi. A pozytywny wynik badania PCR i bardzo wysoki poziom swoistych przeciwciał klasy IgG, nawet przy braku przeciwciał klasy IgM, może wskazywać na aktywne zakażenie dawcy [1, 53].

W 2015 roku pojawiła się praca wskazująca, że zastosowanie filtrów leukoredukcyjnych w przygotowaniu produktów z krwi do transfuzji, znacząco redukuje, jednak nie eliminuje ryzyka zakażenia *A. phagocytophilum* [41]. W tym samym roku, opisano przypadek zakażenia *A. phagocytophilum* poprzez transfuzję koncentratów krwinek płytkowych, otrzymywanych metodą aferezy. Zakażenie *A. phagocytophilum* było potwierdzone pozytywnym wynikiem badania PCR i dodatnimi wynikami badań serologicznych jednego z 16 dawców oraz pozytywnym wynikiem badania PCR i serokonwersją u biorcy [13].

U przewlekle chorych zakażenie *A. phagocytophilum* może doprowadzić do śmierci. Tak było w 2018 roku w przypadku 78 letniego pacjenta z Nowego Jorku z niedoborem czynnika XI, który cierpiał również na chorobę wieńcową, zastoinową niewydolność serca, cukrzycę

i przewlekłą chorobę nerek. Po resekcji pęcherza moczowego (nowotwór), ze względu na nawracający krwiomocz i objawową niedokrwistość podano mu dwanaście jednostek ubogoleukocytarnych czerwonych krwinek (napromieniowanych). Pacjent otrzymał także 14 transfuzji osocza, aby utrzymać odpowiedni poziom czynnika XI. W 20. dniu pobytu w szpitalu, niespodziewanie zaczął gorączkować, pojawił się u niego częstoskurcz i niedociśnienie. Pobrano posiewy, a pacjentowi podano leki przeciwbakteryjne o szerokim spektrum działania (piperacylina / tazobaktam i wankomycyna). Pomimo leczenia i ujemnych posiewów krwi, moczu i gardła, pacjent nadal gorączkował, miał duszność, niedotlenienie i zwiększone stężenia troponiny. Rozwinęła się także małopłytkowość i leukopenia. W 4 dniu gorączki zaobserwowano skupiska bakterii w obrębie granulocytów obojętnochłonnych, odpowiadające obrazowi zakażenia *A. phagocytophilum*. Pacjentowi podano doksycyklinę (100 mg dożylnie co 12 godzin) i pobrano krew na badania w kierunku anaplazmozy. Pacjent doznał wstrząsu septycznego, niewydolności wielonarządowej i zmarł 24 godziny po rozpoczęciu podawania doksycykliny. Wyniki testu immunofluorescencyjnego przeciwciał dla *A. phagocytophilum* pozostały ujemne. W bioptatach śledziony i próbkach szpiku kostnego wykryto metodą PCR fragmenty DNA *A. phagocytophilum*. Dawca został odsunięty od pobrań krwi na 90 dni [15].

Wszystkie powyższe przypadki wskazują, że ograniczenia w medycynie transfuzyjnej wynikające z braku odpowiednich badań przesiewowych w kierunku *A. phagocytophilum*, a także braku zaleceń tych badań przed podaniem krwi biorcy, stanowią poważny problem, a zarazem wyzwanie dla lekarzy. Ich wdrożenie nie jest rozważane, ponieważ przeniesienie zakażenia *A. phagocytophilum* w czasie transfuzji, uważa się za niezwykle rzadkie zdarzenie.

5. Zakażenia *Bartonella* sp.

Bakterie z rodzaju *Bartonella* to Gram-ujemne bakterie dobrze przystosowane do wewnątrzkomórkowego pasożytnictwa, zwykle wywołujące przewlekłe, bezobjawowe zakażenia. U ludzi *Bartonella* spp. mogą wywoływać u osób immunokompetentnych, takie choroby jak: choroba kociego pazura, gorączka okopowa, a u osób z obniżoną odpornością angiomatoza bakteryjna (*bacillary angiomatosis*), zapalenie wsierdzia, zapalenie wielostawowe lub *peliosis hepatitis*. Bakterie te były wyizolowane od wielu gatunków zwierząt, takich jak koty, psowate, gryzonie, przeżuwacze. Są przenoszone głównie przez bezpośredni kontakt uszkodzonej skóry ze śliną (zadrapania i ugryzienia zwierząt) lub przez stawonogi, takie jak: muchy, pchły, wszy i kleszcze [9]. Scharakteryzowanych jest co najmniej 40 gatunków lub podgatunków *Bartonella* spp. Wspólną cechą łączącą różne gatunki *Bartonella* spp. jest ich hemotropowy cykl życiowy związany ze zdolnością do przeżywania i namnażania się wewnątrz erytrocytów. W jego wyniku dochodzi do odtworzenia około 15 komórek potomnych. Do pobierania składników odżywczych wykorzystuje białka wiążące hem (Hbps) i *locus* wykorzystania hemu [37, 46]. Bakterie wewnątrz erytrocytu są chronione zarówno przed humoralną, jak i komórkową odpowiedzią immunologiczną. To unikalne przystosowanie do kolonizacji także zwiększa szanse na przeniesienie do innych gospodarzy przez krew. Wiadomo, że *B. henselae* może przetrwać do 35 dni w krwinkach czerwonych przechowywanych w temperaturze 4°C [31]. *B. bacciliformis* może przeżyć nawet 24–30 miesięcy przechowywania w temperaturze 4°C w próbkach krwi obwodowej od pacjentów z kliniczną diagnozą choroby Carriona [45].

Dane dotyczące częstości występowania DNA *Bartonella* spp. u dawców krwi różnią się. Wśród przebadanych w Chile metodą PCR i sekwencjonowaniem 140 próbek krwi dawców, w 13,6% z nich stwierdzono obecność fragmentów DNA *B. henselae*. Tak dużą liczbę wyników dodatnich, autorzy tłumaczą bardzo wysokim odsetkiem zakażonych tymi drobnoustrojami kotów w tym kraju [35]. W innym badaniu materiał genetyczny *Bartonella* spp. wykryto u 16 spośród 500 dawców krwi (3,2%). Amplifikacja i sekwencjonowanie DNA pozwoliły zidentyfikować u 15 z nich (3%) zakażenie *B. henselae*, a u jednego dawcy (0,2%) zakażenie *B. clarridgeiae*. Równoczesne analizy zebranych ankiet pokazały, że zakażenie krwi *B. henselae* lub *B. clarridgeiae* wiązało się z kontaktem z kotem lub historią ukłucia przez kleszcza. Kontakt z kotem zwiększał ryzyko wystąpienia bartonelozy trzykrotnie. Podobnie dawcy krwi pracujący w zawodach związanych ze zwierzętami, byli siedmiokrotnie bardziej podatni na zakażenie tymi patogennymi bakteriami. U szwedzkich dawców krwi, kontakt z kotami był również czynnikiem ryzyka wystąpienia zakażenia *B. elizabethae*. Dlatego wszystkie te czynniki ryzyka należy wziąć pod uwagę w kwalifikowaniu dawców [10].

Identyfikacja czynnika zakaźnego, jakim jest bakteria *Bartonella* spp. jest trudna. W Brazylii opisano przypadek 49-letniego mężczyzny, który przez trzy lata cierpiał na zespół mielodysplastyczny. W związku z chorobą pacjent potrzebował częstych transfuzji krwi. Po transfuzji wystąpiły u niego gorączka i ból brzucha. Stan ulegał poprawie dzięki dwóm cyklom dożylnej ciprofloksacyny. Prawie 120 dni po rozpoczęciu drugiego cyklu leczenia, stwierdzono u niego utratę masy ciała o 16 kg i gorączkę. Przeprowadzone badania przesiewowe pod kątem gorączki niewiadomego pochodzenia, w tym zakażenia bartonellami, nie przyniosły rezultatu. U pacjenta nastąpiła poprawa po otrzymaniu

doustnej doksycykliny i dożylnej ciprofloksacyny. Po 15 dniach pacjent został wypisany z zaleceniem czteromiesięcznej doustnej kuracji doksycykliną i ciprofloksacyną. Osiem miesięcy po antybiotykoterapii pacjent otrzymał allogeniczny przeszczep szpiku kostnego. Pięć dni po przeszczepie pacjent znów zaczął gorączkować i zmarł. Z próbki krwi pobranej przed śmiercią, ponownie przeprowadzono badania mikrobiologiczne i molekularne. Badania molekularne z krwi były ujemne, ale w hodowli na podłożu stałym (agar Bordet-Gengou z 30% krwią baranią) wykazano wzrost *B. henselae*. Identyfikację szczepu potwierdzono sekwencjonowaniem [11].

6. Babeszjoza

Babeszjoza, zaliczana do grupy tzw. nowo pojawiających się chorób infekcyjnych (emerging infectious diseases), jest wywoływana przez wewnątrzkrwinkowe pierwotniaki *Babesia*. Naturalnym rezerwuarem tych pierwotniaków są zwierzęta [60]. Zwykle zarażenie jest wynikiem ukłucia przez kleszcza z rodzaju *Ixodes*, który należy do kompetentnych wektorów tych pasożytów, ale może też być przeniesione z człowieka na człowieka drogą krwionośną [22]. Babeszjozę u ludzi powoduje kilka z ponad stu dotychczas opisanych gatunków tych pierwotniaków. Do najczęściej spotykanych należą zarażenia *Babesia microti*, które stanowią większość spośród około 2000 odnotowywanych rocznie przypadków babeszjozy, występującej endemicznie w niektórych regionach Stanach Zjednoczonych [25]. W innych częściach świata przypadki zarażeń tym gatunkiem stwierdzane są sporadycznie, przy czym tylko trzy, w tym dwa bezobjawowe, dotychczas opisano w Europie [20, 56].W krajach europejskich czynnikiem etiologicznym objawowej babeszjozy jest głównie *Babesia divergens* – około 50 dotychczas rozpoznanych przypadków [16, 21, 64]. W badaniach retrospektywnych belgijskich pacjentów z historią ukłucia przez kleszcza i klinicznymi objawami chorób odkleszczowych, obecność przeciwciał przeciwko *B. divergens* wykryto u około 33% zbadanych. Więcej, bo około 40% osób w tej grupie posiadało przeciwciała przeciwko *B. venatorum* [18, 29]. Pojedyncze przypadki zarażeń *B. venatorum* stwierdzono w takich krajach jak: Włochy, Austria, Szwecja, Niemcy i Francja [19, 36]. Tereny endemiczne dla tego gatunku *Babesia* występują na terenie Azji, gdzie wykrywane są też zarażenia *B. microti* oraz przypadki inwazji nowymi dla człowieka szczepami/genogatunkami *Babesia. B. duncani* jest czynnikiem etiologicznym sporadycznych zachorowań w Stanach Zjednoczonych.

Okres inkubacji babeszjozy *B. microti* wynosi od 1 do 4 tygodni po ukłuciu przez kleszcza, a po transfuzji od 1 do 9 tygodni i w rzadkich przypadkach może trwać nawet do 6 miesięcy [3, 19]. Zarażenie może przebiegać bezobjawowo lub z towarzyszeniem objawów grypopodobnych. Początkowo pojawia złe samopoczucie, następnie najczęściej: gorączka do 40°C, której towarzyszą dreszcze i poty, bóle głowy i bóle mięśniowe. U osób immunokompetentnych objawy chorobowe ustępują zwykle bez leczenia w okresie dwóch tygodni, jednak złe samopoczucie i znużenie mogą utrzymywać się przez wiele miesięcy. W laboratoryjnych badaniach krwi u chorych na babeszjozę można stwierdzić niski hematokryt i poziom hemoglobiny, podwyższoną liczbę retikulocytów, obniżony poziom płytek krwi. U pacjentów z obniżoną odpornością spowodowaną: zaawansowanym wiekiem, wcześniactwem, asplenią, zakażeniem HIV/AIDS, stosowaniem środków immunosupresyjnych, przebieg babeszjozy jest ciężki, obarczony dużym ryzykiem powikłań, takich jak: niedokrwistość hemolityczna, wykrzepianie wewnątrznaczyniowe, ostre zespoły niewydolności oddechowej i sercowo-naczyniowej. W badaniach laboratoryjnych u chorych z przebiegiem ciężkim we krwi stwierdzany jest podwyższony poziom enzymów wątrobowych, a w moczu: hematuria, hemoglobinuria i urobilinogen. Ponieważ większość biorców preparatów krwi stanowią osoby hospitalizowane ze współwystępującymi chorobami, w tej grupie odsetek przypadków śmiertelnych babeszjozy potransfuzyjnej osiąga niekiedy 20% [5, 23].

W celu potwierdzenia przypadku babeszjozy niezbędne jest wykonanie badania krwi obwodowej. Złoty standard diagnostyczny nadal stanowią badania mikroskopowe rozmazów krwi zabarwionych barwnikiem Giemsy, które przy niskiej parazytemii, 1–10% zarażonych krwinek, muszą być kilkukrotnie powtarzane w kolejnych dniach w odstępach 8–12 godzinnych. Zastosowanie metod molekularnych znacząco zwiększa swoistość i czułość badania, pozwalając wykryć parazytemię na poziomie 0,0001%. Jednak na rynku europejskim nadal niedostępne są wystandaryzowane testy komercyjne, pozwalające wykryć wszystkie chorobotwórcze dla człowieka *Babesia* [44, 50].

Stwierdzono, że spośród chorób pasożytniczych przenoszonych przez krew, babeszjoza stanowi największe zagrożenie dla bezpieczeństwa krwiodawstwa [28]. Dawka inwazyjna *Babesia* jest niska, dla osób z dysfunkcjami układu immunologicznego poddawanych transfuzji zagrożenie może stanowić nawet pojedynczy zarażony erytrocyt. Dotychczas nie opracowano metod inaktywacji piroplazm obecnych w krwinkach. Wewnątrz krwinek *Babesia* pozostają żywotne po zastosowaniu konwencjonalnych metod redukcji czynników chorobotwórczych, takich jak napromieniowywanie, kriokonserwacja czy leukoredukcja [17, 28].

Problem potransfuzyjnej babeszjozy jest najbardziej widoczny w Stanach Zjednoczonych, gdzie stały wzrost

rejestrowanych przypadków niejako wymusza podejmowanie działań prewencyjnych [26].

Podstawowym narzędziem oceny ryzyka przeniesienia patogenów przez donacje krwi zakażonych dawców nadal pozostaje kwestionariusz zawierający pytania dotyczące: pobytu na terenach endemicznego występowania choroby, zachorowania na babeszjozę, epizodów pokłucia przez kleszcze. Jednak częsty brak świadomości dawcy o przebyciu babeszjozy, spowodowany brakiem charakterystycznych objawów klinicznych i występowaniem zarażeń bezobjawowych, sprawia, że taki system weryfikacji dawców jest niewystarczający [30]. Swoje ograniczenia, nie tylko ekonomiczne, mają także przesiewowe badania dawców krwi. Wykrycie przeciwciał przeciwko *B. microti* nie jest równoznaczne z aktywnym zarażeniem, gdyż mogą się one utrzymywać długo po przechorowaniu lub próba mogła zostać pobrana w czasie trwania tzw. okna serologicznego. Badania za pomocą metod molekularnych są także obarczone błędem, ze względu na limit detekcji DNA pasożyta, określony przez niewielką ilość próbki przeznaczonej do badań przy występującej u bezobjawowych dawców niskiej parazytemii [30, 54]. Jednak wyniki badań przesiewowych donacji krwi, przeprowadzone w latach 2012–2018 przez Amerykański Czerwony Krzyż, z wykorzystaniem testów firmy IMUGEN, w ramach procedury kontrolnej FDA dla nowych produktów medycznych, wykazały skuteczność takich badań w ograniczaniu ryzyka występowania babeszjozy potransfuzyjnej na terenach endemicznych [52]. Między innymi na ich podstawie, w maju 2019 r. przedstawiono nowe rekomendacje dotyczące redukcji ryzyka występowania przypadków babeszjozy przenoszonej przez transfuzje w Stanach Zjednoczonych. Wśród nich, znalazł się zmodyfikowany kwestionariusz dla dawców oraz badania laboratoryjne każdej donacji z terenów endemicznych z wykorzystaniem testu molekularnego do detekcji DNA *Babesia microti*, zaaprobowanego przez FDA (Imugen Babesia microti Nucleic Acid Test). Zarekomendowano także wykorzystanie licencjonowanych na terenie USA systemów redukcji *Babesia* w preparatach płytek krwi i plazmy [42, 55].

Pomimo występowania w środowisku *Babesia* chorobotwórczych dla ludzi, ze względu na niską liczbę występujących zarażeń na terenie Europy, nie podjęto szczególnych regulacji dotyczących bezpieczeństwa krwiodawstwa. Odnotowane w ankiecie przechorowanie babeszjozy jest podstawą do dyskwalifikacji stałej dla kandydatów na dawców krwi lub dawców krwi allogenicznej oraz przeciwwskazaniem do jej pobrania.

7. Podsumowanie

Przewiduje się, że zmiany klimatyczne na świecie, w tym też w Polsce spowodują rozszerzenie zasięgu występowania wektorów chorób zakaźnych, wydłużenie okresu ich aktywności oraz zwiększenie wielkości populacji. Zjawiska te, w połączeniu ze zwiększająca się mobilnością ludzi, ułatwiają szybsze wprowadzanie i rozprzestrzenianie się chorób wektorowych. Wskazuje to na zasadność rozważenia możliwości wprowadzenia do kwestionariusza dodatkowego pytania dotyczącego ekspozycji na kleszcze, szczególnie na obszarach geograficznych ich endemicznego występowania. W przypadkach uzasadnionych, właściwe jest zastosowanie zatwierdzonych metod diagnostycznych do monitorowania jałowości preparatów krwi w kierunku czynników chorób odkleszczowych. Dodatkowo niezbędne jest monitorowanie środowiska poprzez aktywny nadzór, pod kątem pojawienia się nowych rezerwuarów i wektorów czy zmian w sposobie transmisji drobnoustrojów, co docelowo także może przyczynić się do zminimalizowania zagrożenia u biorców krwi.

Tabela I
Okresy inkubacji i obecności we krwi oraz przeżywalności w preparatach krwiopochodnych chorobotwórczych drobnoustrojów przenoszonych przez kleszcze

Drobnoustrój	Okres		Żywotność w preparatach krwi (liczba dni/ temperatura)
	Inkubacji choroby	Bakteriemii/parazytemii	
Borrelia burgdorferi sensu lato	do kilku tygodni (średnio 10 dni)	od 10 dnia do kilku tygodni	36/4°C
Borrelia myiamotoi	od 4 do 20 dni	brak danych	42/4°C
Rickettsia spp. (Spotted Fever Group)	5–15 dni (średnio 7–10 dni)	do 2 tygodni od pojawienia się gorączki	14°C
Anaplasma phagocytophilum	10–14 dni	od kilku dni do 2–3 tygodni	18/2–8°C
Bartonella spp.	ok. 3 tygodnie (14–30 dni)	od 3–4 dnia zakażenia do kilku dni-tygodni	35/4°C
Babesia microti	1–9 tygodni, w rzadkich przypadkach do 6 miesięcy (potransfuzyjna) 1–6 tyg. po ukłuciu przez kleszcza	powyżej roku u pacjentów leczonych, powyżej dwóch lat u osób nieleczonych, możliwe nawroty choroby	3/~25°C i 21/4°C

Piśmiennictwo

1. Alhumaidan H., Westley B., Esteva C., Berardi V., Young C., Sweeney J.: Transfusion-transmitted anaplasmosis from leukoreduced red blood cells. *Transfusion*, **53**, 181–186 (2013)
2. Bakken J.S., Dumler J.S.: Human granulocytic anaplasmosis. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* **29**, 341–355 (2015)
3. Bloch E.M., Kumar S. Krause P.J.: Persistence of *Babesia microti* infection in Humans. *Pathogens*, **8**, 102 (**2019**)
4. Brouqui P., Parola P., Fournier P.E., Raoult D.: Spotted fever rickettsioses In southern and eastern Europe. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. **49**, 2–12 (2007)
5. Bush M.P., Bloch E.M., Kleinman S.: Prevention of Transfusion Transmitted Infections. *Blood*, DOI 10.1182/blood-2018-11-833996 (2019)
6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC): *Anaplasma phagocytophilum* transmitted through blood transfusion-Minnesota, 2007. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep*. **57**, 1145–1148 (2008)
7. Chmielewski T., Tylewska-Wierzbanowska S.: Prevalence of *Borrelia burgdorferi* antibodies in healthy population in Poland. *Przegl Epidemiol*. **56**, 33–38 (2002)
8. Choi S., Cho Y.U., Kim S.H.: Morulae in neutrophils: A diagnostic clue for human granulocytic anaplasmosis. *IDCases*, **14**, 15:e00506 (2019)
9. Deng H., Le Rhun D., Buffet J.P., Cotté V., Read A., Birtles R.J., Vayssier-Taussat M.: Strategies of exploitation of mammalian reservoirs by *Bartonella* species. *Vet. Res.* **43**, 1–15 (2012)
10. Diniz P.P., Velho P.E., Pitassi L.H., Drummond M.R., Lania B.G., Barjas-Castro M.L., Sowy S., Breitschwerdt E.B., Scorpio D.G.: Risk Factors for *Bartonella* species infection in blood donors from Southeast Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **21**, 10(3), e0004509 (2016)
11. Drummond M.R., Visentainer L., Almeida A.R., Angerami R.N., Aoki F.H., Velho P.E.N.F.: *Bartonella henselae* bacteremia diagnosed post-mortem in a myelodysplastic syndrome patient. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, **61**, e50 (2019)
12. Edginton S., Guan T.H., Evans G., Srivastava S. Human granulocytic anaplasmosis acquired from a blacklegged tick in Ontario. *CMAJ*, **26,** E363–E366 (2018)
13. Fine A.B., Sweeney J.D., Nixon C.P., Knoll B.M.: Transfusion--transmitted anaplasmosis from a leukoreduced platelet pool. *Transfusion*, **56**, 699–704 (2016)
14. Ginzburg Y., Kessler D., Kang S., Shaz B., Wormser G.P.: Why has *Borrelia burgdorferi* not been transmitted by blood transfusion? *Transfusion*, **11**, 2822–2826 (2013)
15. Goel R., Cushing M.M. i wsp.: Death from Transfusion-Transmitted Anaplasmosis, New York, USA, 2017. *Emerg. Infect. Dis.* **24**, 1548–1550 (2018)
16. Gray J., Zintl A., Hildebrant A., Hunfeld K.P., Weiss L.: Zoonotic babesiosis: overview of the disease and novel aspects of patogen identity, *Ticks Tick Borne Dis*. **1**, 3–10 (2010)
17. Gubernot D.M., Nakhasi H.L., Mied P.A., Asher D.M., Epstein J.S., Kumar S.: Transfusion-Transmitted babesiosis in the United States: summary of a workshop, *Transfusion*, **49**, 2759–2771 (2009)
18. Herwald B.L., Pieniazek N.J. i wsp.: Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organizm causing zoonotic babesiosis In Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 942–948 (2003)
19. Herwaldt B.L., Linden J.V., Bosserman E., Young C., Olkowska D., Wilson M.: Transfusion-associated babesiosis in the United States: a description of cases. *Ann. Intern. Med.* **155**, 509–519 (2011)
20. Hildebrand A., Gray J.S., Hunfeld K.P.: Human babesiosis in Europe: what clinicians reed to know. *Infection*, **41**, 1057–1072 (2013)
21. Hunfeld K.P., Hildebrant A., Gray J.S.: Babesiosis: recent insights into an ancient disease. *Int. J. Parasitol.* **38**, 1219–1237 (2008)
22. Kjemtrup A.M., Conrad P.A.: Human babesiosis: an emerging tick-borne disease, *Int. J. Parasitol*. **30**, 1323–1337 (2000)
23. Krause P.J.: Human babesiosis. *Int. J. Parasitol*. **49**, 165–174 (2019)
24. Krause P.J., Hendrickson J.E., Steeves T.K., Fish D.: Blood transfusion transmission of the tick-borne relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in mice. *Transfusion*, **55**, 593–597 (2015)
25. Krause P.J., Spielman A. i wsp.: Increasing health burden of human babesiosis in endemicsites. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. **68**, 431–436 (2003)
26. LeBel II D.P., Moritz E.D.,O'Brien J.J., Lazarchick J., Tormos L.M., Duong A., Fontaine M.J., Squires J.E., Stramer S.L.: Cases of transfusion-transmitted babesiosis occurring in non endemic areas: a diagnostics dilemma. *Transfusion*, **57**, 2348–2354 (2017)
27. Leiby D.A., Gill J.E.: Transfusion-transmitted tick-borne infections: a cornucopia of threats. *Transfus. Med. Rev*. **18**, 293–306 (2004)
28. Leiby A.D., O'Brien S.F., Wendel S., Nguyen L.M., Delage G., Devare G.S., Hardiman A., Nakhasi L.H., Sauleda S., Bloch M.E.: International survey on the impact of parasitic infections: frequency of transmission and current mitigation strategies. *Vox Sanguinus*, **114**, 17–27 (2019)
29. Lempereur L., Shiels B., Heyman P., Moreau E., Saegerman C., Losson B., Malandrin L.: A retrospective serological survey on human babesiosis in Belgium. *Clin. Microbiol. Infect.* **21**, 96.e1–7 (2015)
30. Lobo C.A., Cursino-Santos J.R., Alhassan A., Rodrigues M.: *Babesia*: An emerging infectious threat in transfusion in medicine. *Plos Pathog.* **9**, 1–3 (2013)
31. Magalhães R.F., Pitassi L.H., Salvadego M., de Moraes A.M., Barjas-Castro M.L., Velho P.E.: *Bartonella henselae* survives after the storage period of red blood cellunits: is it transmissible by transfusion? *Transfus. Med.* **18**, 287–291 (2008)
32. McFee R.B.: Tick borne illness – Anaplasmosis. *Dis. Mon*. **64**, 181–184 (2018)
33. Nadelman R.B., Sherer C., Mack L., Pavia C.S., Wormser, G.P.: Survival of *Borrelia burgdorferi* in human blood stored under blond banking conditions. *Transfusion*, **30**, 298–301 (1990)
34. Nowakowski J., McKenna D., Nadelman R.B., Bittker S., Cooper D., Pavia C., Holmgren D., Visintainer P., Wormser G.P.: Blood cultures for patients with extracutaneous manifestations of Lyme disease in the United States. *Clin. Infect. Dis.* **49**, 1733–1735 (2009)
35. Núñez M.A., Contreras K., Depix M.S., Geoffroy E., Villagra N., Mellado S., Salinas A.M.: Prevalence of *Bartonella henselae* in blood donors and risk of blond transmission in Chile. *Rev. Chilena Infectol.* **34**, 539–543 (2017)
36. Paleau A., Candolfi E., Souply L., De Briel D., Delarbre J.M., Lipsker D., Jouglin M., Malandrin L., Hansmann Y., Martinot M.: Human babesiosis in Alsace. *Med. Mal Infect.* doi: 10.1016/j.medmal.2019.08.007. (2019)
37. Parrow N.L., Abbott J., Lockwood A.R., Battisti J.M., Minnick M.F.: Function, regulation, and transcriptional organization of the hemin utilization *locus* of *Bartonella quintana*. *Infect. Immun.* **77**, 307–316 (2009)
38. Pascoe E.L., Stephenson N., Abigana A., Clifford D., Gabriel M., Wengert G., Brown R., Higley M., Bloch E.M., Foley J.E.: Human Seroprevalence of Tick-Borne *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, and *Rickettsia* Species in Northern California. *Vector Borne Zoonotic Dis.* doi: 10.1089/vbz.2019.2489 (2019)
39. Perkins H.A., Busch M.P.: Transfusion-associated infections: 50 years of relentless challenges and remarkable progress. *Transfusion*, **50**, 2080–2099 (2010)

40. Pollack R.J., Telford S.R. 3rd, Spielman A.: Standardization of medium for culturing Lyme disease spirochetes. *J. Clin. Microbiol.* **31**:1251–1255 (1993)
41. Proctor M.C., Leiby D.A. Do leukoreduction filters passively reduce the transmission risk of human granulocytic anaplasmosis? *Transfusion*, **55**, 1242–1248 (2015)
42. Recomendations for reducing the risk of transfusion-transmitted babesiosis guidance for industry, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Docket Number: FDA-2018-D-2478 (2019)
43. Richards A.L.: Worldwide detection and identification of new and old rickettsiae and rickettsial diseases. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **64**, 107–110 (2012)
44. Rożej-Bielicka W., Masny A., Gołąb E.: High-resolution melting PCR assay, applicable for diagnostics and screening studies, allowing detection and differentiation of several Babesia spp. infecting humans and Animals. *Parasitol. Res.* **116**, 2671–2681 (2017)
45. Ruiz J., del Valle J. i wsp.: Long time survival of *Bartonella bacilliformis* in blood stored at 4°C. A risk for blood transfusions. *Blood Transfus.* **10**, 563–564 (2012)
46. Saenz H.L., Engel P., Stoeckli M.C., Lanz C., Raddatz G., Vayssier-Taussat M., Birtles R., Schuster S.C., Dehio C.: Genomic analysis of *Bartonella* identifies type IV secretion systems as host adaptability factors. *Nat. Genet.* **39**,1469–1476 (2007)
47. Shields K., Cumming M., Rios J., Wong M.T., Zwicker J.I., Stramer S.L., Alonso C.D.: Transfusion-associated *Anaplasma phagocytophilum* infection in a pregnant patient with thalassemia trait: a case report. *Transfusion*, **55**, 719–25 (2015)
48. Stanek G., Strle F.: Lyme borreliosis-from tick bite to diagnosis and treatment. *FEMS Microbiol. Rev.* **42**, 233–258 (2018)
49. Stanek G., Wormser G.P., Gray J., Strle F.: Lyme borreliosis. *Lancet*, **9814**, 461–473 (2012)
50. Teal A.E., Habura A., Ennis J., Keithly J.S., Madison-Antenucci S.A.: New real-time PCR assay for improveddetection of the parasite *Babesia microti*. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 903–908 (2012)
51. Thorp A.M., Tonnetti L.: Distribution and survival of *Borrelia miyamotoi* in human blood components. *Transfusion*, **56**, 705–711 (2016)
52. Tonetti L., Townsend R.L., Deisting B.M., Haynes J.M., Dodd R.Y., Stramer L.S.: The impact of *Babesia microti* blood donation screening, *Transfusion*, **59**, 593–600 (2019)
53. Townsend R.L., Moritz E.D., Fialkow L.B., Berardi V., Stramer S.L.: Probable transfusion-transmission of *Anaplasma phagocytophilum* by leukoreduced platelets. *Transfusion*, **54**, 2828–2832 (2014)
54. Villatoro T., Karp Katz J.: Transfusion – Transmitted Babesiosis, *Arch. Pathol. Lab. Med.* **143**, 130–134 (2019)
55. Ward S.J., Stramer S.L., Szczepiorkowski Z.M.: Assessing the risk of *Babesia* to the United States blood supply using a risk--based decision-making approach: Report of AABB's Ad Hoc Babesia Policy Working Group (original report). *Transfusion*, **58**, 1916–1923 (2018)
56. Welc-Falęciak R., Pawełczyk A., Radkowski M., Pancewicz S.A., Zajkowska J., Siński E.: First report of two asymptomatic cases of human infection with *Babesia microti* (Franca 1910) in Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* **22**, 51–54 (2015)
57. Wells G.M., Woodward T.E., Fiset P., Hornick R.B.: Rocky mountain spotted fever caused by blood transfusion. *JAMA*, **239**, 2763–2765 (1978)
58. Wilking H., Fingerle V., Klier C., Thamm M., Stark K.: Antibodies against *Borrelia burgdorferi* sensu lato among adults, Germany, 2008–2011. *Emerg. Infect. Dis*. **21**, 107–110 (2015)
59. Wormser G.P., Bittker S., Cooper D., Nowakowski J., Nadelman R.B., Pavia C.: Yield of large-volume blood cultures in patients with early Lyme disease. *J. Infect. Dis.* **184**, 1070–1072 (2001)
60. Wormser G.P., Liveris D., Nowakowski J., Nadelman R.B., Cavaliere L.F., McKenna D., Holmgren D., Schwartz I.: Association of specific subtypes of *Borrelia burgdorferi* with hematogenous dissemination in early Lyme disease. *J. Infect. Dis.* **180**, 720–725 (1999)
61. Wormser G.P., McKenna D., Carlin J., Nadelman R.B., Cavaliere L.F., Holmgren D., Byrne D.W., Nowakowski J.: Brief communication: hematogenous dissemination in early Lyme disease. *Ann. Intern. Med.* **142**, 751–755 (2005)
62. Yabsley M.J., Shock B.C.: Natural history of zoonotic *Babesia*: Role of wildlife reservoirs. *Int. J. Parasit. Parasites Wildl.* **2**, 18–31(2013)
63. Zákutná L., Dorko E., Rimárová K., Kizeková M.: Pilot cross--sectional study of three zoonoses (Lyme disease, tularaemia, leptospirosis) among healthy blood donors in Eastern Slovakia. *Cent. Eur. J. Public. Health*, **23**, 100–106 (2015)
64. Zintl A., Mulcahy G., Skerrett H.E., Taylor S.M., Gray J.S.: *Babesia divergens*, a bosine blond parasite of veterinary and zoonotic importance. *Clin. Microbiol. Rev*. **16**, 622–636 (2003)

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2020, 59, 2, 139–151
DOI: 10.21307/PM-2020.59.2.011

CRONOBACTER SPP. – POWAŻNE ZAGROŻENIE W ŻYWNOŚCI DLA NIEMOWLĄT

Mateusz Gemba, Elżbieta Rosiak*, Danuta Kołożyn-Krajewska

Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Wpłynęło w listopadzie 2019 r., zaakceptowano w kwietniu 2020 r.

Streszczenie: *Cronobacter* spp. uznawane są za oportunistyczne patogeny we wszystkich grupach wiekowych, szczególnie u wcześniaków, niemowląt z niską masą urodzeniową, osób w wieku podeszłym i osób z obniżoną odpornością. Obecnie rodzaj *Cronobacter* obejmuje siedem gatunków: *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjesii*, *C. universalis*, *C. dublinensis* i *C. condimenti*. Trzy pierwsze gatunki *Cronobacter* zostały skojarzone z infekcjami klinicznymi noworodków i wcześniaków. Zakażenia bakteriami *Cronobacter* mogą powodować zapalenie komórek nerwowych, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, tworzyć ropnie i torbiele mózgu prowadzące do wodogłowia oraz martwicze zapalenie jelit. Chociaż zakażenia wywołane przez *Cronobacter* spp. są rzadkie to współczynnik śmiertelności jest bardzo wysoki, jak również koszty związane z długoterminowym leczeniem powikłań po infekcji. *Cronobacter* spp. dzięki produkcji otoczek i biofilmu, termotoleracyjności jest odporny na wysuszenie i wykazuje przeżywalność w mieszankach mlekozastępczych i innych produktach o niskiej aktywności wody. *Cronobacter* spp. izolowano z warzyw, zbóż, płatków, ziemniaków, przypraw, mięsa, ryb, sera, tofu, ryżu, makaronu, czekolady, herbaty oraz z powierzchni abiotycznych w środowisku szpitalnym, z przedmiotów i sprzętu medycznego Na podstawie Rozporządzenia (WE) nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005, z późniejszymi zmianami, *Cronobacter* spp. powinien być nieobecny w trzydziestu 10 g próbkach preparatów w proszku do początkowego żywienia niemowląt i żywności dietetycznej w proszku specjalnego przeznaczenia medycznego, przeznaczonego dla niemowląt w wieku do 6 miesięcy. W pracy podjęto temat oceny występowania zagrożenia powodowanego przez bakterie *Cronobacter* w żywności w świetle obowiązujących wymagań.

1. Wprowadzenie. 2. Objawy i chorobotwórczość *Cronobacter* spp. 3. Wymagania przepisów prawa. 4. Mechanizmy wirulencji *Cronobacter* spp. 5. Taksonomia *Cronobacter* spp. 6. Występowanie *Cronobacter* spp. w żywności. 7. Oporność *Cronobacter* spp. na warunki stresowe. 8. Tworzenie biofilmu przez bakterie z rodzaju *Cronobacter*. 9. Wykrywanie i oznaczanie liczby *Cronobacter* spp. 10. Antybiotykooporność *Cronobacter* spp. 11. Podsumowanie

CRONOBACTER SPP. – THE SERIOUS RISK IN A BABY FOOD

Abstract: *Cronobacter* spp. are considered opportunistic pathogens in all age groups, especially in premature babies, children with low birth weight, the elderly and immunocompromised people. Currently, the genus *Cronobacter* includes seven species: *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjesii*, *C. universalis*, *C. dublinensis* and *C. condimenti*. The first three species of *Cronobacter* have been associated with clinical infections of newborns and premature babies. *Cronobacter* bacterial infections can cause neuritis, encephalomyelitis, the formation of abscesses and cysts of the brain leading to hydrocephalus and necrotizing enterocolitis. Often infected with *Cronobacter* spp. are rare, the mortality rate is very high, as well as the costs associated with temporarily treating post-infection complications. *Cronobacter* spp. due to the production of capsule and biofilm, high thermotolerance is resistant to drying and survival loads in milk replacers and other products with water activity. *Cronobacter* spp. isolated from milk replacers used for the initial feeding of infants, with vegetables, cereals, potatoes, spices, meat, fish, cheese, tofu, rice, pasta, chocolate, tea and abiotic surfaces in a hospital, with medical products and equipment. Under the Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005, *Cronobacter* spp. should be absent in thirty 10 g samples of infant formulas and infant dietetic powders intended for infants up to 6 months old. The subject of the study is the assessment of the occurrence the hazard caused by *Cronobacter* in food in the light of applicable requirements.

1. Introduction. 2. Symptoms and pathogenicity *Cronobacter* spp. 3. Legal requirements. 4. Virulence mechanism *Cronobacter* spp. 5. Taxonomy *Cronobacter* spp. 6. Occurrence *Cronobacter* spp. in food. 7. Resistance *Cronobacter* spp. to stress conditions. 8. Biofilm formation by bacteria genus *Cronobacter*. 9. Detection and determination of numbers *Cronobacter* spp. 10. Antibiotic resistance *Cronobacter* spp. 11. Summary

Słowa kluczowe: biofilm, chorobotwórczość, *Cronobacter* spp., wirulencja, wykrywanie
Key words: biofilm, pathogenicity, *Cronobacter* spp., virulence, detection

1. Wprowadzenie

Bakterie *Cronobacter* spp. to Gram-ujemne, względnie beztlenowe, ruchliwe, nieprzetrwalnikujące pałeczki, należące do rodziny *Enterobacteriaceae* [38, 56, 85]. Uznawane są za oportunistyczne patogeny we wszystkich grupach wiekowych, szczególnie u wcześniaków, niemowląt z niską masą urodzeniową, osób w wieku podeszłym i osób z obniżoną odpornością [2, 43, 97]. Nazwa rodzaju *Cronobacter* pochodzi od imienia

* Autor korespondencyjny: Elżbieta Rosiak, Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, Wydział Żywienia Człowieka, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa; tel. 22 59 37 070;
e-mail: elzbieta_rosiak@sggw.edu.pl

jednego z greckich tytanów Kronosa, który połykał wszystkie swoje dzieci po urodzeniu. Obecnie rodzaj *Cronobacter* obejmuje siedem gatunków: *C. sakazakii, C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjesii*, *C. universalis*, *C. dublinensis* i *C. condimenti*. Trzy pierwsze gatunki *Cronobacter* zostały skojarzone z infekcjami klinicznymi noworodków i wcześniaków. *C. dublinensis*, *C. muytjesii* i *C. condimenti* mają prawdopodobnie małe lub znikome znaczenie kliniczne [2, 97].

Bakterie z rodzaju *Cronobacter* spp. zalicza się do patogenów odpowiedzialnych za występowanie na całym świecie rzadkich, ale zagrażających życiu chorób: zapalenia opon mózgowych, bakteriemii, kilku form martwiczego zapalenia jelit [2]. W roku 2002 International Commission for Microbiological Specifications for Food nadała *C. sakazakii* „status zagrożenia, w przypadku wybranych populacji, zagrażającego życiu lub powodującego znaczące przewlekłe, długoterminowe konsekwencje" zaliczając do tej samej kategorii patogenów żywnościowych co *Clostridium botulinum* (typ A i B), *Cryptosporidium parvum* i *Listeria monocytogenes* [2, 3, 38].

W roku 2005 weszło w życie Rozporządzenie Komisji (WE) 2073/2005 (zmienione w 2010 roku Rozporządzeniem (EU) 365/2010) w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych na mocy, którego istnieje obowiązek badania preparatów w proszku dla niemowląt (PIF-powdered infant formula) oraz żywności dietetycznej w proszku specjalnego medycznego przeznaczenia, stosowanej w żywieniu niemowląt do 6 miesiąca życia na obecność *Cronobacter* spp. Według tego Rozporządzenia bakterie *Cronobacter* spp. muszą być nieobecne w trzydziestu 10-gramowych porcjach produktu. Pozytywne na obecność *Cronobacter* spp. partie mieszanek mlekozastępczych powinny zostać wycofane z rynku bez konieczności wykonywania analiz przynależności do gatunku [2, 7, 38].

W pracy podjęto temat oceny występowania zagrożenia powodowanego przez bakterie *Cronobacter* spp. w żywności w świetle obowiązujących wymagań.

2. Objawy i chorobotwórczość *Cronobacter* spp.

Najbardziej narażone na zakażenia wywołane przez bakterie z rodzaju *Cronobacter* są noworodki poniżej 28 dnia życia, noworodki urodzone przedwcześnie, niemowlęta o niskiej masie urodzeniowej (poniżej 2,5 kg) i niemowlęta z upośledzeniem odporności [24, 43,74]. W USA zgłaszana zapadalność (częstość występowania infekcji wywołanych przez *Cronobacter* na 100 tysięcy niemowląt) wynosi 1, natomiast w przypadku niemowląt z niską masą urodzeniową ryzyko zakażenia wzrasta do 9,4 na 100 tysięcy niemowląt [33].

Po przekroczeniu bariery krew-mózg niektóre gatunki *Cronobacter*, m.in. *C. sakazakii* mogą wywołać zapalenie komórek nerwowych, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych oraz tworzyć ropnie i torbiele mózgu prowadzące do wodogłowia. Pierwsze przypadki zaplenia opon mózgowo-rdzeniowych związanych ze spożyciem zakażonych bakterią *C. sakazakii* mieszanek mleko zastępczych opisano w 1961 r. [93]. Wskaźnik śmiertelności niemowląt związany z noworodkowym zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych szacuje się na około 40–80% [18, 38]. W 94% przypadków u niemowląt, które przeżyły ropne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, wywołane zakażeniem *C. sakazakii*, choroba ta pozostawiała nieodwracalne powikłania neurologiczne m.in. wodogłowie, zaburzenia słuchu i wzroku oraz niedowład kończyn [18].

Pierwsze przypadki zakażeń bakterią *C. sakazakii* stwierdzono w Holandii w latach 1977–1981. Doszło wówczas do zakażenia ośmiorga niemowląt bakterią *C. sakazakii*, z których przeżyło dwoje [65]. W Islandii w latach 1986–1987 odnotowano trzy przypadki zakażenia *C. sakazakii*. Jedno z niemowląt nie przeżyło. U drugiego dziecka doszło do znaczącego upośledzenia rozwoju psychicznego i fizycznego. U trzeciego niemowlęcia stwierdzono powikłania w postaci zespołu napadów padaczkowych i opóźnień w rozwoju [9]. W latach 1993–1998 odnotowano 4 przypadki zakażeń niemowląt w Izraelu. Bakterie z gatunku *C. sakazakii* wyizolowano m.in. z miksera używanego do przygotowania mieszanki mlekozastępczej [10]. W okresie od czerwca do lipca 1998 roku doszło do zakażenia dwunastu noworodków w Belgii. Dzieci miały masę urodzeniową < 2000 g i karmione były mieszanką mlekozastępczą. Dwoje noworodków zmarło [94].

Pozostałe, wybrane przypadki infekcji wywołane bakteriami z rodzaju *Cronobacter* spp. przedstawiono w tabeli I. Mimo rosnącej świadomości zagrożenia zachorowania wciąż się zdarzają, potwierdza to m.in. przypadek z 2015 roku z Australii, gdzie w wyniku zakażenia *C. sakazakii* zmarło niemowlę. Bakterię wyizolowano z mleka matki, które było odciągane ręcznym laktatorem. Izolaty bakterii obecne we krwi niemowlaka i w mleku matki były identyczne, co potwierdza, że noworodek był narażony na patogen, poprzez konsumpcję mleka kobiecego (Tab. I) [61]. W 2016 roku w USA zdiagnozowano u noworodka sepsę. Niemowlę karmione było mlekiem kobiecym uzyskanym od dawczyni. Próby pobrane z płynu mózgowo-rdzeniowego i krwi wykazały obecność *C. sakazakii*. Bakterię wyizolowano również z laktatora używanego do odciągania pokarmu kobiecego (Tab. I) [11]. W 2017 roku w Brazylii w wyniku zakażenia *Cronobacter* spp. zmarł noworodek (urodził się w 35 tygodniu ciąży, karmiony był mlekiem matki oraz mieszanką mleko zastępczą). Wyizolowany z krwi *Cronobacter* spp. zidentyfikowano jako *C. sakazakii* ST494 [14]. Zeng i wsp. [101] opisali przypadek zakażenia chłopca bakterią *Cronobacter* spp.

Tabela I
Wybrane infekcje noworodków wywołane przez bakterie *Cronobacter* spp.

Rok	Kraj	Liczba chorych	Objawy/choroba	Skutek infekcji	Piśmiennictwo
1979	USA	1	Posocznica	Brak danych	[64]
1988	USA	4	Bakteriemia – 2 przypadki, zakażenie dróg moczowych – 1 przypadek, krwawa biegunka – 1 przypadek	Brak danych	[84]
1992	Indie	1	Zapalenie opon mózgowych	Śmierć	[80]
1994	Francja	13	Zapalenie opon mózgowych – 1 przypadek, posocznica – 1 przypadek, martwicze zapalenie jelit – 7 przypadków, brak objawów klinicznych – 4 przypadki	Śmierć – 4 przypadki	[6, 13]
1998	Belgia	12	Martwicze zapalenie jelit	Śmierć – 2 przypadki	[94]
1998	Brazylia	4	Bakteriemia	Brak danych	[22]
1998	Filipiny	12	Zakażenia dróg moczowych, bakteriemia	Brak danych	[22]
1999	USA	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Neurologiczne powikłania	[12]
2000	Izrael	2	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych – 1 przypadek Posocznica – 1 przypadek	Brak danych	[4]
2001	USA	4	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych – 3 przypadki Zakażenia dróg moczowych – 1	Śmierć – 1 przypadek	[22, 31, 86]
2002	Belgia	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Śmierć	[77]
2002	Brazylia	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Śmierć	[5]
2002	Indie	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Śmierć	[80]
2002	USA	5	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych – 3 przypadki Bakteriemia – 2 przypadki	Śmierć – 1 przypadek Powikłania neurologiczne – 2 przypadki	[22]
2003	USA	4	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych – 2 przypadki, Bakteriemia – 2 przypadki	Śmierć – 1 przypadki	[22]
2004	Nowa Zelandia	1	Zapalenie opon mózgowo- rdzeniowych – 1 przypadek	Śmierć – 1 przypadek	[44]
2004	Francja	4	Zapalenie opon mózgowych- 2 przypadki, krwotoczne zapalenie okrężnicy – 1 przypadek, zapalenie spojówek – 1 przypadek	Śmierć – 2 przypadki	[15, 78]
2004	USA	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Powikłania neurologiczne	[22]
2004	Holandia	1	Bakteriemia	Brak danych	[89]
2005	Słowenia	1	Posocznica	Brak danych	[73]
2005	USA	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Powikłania neurologiczne	[22]
2006	Hiszpania	1	Bakteriemia	Brak danych	[1]
2006	Szwajcaria	2	Zapalenie opon mózgowo- rdzeniowych – 2 przypadki	Śmierć – 2 przypadki	[60]
2006	USA	2	Zapalenie opon mózgowo- rdzeniowych – 2 przypadki	Powikłania neurologiczne	[11, 22]
2007	USA	7	Zapalenie opon mózgowych- 3 przypadki, bakteriemia – 3 przypadki, martwicze zapalenie jelit – 1 przypadek	Śmierć – 1 przypadek Powikłania neurologiczne – 10 przypadków	[22]
2007	Hiszpania	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Brak danych	[79]
2008	Japonia	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Powikłania neurologiczne	[22]
2008	USA	2	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Powikłania neurologiczne – 1 przypadek	[22]
2008	Kanada	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Brak danych	[22]
2008	Korea	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Brak danych	[48]
2010	Meksyk	2	Krwawa biegunka	Brak danych	[41]
2015	Australia	1	Bakteriemia	Śmierć	[61]
2015	Chiny	1	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Powikłania neurologiczne	[101]
2016	USA	1	Bakteriemia	Brak danych	[11]
2017	Brazylia	1	Ropień mózgu	Śmierć	[14]
2018	USA	1	Bakteriemia	Brak danych	[90]

Źródło: opracowanie własne.

w Chinach. W płynie mózgowo-rdzeniowym wykryto liczne leukocyty, a w mózgu ropnie. Podawano dożylnie antybiotyki: cetazydym, a następnie meropenem. Objawy kliniczne ustąpiły, jednak po 3 tygodniach stwierdzono upośledzony rozwój umysłowy i fizyczny dziecka. Z płynu mózgowo-rdzeniowego wyizolowano *C. sakazakii* ST256 serotyp O1 [101].

3. Wymagania przepisów prawa

Komunikację ryzyka, związanego z występowaniem bakterii *Cronobacter* spp. w żywności dla niemowląt, w Rozporządzeniu (WE) 2073 w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych z 15 listopada 2005 poprzedziły spotkania Komitetów Kodeksu Żywnościowego ds. Higieny Żywności (35 sesja w 2003) oraz Żywienia i Żywności Specjalnego Dietetycznego Przeznaczenia (24 sesja w 2003). Zadecydowano o rewizji obowiązującego Kodu Praktyk Higienicznych Żywności dla Niemowląt i Dzieci i zwrócono się do FAO i WHO o jak najszybsze zwołanie spotkania ekspertów w sprawie występowania *E. sakazakii* w mieszankach mlekozastępczych (PIF). Spotkanie ekspertów FAO/WHO odbyło się w lutym 2004 roku w Genewie. Poświęcone zostało bezpieczeństwu żywności dla niemowląt i małych dzieci oraz zapobieganiu potencjalnie ciężkim zakażeniom u niemowląt. Patogeny związane z mieszankami mlekozastępczymi, w wyniku przeprowadzonej oceny ryzyka, podzielono na trzy grupy wg ryzyka wystąpienia i skutków zdrowotnych. Pierwsza grupa to kategoria A – wysoki związek przyczynowo skutkowy zakażeń niemowląt w wyniku spożycia mieszanek mlekozastępczych. Do tej kategorii zaliczono *Salmonella* i *Cronobacter* spp. Do kategorii B – związek przyczynowo-skutkowy jest prawdopodobny, ale nie potwierdzony, zaliczono: *Escherichia coli*, *Escherichia vulneris*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter cloacae*, *Hafnia alvei*, *Pantoea agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Acinetobacter* spp. Kategoria C – związek przyczynowo-skutkowy mniej prawdopodobny lub jeszcze nie wykazany, to: *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* i *Bacillus cereus*. Opracowano model oceny ryzyka w celu opisania czynników prowadzących do zakażenia *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) u niemowląt oraz zidentyfikowania potencjalnych strategii ograniczania ryzyka. Opracowany model oceny ryzyka ułatwia także porównanie poziomu zanieczyszczenia produktu w zależności od sposobu przygotowania produktu, obrotu i karmienia. Ponadto zapewnia środki do oceny kryteriów mikrobiologicznych i planu pobierania próbek pod względem

Tabela II
Wybrane geny *Cronobacter* spp.

Gen	Działanie	Piśmiennictwo
Chorobotwórczość		
cpa	Aktywuje plazminogeny	[16]
sip	Wchodzi w interakcje siderforów	
hly	Wykazuje działanie hemolizujące	
ibeA	Aktywowanie śródbłonka naczyń mózgowych	[51]
ibeB		
yijP		
Wykorzystanie kwasu sjalowego		
nanAKT	Koduje wykorzystanie egzogennego kwasu sjalowego	[47]
Odporność na stres środowiskowy		
curliGR55	Zapewnia odporność komórek bakterii na niską aktywność wody	[26]
Tworzenie biofilmu		
flhE	Synteza rzęski	[27]
mgtB	Koduje czynniki wirulencji	
fliD	Synteza rzęski	
alsS	Koduje podstawowe procesy komórkowe	
flgJ	Synteza rzęski	
cyoD	Koduje podstawowe procesy komórkowe	
ftsK	Odgrywa kluczową rolę w podziałach komórkowych	
bcsC, bcs B, bcs A	Synteza celulozy	

Źródło: opracowanie własne.

redukcji ryzyka i odsetka odrzuconych partii produktów. Model oceny ryzyka szacuje względne ryzyko choroby wywołane przez *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) dla niemowląt z wewnętrznie skażonego PIF, nie bierze pod uwagę zanieczyszczenia i rekontaminacji ze środowiska lub innych źródeł po wytworzeniu. Ponadto opracowano szereg rekomendacji dla krajów członkowskich i organizacji pozarządowych (NGOs) uwzględniających m.in ustalenie odpowiednich specyfikacji mikrobiologicznych dla *E. sakazakii* w mieszankach mlekozastępczych oraz wskazanie *Enterobacteriaceae* zamiast *E. coli*, jako kryterium oceny higieny środowiska produkcyjnego [22].

Podczas kolejnego spotkania technicznego grupy ekspertów w 2006 roku dokonano oceny opracowanego modelu oceny ryzyka [21]. Wynik tej pracy dostarczył porad i wytycznych zmniejszających ryzyko zakażenia niemowląt w wyniku konsumpcji mleka modyfikowanego w proszku (PIF). Spotkanie ekspertów FAO/WHO w 2008 dotyczyło podjęcia decyzji w sprawie ustanowienia kryterium bezpieczeństwa mikrobiologicznego dla *E. sakazakii* (*Cronobacter* spp.) w przypadku mieszanek do żywienia niemowląt powyżej 12 miesiąca życia (FUF – follow-up formula).

Pracę ekspertów FAO/WHO wspierała Komisja Kodeksu Żywnościowego (Codex Alimentarius Commission – (CAC), Komitet ds. Higieny Żywności (Committe on Food Hygiene – CCFH), który jest odpowiedzialny za opracowanie wytycznych zarządzania ryzykiem w obszarze bezpieczeństwa żywności na poziomie międzynarodowym. Ustalenia ze spotkania technicznego z 2006 r. stanowiły wkład w finalizację Kodeksu Praktyk Higienicznych dla Preparatów w Proszku dla Niemowląt i Małych Dzieci (wraz z Aneksem I i III4) (Codex Code of Hygienic Practice for Powdered Formulae for Infants and Young Children).

4. Mechanizmy wirulencji *Cronobacter* spp.

W literaturze opisano dwa podstawowe mechanizmy wirulencji *Cronobacter* spp.: adhezja do komórek nabłonka jelitowego oraz adhezja do komórek śródbłonka naczyń mózgowych [51].

Adhezja bakterii *Cronobacter* spp. do nabłonka jelitowego powoduje zwiększoną apoptozę komórek nabłonka i utratę integralności bariery nabłonkowej [58]. Bakterie *Cronobacter* spp. wykorzystują białka powierzchniowe komórek gospodarza np. fibronektynę, aby przyłączyć się do komórek nabłonkowych jelita oraz mikrofilamenty i mikrotobule do atakowania komórek gospodarza [43]. Przyleganie *Cronobacter* spp. do nabłonka jelitowego wywołuje stan zapalny. Po przekroczeniu bariery jelitowej bakteria może przedostać się do krwioobiegu, powodując sepsę, posocznicę, kilka postaci martwiczego zapalenia jelit, zapalenia migdałków, zapalenia szpiku i kości oraz infekcje dróg moczowych [2, 57, 74].

W warunkach *in vitro* stwierdzono, że białko błony zewnętrznej A komórek (OmpA) odgrywa kluczową rolę w inwazji na komórki nabłonka jelitowego oraz śródbłonka naczyń mózgowych [50]. Przypuszcza się, ze *Cronobacter* spp. wnika do komórek nerwowych na zasadzie fagocytozy i zakłóca dojrzewanie komórek dendrytycznych [43]. Uważa się, że geny *ibeA*, *ibeB* i *yijP C. sakazakii* odpowiedzialne są za atakowanie śródbłonka naczyń mózgowych [51]. Kim i wsp. [51] wykryli w szczepie *C. sakazakii* ATCC 29544^T gen kodujący OmpA oraz gen *ibeB*.

Chorobotwórczość *Cronobacter* spp. może być związana także z produkcją enterotoksyny, która może wzmacniać wirulencję i translokację przez barierę krew-mózg i jelita [71]. Raghav i Aggarwal [76] określili, masę cząsteczkową toksyny, która wynosi 66 kDa i jest stabilna w 90°C przez 30 min. Oprócz enterotoksyn *Cronobacter* spp. produkuje enzymy proteolityczne, które powodują rozkład komórki gospodarza np. metaloproteaza cynkowa deformuje komórki, prowadząc do ich uszkodzenia [71], *Cronobacter* spp. posiada mechanizm obronny przed układem immunologicznym gospodarza, dzięki tolerancji środowiska makrofagów [43, 91, 92]. Przeżywalność bakterii w makrofagach jest różna w przypadku różnych gatunków *Cronobacter.* Według Townsend i wsp. *Cronobacter* spp. może przetrwać w makrofagach od 48 do 96 godzin [91, 92].

Zidentyfikowano trzy przypuszczalne geny wirulencji *Cronobacter* spp.: *cpa* (aktywator plazminogenu), *sip* (białko wchodzące w interakcje siderforów, czyli nośników jonów żelaza) i *hly* (hemolizyna typu III) [16].

Infekcje wywołane przez *Cronobacter sakazakii* dotyczą określonych typów sekwencji (ST ang. Sequence Type – sekwencje nukleotydowe dla każdego z fragmentów genu są traktowane jako allele, tworząc profil alleliczny, czy typ sekwencji ST dla badanego szczepu) i złożonych kompleksów klonalnych. *C. sakazakii* ST12 powiązany jest z wywołaniem martwiczego zapalenia jelit u noworodków. *C. sakazakii* ST4 i CC4 skojarzono z zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych u noworodków, CC7 *C. malonaticus* z infekcjami dorosłych [17, 97]. Analiza typowania sekwencji multilocus (MLST – Multilocus sequence typhing) bakterii *C. sakazakii* pochodzących z 7 krajów w 41 próbkach klinicznych wykazała obecność tego samego szczepu *C. sakazakii* ST4 w 20 próbkach zebranych w latach 1977–2008 pochodzących z 6 krajów (Holandia, Francja, USA, Nowa Zelandia, Republika Czeska i Kanada) [46]. Akineden i wsp. [2] donosi o wykryciu wysoce zjadliwego szczepu ST4, w dwóch próbkach mieszanki dla niemowląt w proszku.

5. Taksonomia *Cronobacter* spp.

Bakterie *Cronobacter* spp. są oksydazo ujemną, katalazo dodatnią, względnie beztlenową, Gram-ujemną, ruchliwą pałeczką. Redukują azotany, wykorzystują cytrynian, hydrolizują eskulinę i argininę oraz wytwarzają kwas z D-glukozy, D-sacharozy, D-rafinozy, D-melibiozy, D-celobiozy, D-mannitolu, D-mannozy, L-ramnozy, L-arabinozy, D-ksylozy, D-trehalozy, galakturonianu i D-maltozy. Bakterie rodzaju *Cronobacter* metabolizują substraty: 5-bromo-4-chloro-3-indolilo-α-D-glukopiranozyd, 4-metyloumbelliferylo-α-D-glukopiranozyd, 4-nitofenylo-α-D-glukopiranozyd, 4-nitofenylo-β-D-glukopiranozyd, 4-nitofenylo-α-D-galaktopiranozyd i 4-nitofenylo-β-D-galaktopiranozyd. Bakterie *Cronobacter* spp. dają pozytywny wynik w produkcji acetoiny (test Vogesa-Proskauera) i negatywny w przypadku testu czerwieni metylowej. Produkują siarkowodór i hydrolizują mocznik. Rodzaj *Cronobacter* obejmuje siedem gatunków: *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjesii*, *C. universalis*, *C. dublinensis* i *C. condimenti* [39].

Nazwa gatunkowa *C. malanoticus* odnosi się do wykorzystania przez bakterię *C. malonaticus* malonianu. *C. malanoticus* pierwotnie wyizolowany był z ropnia piersi i jest dostępny pod numerem LMG 23826^T w BCCM/ LMG Bacteria Collection w Ghent (Belgia) oraz jako DSMZ 18702^T w Instytucie Leibniza DSMZ w Braunschweig (Niemcy) [39].

Gatunek *C. muytjensii* nazwany jest na cześć holenderskiego mikrobiologa Harry'ego Muytjensa. *C. muytjensii* ATCC 51329^T zdeponowano w Mannassas (USA) oraz jako CIP 103581^T dostępny jest w Instytucie Pasteura w Paryżu (Francja) [39].

Nazwa gatunkowa *C. dublinensis* odnosi się do miasta Dublin, w którym został wyizolowany po raz pierwszy w zakładzie produkcji mleka w proszku i dostępny jest pod numerem LMG 23823^T w BCCM/ LMG Bacteria Collection w Ghent (Belgia) oraz pod numerem DSMZ 18705^T w Instytucie Leibniza DSMZ w Braunschweig (Niemcy) [39]. Bakteria z gatunku *C. turicensis* pierwotnie wyizolowana została ze śmiertelnego przypadku noworodkowego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych w Zurychu w 2005 r. Szczep ten dostępny jest pod numerem LMG 23827^T BCCM/ LMG Bacteria Collection w Ghent (Belgia) oraz pod numerem DSMZ 18703^T w Instytucie Leibniza DSMZ w Braunschweig (Niemcy). Nazwa gatunkowa *C. turicensis* odnosi się do łacińskiej nazwy Zurychu-Turicum [39].

Początkowo *C. sakazakii* określano jako *Enterobacter cloacae*. W 1980 r. Farmer i wsp. przeklasyfikował *Enterobacter cloacae* jako nowy gatunek i nazwał na cześć japońskiego mikrobiologa Riichi Sakazakii – *Enterobacter sakazakii* [23]. Nazwę Rodzaju *Cronobacter* zaproponowano po analizie sekwencji genu 16S rRNA różnych szczepów należących do gatunku *Enterobacter sakazakii* w wyniku której wyodrębniono sześć grup genomowych [85]. Gatunek *C. sakazakii* został wyodrębniony z gatunku *Enterobacter cloacae* w wyniku różnic w sekwencji DNA. DNA *C. sakazakii* jest w 53–54% homologiczne z DNA bakterii *Enterobacter* i *Citrobacter*. Na podstawie bliższego pokrewieństwa *C. sakazakii* do *E. cloacae*, (sekwencja genotypowa *C. sakazakii* jest w 51% identyczna z *E. cloacae* oraz w 41% z *Citrobacter freundii*) [38]. Pierwotny szczep *C. sakazakii* wyizolowano z gardła dziecka i dostępny jest pod numerem ATCC 29544^T w Mannassas w USA i pod numerem NCTC 11467^T w Londynie [38, 39].

Bakteria *C. sakazakii* jest jedynym gatunkiem *Cronobacter* spp., który posiada klaster genu *nanAKT*, kodujący wykorzystanie egzogennego kwasu sjalowego jako źródła węgla do wzrostu [47]. Grim i wsp. [26] stwierdzili, że szczepy *C. sakazakii* wykorzystują kwas sjalowy lub jego pochodną kwas N-acetyloneuraminowy, podczas gdy inne gatunki *Cronobacter* spp. nie wykorzystują tego kwasu. Stwierdzono również obecność dwóch regionów genomowych (GR127 i GR 129) u szczepu *C. sakazakii* BAA-894, które biorą udział w wykorzystywaniu kwasu sjalowego [26]. Kwas sjalowy występuje w mleku kobiecym, mieszankach mleko zastępczych, mleku modyfikowanym, mucynie wyścielającej jelita i jest składnikiem gangliozydów, które występują w komórce nerwowej i biorą udział w funkcjonowaniu tkanek nerwowych [47].

6. Występowanie *Cronobacter* spp. w żywności i środowisku szpitalnym

Bakterie z rodzaju *Cronobacter* spp. izolowano z preparatów mlekozastępczych wykorzystywanych w początkowym żywieniu niemowląt oraz z szerokiej gamy innych produktów spożywczych: warzyw, zbóż, płatków, ziemniaków, przypraw, mięsa, ryb, sera, tofu, ryżu, makaronu, czekolady, herbaty [8, 11, 24, 25, 33, 38, 56, 59, 85, 87]. W badaniu Berthold-Pluta i wsp. [8] wyizolowano 21 szczepów *Cronobacter* spp. (13 szczepów *C. sakazakii*, 4 szczepy *C. muytjensii*, 2 szczepy *C. turicensis*, 1 szczep *C. malonaticus* i 1 szczep *C. condimenti*) z warzyw liściastych i kiełków. Li i wsp. [56] stwierdzili obecność *Cronobacter* spp. w produktach zbożowych i przyprawach. Lee i wsp. [54] wykazali, że *Cronobacter* spp. występuje także w zbożach i produktów zbożowych. Garbowska i wsp. [25] stwierdziły obecność *Cronobacter* spp. w ziołach (bazylia, oregano, pietruszka) oraz w mieszance przyprawowej (zioła prowansalskie). W badaniu Gurtler i wsp. [28] *Cronobacter* spp. stwierdzono w ryżu, owsie, mące, okruchach chleba. Obecność *Cronobacter* spp. w zbożach i produktach zbożowych może wynikać z obecności tej bak-

terii w środowisku naturalnym oraz z zanieczyszczeń zakładów produkcyjnych [56]. Bakterie *Cronobacter* spp. izolowano również z próbek pobranych z gospodarstw rolnych, zwierząt hodowlanych [63], a także ze środowiska: kurzu, wody, ścieków, gleby [33]. W Afryce Południowej wyizolowano *Cronobacter* spp. z 28 różnych prób żywności i środowiska, *C. sakazakii* stanowił 92,8% wyizolowanych szczepów [88].

Reich i wsp. w swojej pracy z roku 2010 [81] stwierdzili, że zanieczyszczenia mieszanek mlekozastępczych skorelowane były z zanieczyszczeniem środowiska produkcyjnego. Uwzględnia się dwie drogi zanieczyszczenia mieszanek mlekozastępczych: wewnętrzną i zewnętrzną. Wewnętrzna droga zanieczyszczenia dotyczy środowiska produkcyjnego. Podczas procesu produkcyjnego mleka modyfikowanego nieświadomie wykorzystuje się skażone surowce lub dochodzi do zanieczyszczenia krzyżowego. Zanieczyszczenie zewnętrzne spowodowane jest nieprawidłową higieną przygotowania mleka z mieszanek mlekozastępczych [2, 49]. Do nieprawidłowych praktyk higienicznych przygotowania mleka modyfikowanego należą: długie przechowywanie przygotowanej mieszanki, przechowywanie przygotowanej mieszanki w termosach oraz nieprawidłowy sposób mycia butelek i sprzętu służącego do przygotowania mleka. Alternatywą podgrzewania przygotowanej mieszanki w termosie jest możliwość podgrzewania samej wody służącej do przygotowania mleka. Mieszankę powinno dodawać się do wody bezpośrednio przed karmieniem. Pozostałości po karmieniu nie powinny być przechowywane, tylko natychmiast wylewane. Woda służąca do przygotowania mleka z mieszanki mlekozastępczej powinna mieć minimum 70°C [41].

Obecność *Cronobacter* spp. stwierdzono na powierzchniach, przedmiotach i sprzęcie medycznym w środowisku szpitalnym. Bakterie izolowano m.in. ze stetoskopu lekarskiego, szczotek używanych do mycia butelek oraz sprzętu używanego do przygotowania pokarmu dla niemowląt [33, 102].

7. Oporność *Cronobacter* spp. na warunki stresowe

Bakterie z rodzaju *Cronobacter* spp. mogą przeżyć w szerokim zakresie temperatur (od 5 do 44–47°C) oraz w produktach o niskiej aktywności wody [33], w temperaturze 4°C oraz przy aktywności wody od 0,30 do 0,83 może przetrwać nawet do 12 miesięcy [30].

Szczepy *Cronobacter* spp. w porównaniu z innymi bakteriami z rodziny *Enterobacteriaceae* wykazują wysoką tolerancję na stres środowiskowy (niskie pH, i a_w, wysoką temperaturę, stres osmotyczny, wysychanie) [18, 57]. Optymalna temperatura wzrostu wynosi 37–39°C, za maksymalną temperaturę wzrostu przyjęto 44–47°C. Należy jednak zauważyć, że *C. sakazakii* ATCC 29544^T nie wykazuje wzrostu w temperaturze powyżej 42°C [67] jednakże temperatura ta wg ISO/TS 22964 z 2006 roku była temperaturą inkubacji bakterii. W temperaturze pokojowej (21°C) czas podwojenia bakterii *Cronobacter* spp. w rekonstytuowanej mieszance mlecznej wynosił 75 min., natomiast w temperaturze 10°C około 10 h co oznacza, że jest zdolny do powolnego wzrostu w temperaturach chłodniczych. Wartości $D_{52} = 54{,}8$ min. i $D_{60} = 2{,}5$ min. ekstrapolowane do temperatury 72°C wskazują na wysoką termotolerancję bakterii *Cronobacter* spp. (wartość $z = 5{,}82$°C). Wyjaśnia to ich przeżywalność podczas procesu produkcji odwodnionych mieszanek mlekozastępczych [38].

Oporność na wysuszenie szczepów *Conobacter* spp. jest prawdopodobnie spowodowana nagromadzeniem trehalozy wewnątrz komórek. Trehaloza działa jako środek ochronny [43]. Barron i Forsythe [6] stwierdzili także, że pozakomórkowe polisacharydy chronią komórki bakterii przed wysuszeniem. *C. sakazakii* produkuje beta-karoten, który chroni komórki bakterii przed rodnikami tlenowymi [45]. Wszystkie szczepy *Cronobacter* spp. mają geny kodujące trimetyloglicynę i trehalozę [45]. Umożliwia to przetrwanie bakteriom w środowisku i w produktach o niskiej aktywności wody [43]. Dodatkowo zidentyfikowano geny operonu biosyntezy celulozy, operon biosyntetyczny otoczki, gen *curli GR55*, których ekspresja może zapewnić odporność bakterii na niską aktywność wody [26].

Bakterie z rodzaju *Cronobacter* spp. są oporne na niskie pH, dlatego może przetrwać w kwaśnym środowisku żołądka. Niemowlęta nie mają w pełni rozwiniętej kwasowości żołądka, co może tłumaczyć zwiększone ryzyko infekcji powodowanych przez *Cronobacter*. W pH 4,5 w czasie 24 godzin bakterie z rodzaju *Cronobacter* spp. są zdolne do wzrostu do poziomu około 10^9 jtk/ml. Obecność genu *sodA* prawdopodobnie zapewnia oporność bakterii *Cronobacter* spp. na wewnątrzkomórkową oksydazę makrofagową i warunki kwasowe [43, 57].

8. Tworzenie biofilmu przez bakterie z rodzaju *Cronobacter*

Bakterie *Cronobacter* spp. tworzą biofilm, który może stanowić fizyczną barierę przed niekorzystnymi warunkami środowiskowymi. Tym samym bakterie stają się oporne na brak wody, dezynfekcję, temperaturę i antybiotyki. Bakterie z rodzaju *Cronobacter* spp. mają zdolność adhezji do szkła, stali nierdzewnej, silikonu, lateksu, poliwęglanu i plastiku. *C. sakazakii* wykazuje najsilniejszą adhezję do polichlorku winylu, następnie silikonu i stali nierdzewnej [27].

Noworodki urodzone przedwcześnie są często karmione za pomocą rurek nosowo-żołądkowych.

Wykazano, iż na rurkach istnieje znaczna ilość biofilmu, który składa się z grzybów i bakterii [34]. Szczep *Cronobacter* spp. i inne bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* wyizolowano z rurek nosowo-żołądkowych w ilości 10^7 jtk/cm [34]. Kinetyka wzrostu i tworzenia się biofilmu *C. sakazakii* na rurkach enteralnych, wykazała, że *C. sakazakii* może szybko przyłączyć się do powierzchni i namnażać się na materiale, z którego wykonana jest rurka już po 4 godzinach [34].

Komórki bakterii szybciej przyłączają się do materiałów hydrofobowych (teflon i tworzywa sztuczne), wolniej do powierzchni hydrofilowych (szkoło, metale) [43]. Temperatura i dostępność składników odżywczych wpływają na zdolność adhezji bakterii do powierzchni [27]. Bakterie w środowisku o ograniczonej zawartości substancji odżywczych, chętniej tworzą biofilm. Tworzenie biofilmu jest również procesem regulowanym na poziomie genetycznym [27, 51]. Wykazano, że gen *flhE* przyczynia się do tworzenia biofilmu przez bakterie *C. sakazakii* [100]. Gupta i wsp. [127] wykonali badanie przesiewowe genów odpowiedzialnych za powstawanie biofilmu (mgt B, fli D, als S, flg J, cyo D, fts K, bcs C, flh E). Wykazano, że geny fli D, flg J (biorące udział w syntezie rzęski) były obecne we wszystkich badanych szczepach *C. sakazakii* (27 szczepów). Gen bcs C (odpowiedzialny za syntezę celulozy) był nieobecny w sześciu izolatach *C. sakazakii.* Przypuszcza się, że białka PPlase, Flge, Dsbc są ważnymi czynnikami biorącymi udział w tworzeniu biofilmu. Białko PPlase bierze udział w fałdowaniu integralnych białek błony zewnętrznej (Omp) i patogenności. Białko FlgE jest niezbędne do kolonizacji i rozwoju biofilmu, natomiast białko DsbC, pod wpływem stresu oksydacyjnego, wykazuje aktywność izomerazy dwusiarczkowej, która odgrywa istotną rolę w procesie fałdowania białka. Uważa się również, że białka ESA_00281 i ESA00_00282 przyczyniają się do tworzenia biofilmu [43, 100].

9. Wykrywanie i oznaczanie liczby *Cronobacter* spp.

Na podstawie Rozporządzenia Komisji UE (WE) nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 z późniejszymi zmianami, *Cronobacter* spp. powinien być nieobecny w trzydziestu 10 g próbkach preparatów w proszku do początkowego żywienia niemowląt i żywności dietetycznej w proszku specjalnego przeznaczenia medycznego, przeznaczonego dla niemowląt w wieku do 6 miesięcy.

W 2017 roku wprowadzono normę EN ISO 22964: 2017 – Mikrobiologia łańcucha żywnościowego – Horyzontalna metoda wykrywania *Cronobacter* spp., która zastępuje ISO/TS 22964:2006. Zmodyfikowany bulion laurylosiarczanowy (mLST) zastąpiono CSB (Cronobacter Selective Broth), a agar ESIA (Enterobacter sakazakii Isolation Agar) zastąpiono CCI (Chromogenic Cronobacter Izolation Agar). Temperatura inkubacji powinna wynosić 41,5 ± 1°C. Bulion CSB nie zawiera laurylosiarczanu sodu, co może pozytywnie wpływać na odzysk wrażliwych szczepów *Cronobacter.* Agar CCI zawiera tiosiarczan sodu i cytrynian żelaza (III) amonu, w celu różnicowania *Cronobacter* spp. od innych *Enterobacteriaceae.* Dodatkowo agar CCI nie zawiera fioletu krystalicznego, natomiast ilość deoksycholanu sodu została zmniejszona. W normie EN ISO 22964:2017 zmieniono także metodę potwierdzania uzyskanych izolatów bakterii. Wytwarzanie na agarze TSA (Trypton Soy Agar) żółtego, nie dyfundującego do podłoża barwnika, zastąpiono testami biochemicznymi, ponieważ produkcja żółtego barwnika nie jest niezawodnym kryterium identyfikacji. Iversen i wsp. (2007) wykazali że 8% szczepów *Cronobacter* spp. nie produkowało barwnika, natomiast produkowało go 34% innych przedstawicieli rodzaju *Enterobacteriaceae* [7, 35, 36].

Wprowadzony w 2017 roku standard EN ISO 22964 wymienia 7 biochemicznych testów do potwierdzania wyników uzyskanych metodą hodowlaną. Sześć z tych testów zawiera zestaw ID 32E dlatego tradycyjne testy biochemiczne mogą zostać zastąpione gotowym zestawem. Jednak dostępne komercyjne zestawy testów biochemicznych ID32E i API 20E nie pozwalają na wiarygodną identyfikację izolatów *Cronobacter* na poziomie rodzaju. Poleganie na tej metodzie dostarcza fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych wyników. Około 80% szczepów *Cronobacter* zostało poprawnie zidentyfikowanych na poziomie rodzaju z wykorzystaniem bieżących wersji baz danych ID 32E i API 20E odpowiednio v. 4.0 i v. 5.0. Identyfikacja na poziomie gatunku z wykorzystaniem zestawu ID 32E dała poprawne wyniki w 50%. W przypadku kart Vitek GN wszystkie gatunki *Cronobacter* zostały zidentyfikowane jako *C. sakazakii*, do grupy tej zaliczono także przedstawicieli *Franconibacter* [42, 97].

Technika typowania molekularnego MLST (Multi Locus Sequqnce Typing) początkowo wykorzystywana była do rozróżniania dwóch blisko spokrewnionych genetycznie *C. sakazakii* i *C. malonaticus.* Obecnie schemat MLST *Cronobacter* wykorzystuje sekwencję 7 alleli metabolizmu podstawowego: *atpD*, *fusA*, *glnS*, *gltB*, *gyrB*, *infB* i *ppsA* dając połączoną sekwencję 3036 pz do analizy filogenetycznej i genomiki porównawczej. Schemat MLST dla *Cronobacter* został opracowany przez Adama Baldwin'a we współpracy ze Stephanem Forsythe, opublikowany w 2009 roku [3]. Pod adresem http://www.pubMLST.org/cronobacter) dostępna jest bezpłatna baza MLST zawierająca > 2400 szczepów i 350 genomów. Dzięki temu rozwiązaniu rozpoznano kompleksy klonalne (CC) rodzaju *Cronobacter* spp. co umożliwia prawidłową identyfikację *Cronobacter* spp., a tym samym zmniejsza możliwość uzyskania

wyników fałszywie ujemnych. Ponadto MLST została również wykorzystana do formalnego uznania dwóch nowych gatunków *C. universalis* i *C. condimenti* oraz ujawniła silny związek pomiędzy sekwencją typu 4 (ST4) i przypadkami noworodkowego zapalenia opon mózgowych [69, 72]

Techniki identyfikacji oparte o DNA bakterii są uznane za bardziej niezawodne niż techniki oparte o cechy fenotypowe [43, 97]. W ciągu ostatnich kilku lat opracowano różne protokoły reakcji PCR i RT-PCR do identyfikacji bakterii *Cronobacter* spp. [96]. Wygenerowano kilka starterów PCR do identyfikacji bakterii rodzaju *Cronobacter* przez amplifikację specyficznych sekwencji i konserwatywnych regionów 16S rRNA bakterii [29, 55]. Jednak identyfikacja *Cronobacter* spp. z wykorzystaniem genu 16S rRNA jest problematyczna, ponieważ jest on obecny w wielu kopiach, w obrębie jednego genomu, cechujących się mikroheterogennością [3, 41]. Blisko spokrewnione, mające znaczenie kliniczne, gatunki *C. sakazakii* i *C. malonaticus* są nierozróżnialne w oparciu o sekwencje 16S rRNA [37]. Chociaż nie ma prawnego obowiązku identyfikacji gatunkowej bakterii z rodzaju *Cronobacter* spp. [82] to wciąż poszukiwana jest metoda i sekwencja pozwalająca na taką identyfikację. Zróżnicowanie gatunkowe ma kluczowe znaczenie w badaniach epidemiologicznych, ocenie wrażliwości na antybiotyki i środki dezynfekujące. Ponadto producenci mieszanek mlekozastępczych ponoszą koszty związane z odrzuceniem partii produkcyjnej w wyniku fałszywie-dodatniej identyfikacji lub uwolnienia partii jako fałszywie bezpiecznej, co naraża noworodki na infekcję i jej skutki [42]. Sekwencje genów wykorzystywane dotychczas w identyfikacji gatunków *Cronobacter* spp. to: cycA, gyrB, ompA, rpoB, gluA, fusA, dnaG, zpx, 16S rRNA oraz geny odpowiedzialne za pozyskanie żelaza. Połączenie metod hodowlanych z metodami amplifikacji fragmentów genów pozwalających na wykrycie różnic tak małych jak pojedyncza para zasad wykorzystano do identyfikacji na poziomie gatunku. Vlach i wsp. [95] opracowali protokół PCR-RFLP do różnicowania siedmiu gatunków *Cronobacter* (*C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjesii*, *C. universalis*, *C. dublinensis* i *C. condimenti*). Protokół ten oparty jest na genie rpoB i zastosowaniu trzech endonukleaz restrykcyjnych (Csp 6I, Hin P1I, Mbo I). PCR-RFLP jest prostą, powtarzalną i szybką metodą, którą można wykorzystać do identyfikacji gatunków *Cronobacter* [95].

Do identyfikacji bakterii *Cronobacter* spp. można wykorzystać również system spektrofotometrii masowej (MS – Mass Spektrometry) MALDI TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry), którego zasada polega na identyfikacji widm masowych komórek i składników komórkowych [52, 53]. Metoda wykorzystywana jest do identyfikacji drobnoustrojów i analizy pokrewieństwa izolatów tego samego gatunku. W przypadku zastosowania systemu MALDI TOF MS do identyfikacji izolatów *Cronobacter* spp. najważniejszym czynnikiem gwarantującym wiarygodność i dokładność wyników identyfikacji na poziomie gatunkowym jest referencyjna baza danych zawierająca spektra profili białkowych szczepów *C. sakazakii* [97].

10. Antybiotykooporność *Cronobacter* spp.

Przed 1985 r. zakażenia powodowane przez *Cronobacter* leczono chloramfenikolem, gentamycyną i/lub ampicyliną [43]. W 1988 roku Willis i Robinson zaproponowali łączenie ampicyliny i gentamycyny w leczeniu zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, wywołanego przez *Cronobacter*. Li i wsp. [56] wykazali, że wyizolowane szczepy *Cronobacter* spp. były wrażliwe na gentamycynę, tetracyklinę, trimetoprim i kwas nalidyksowy. Jeden z 13 wyizolowanych szczepów był oporny na ampicylinę [56].

W badaniu Berthold-Pluta i wsp. [8] wykazano, że 21 wyizolowanych z warzyw liściastych i kiełków szczepów *Cronobacter* spp. było wrażliwych na ampicylinę, cefepim, chloramfenikol, gentamycynę, streptomycynę, tetracyklinę, cyprofloksacynę i cotrimoksazol.

Dwa szczepy *Cronobacter* spp. badane przez Shadliа-Matung i wsp. [83] były oporne na penicylinę i cefalosporynę, a wrażliwe na gentamycynę, tetracyklinę i streptomycynę. W badaniu Oonaka i wsp. [70] dziewięć spośród 36 wyizolowanych szczepów było wrażliwych na cefalosporyny.

Nazarowiec – White i Farber [67] wykazali, że dwa z osiemnastu zbadanych szczepów było opornych na chloramfenikol i tetracykliny. Podobne wyniki uzyskali Lee i wsp. [54] przedstawili badanie, gdzie dwa spośród 66 szczepów *Cronobacter* spp. wyizolowanych z żywności na terenie Korei były oporne na chloramfenikol a siedem na streptomycynę.

Kim i wsp. [48] wykazali, że dwa szczepy *Cronobacter* spp. wyizolowane od niemowląt poniżej pierwszego roku życia były wrażliwe na kanamycynę, kwas nalidyksowy, gentamycynę, chloramfenikol, tetracyklinę i cyprofloksacynę oraz oporne na ampicylinę i cefalotynę.

El-Sharoud i wsp [19] badali oporność na antybiotyki 16 izolatów *Cronobacter* spp. z mleka w proszku. Wszystkie izolaty wrażliwe były na streptomycynę, ampicylinę i gentamycynę. Dwa izolaty oporne były na neomycynę, a jeden na neomycynę i trimetoprim. Xu i wsp. [99] badając 71 szczepów wyizolowanych z żywności typu ready-to-eat na terenie południowo-wschodnich Chin, wykazali, że wszystkie szczepy *Cronobacter* spp. wrażliwe były na tetracyklinę, kwas naliksydowy, ciprofloksacynę i cefatoksym. Oporność na

penicylinę stwierdzono u 84% a na cefalotynę u 46,5% badanych szczepów.

Antybiotyki β-laktamowe (penicyliny, cefalosporyny, karbapenemy, monobaktamy) są największą grupą antybiotyków, używaną do leczenia większości rodzajów zakażeń. Oporność bakterii na β-laktamy jest warunkowana różnorodnymi mechanizmami. Jednym z nich jest wytwarzanie β-laktamaz (enzymów hydrolizujących cząsteczki β-laktamów) [68].

Bakterie z rodzaju *Cronobacter* spp. mogą wytwarzać enzym β-laktamazę. Pitout i wsp. [75] wykazali, że niektóre szczepy *Cronobacter* produkują β-laktamazę, ale na niskim poziomie. Caubilla-Barron i wsp. [13] zidentyfikowali dwa izolaty, które produkowały β-laktamazę o rozszerzonym spektrum działania. Zhou i wsp. [102] opisali jeden izolat *Cronobacter* otrzymany z mieszanek mlekozastępczych, który wytwarzał β-laktamazę o rozszerzonym spektrum działania.

Prowadzone są badania nad mechanizmem antybiotykoodporności *Cronobacter* spp. W wyniku nadużywania antybiotyków istnieje potencjał uzyskania wysokiej oporności na antybiotyki przez różne szczepy bakterii [49].

11. Podsumowanie

Bakterie *Cronobacter* powszechnie występują w środowisku naturalnym i mogą stanowić poważne zagrożenie dla zdrowia i życia człowieka. Najbardziej narażone na zakażenia wywołane przez bakterie *Cronobacter* spp. są noworodki poniżej 28 dnia życia, noworodki urodzone przedwcześnie, niemowlęta o niskiej masie urodzeniowej (poniżej 2,5 kg) i niemowlęta z upośledzeniem odporności. Chociaż zakażenia wywołane przez *Cronobacter* spp. występują rzadko to współczynnik śmiertelności zakażonych pacjentów wynosi 40–80% przypadków. Oszacowane koszty leczenia pojedynczej infekcji wywołanej przez *C. sakazakii* oraz koszty długoterminowego leczenia powikłań po infekcji przekroczyły 5 milionów dolarów [62]. Szczep *C. sakazakii* wśród 7 gatunków bakterii zaliczanych do tego rodzaju jest uznawany za najbardziej oportunistyczny patogen odpowiedzialny za bakteremię, zapalenie opon mózgowych i martwicze zapalenie jelit. Dzięki produkcji otoczek i biofilmu, wysokiej termotoleracyjności jest odporny na wysuszenie i wykazuje przeżywalność w mieszankach mlekozastępczych i innych produktach o niskiej aktywności wody. Po wniknięciu do organizmu może atakować komórki nabłonkowe jelit, a nawet komórki śródbłonka mikronaczyniowego mózgu wykazując potencjał do wywoływania zapalenia opon mózgowych. Dlatego kontrola oraz regulacje prawne w przypadku *C. sakazakii* są niezbędne [51]. W ramach zarządzania ryzykiem mikrobiologicznym związanym z występowaniem bakterii *Cronobacter* spp. w mieszankach mlekozastępczych (PIF i FUF) odbyły się trzy spotkania grupy ekspertów FAO-WHO wspierane przez Komisję Kodeksu Żywnościowego, w wyniku których opracowano model oceny ryzyka, który dostarczył informacji o ryzyku oraz porad i wytycznych zmniejszających ryzyko zakażenia niemowląt w wyniku konsumpcji mleka modyfikowanego w proszku [20, 21, 22]. Wypracowane w 2006 roku na spotkaniach technicznych FAO-WHO rozwiązania zostały sfinalizowane w przyjętym na 31 sesji Komisji Kodeksu Żywnościowego (04.06–04.07.2008) Kodeksie Praktyk Higienicznych dla Preparatów w Proszku dla Niemowląt i Małych Dzieci (CAC 2008a). W roku 2005 na mocy Rozporządzenia Komisji (WE) nr 2073/2005 w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych wprowadzono kryteria dotyczące bezpieczeństwa mikrobiologicznego preparatów w proszku dla niemowląt i żywności dietetycznej w proszku specjalnego przeznaczenia medycznego przeznaczona dla niemowląt w wieku do 6 miesięcy. Bakterie należące do rodzaju *Cronobacter* muszą być nieobecne w 30 dziesięcio-gramowych próbkach mieszanki mlekozastępczej. Analiza wykonywana jest metodą hodowlaną z potwierdzeniem biochemicznym według zmodyfikowanego protokołu opisanego w standardzie EN ISO 22964:2017 Mikrobiologia łańcucha żywnościowego – Horyzontalna metoda wykrywania *Cronobacter* spp. Mimo to w dalszym ciągu obserwuje się przypadki zakażeń, co może być spowodowane nieskuteczną diagnostyką. Tradycyjne hodowlane metody mikrobiologiczne są czasochłonne i obarczone błędem. Metody biochemiczne dostarczają fałszywie ujemnych lub fałszywie dodatnich wyników w przeciwieństwie do analiz PCR, których wyniki są bardziej niezawodne, jednak są droższe i pracochłonne przez co nie są wykonywane przez producentów mieszanek mlekozastępczych. Do bardziej wiarygodnych i skutecznych metod zaliczana jest metoda MALDI TOF i PCR-RFLP. Najskuteczniejszym narzędziem wykrywania *Cronobacter* spp. jest kombinacja stosowanych metod, w celu uzyskania wiarygodnych i powtarzalnych wyników. FDA Bacteriological Analytical Manual włącza PCR jako metodę skriningową, jednak wyniki należy potwierdzić metodą hodowlaną. Jako metodę biochemicznej identyfikacji zalecane jest użycie ID32E lub Vitek 2 GN.

Piśmiennictwo

1. Aguirre-Conde A., Pérez-Legorburu A., Echániz-Urcelay I., Hernando-Zaráte Z., Arrate-Zugazabeitia J.K.: Sepsis neonatal por. *Enterobacter sakazakii*. *An. Pediatr.* (*Barc*). **66**, 196–197 (2007)
2. Akineden O., Heinrich V., Grossb M., Usleber E.: Reassessment of *Cronobacter* spp. originally isolated as *Enterobacter sakazakii* from infant food. *Food Microbiol.* **65**, 44–50 (2017)
3. Baldwin A., Loughlin M., Caubilla-Barron J., Kucerova E., Manning G., Dowson C., Forsythe S.: Multilocus sequence typing

of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* reveals stable clonal structures with clinical significance which do not correlate with biotypes. *BMC Microbiol.* **9**, 1–9 (2009)
4. Bar-Oz B., Preminger A., Peleg O., Block C., Arad I.: *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. *Acta. Pediatr*. **90**, 356–358 (2001)
5. Barreira E.R, Costa de Souza D., de Freitas Góis P., Fernandes J.C.: Meningite por *Enterobacter sakazakii* em recém-nascido: relato de caso. *Pediatria* (*São Paulo*), **25**, 65–70 (2003)
6. Barron J.C., Forsythe S.J.: Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* in dehydrated powdered infant formula. *J. Food Prot.* **70**, 2111–2117 (2007)
7. Benito de A, Besseb N.G., Desforges I., Gertend B., Ruiza B., Tomáse D.: Validation of standard method EN ISO 22964: 2017 – Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp. *Int. J. Food Microbiol.* **288**, 47–52 (2019)
8. Berthold-Pluta A., Garbowska M., Stefańska I., Pluta A.: Microbiological quality of selected ready-to-eat leaf vegetables, sprouts and non-pasteurized fresh fruit-vegetable juices including the presence of *Cronobacter* spp. *Food Microbiol.* **65**, 221–230 (2017)
9. Biering G., Karlsson S., Clark N.C., Jônsdôttir K.E., Ludvigsson P., Steingrimsson O.: Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. *J. Clin. Microbiol*. **27**, 2054–2056 (1989)
10. Block C., Peleg O., Minster N., Bar-Oz B., Simhon A., Arad I., Shapiro M.: Cluster of neonatal infections in Jerusalem due to unusual biochemical variant of *Enterobacter sakazakii*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. **21**, 613–616 (2002)
11. Bowen A., Wiesenfeld H.C., Kloesz J.L., Pasculle A.W., Nowalk A.J., Brink L., Elliot E., Martin H., Tarr C.L.: Notes from the Field: *Cronobacter sakazakii* infection associated with feeding extrinsically contaminated expressed human milk to a premature infant-Pennsylvania, 2016. *Morb. Mortal. Wkly. Rep*. **66**, 761–762 (2017)
12. Burdette J. H., Santos C.: *Enterobacter sakazakii* brain abscess in the neonate: the importance of neuroradiologic imaging. *Pediatr. Radiol.* **30**, 33–34 (2000)
13. Caubilla-Barron J., Hurrell E., Townsend S., Cheetham P., Loc-Carrillo C., Fayet O., Pre're M.F., Forsythe S.J.: Genotypic and phenotypic analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from an outbreak resulting in fatalities in a neonatal intensive care unit in France. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 3979–3985 (2007)
14. Chaves C.E.V., Brandão M.L.L., Lacerda M.L.G.G., Rocha C.A.B.C., Leone de Oliveira S.M.D.V., Parpinelli T.C., Vasconcellos L., Forsythe S.J., Paniago A.M.M: Fatal *Cronobacter sakazakii* sequence type 494 meningitis in a newborn, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **24**, 1948–1950 (2018)
15. Coignard B., Desenclos J.C. i wsp.: Infections séverès à *Enterobacter sakazakii* chez des nouveau-nés ayant consommé une préparation en poudre pour nourissons, France, octubre-decembre 2004. *Bull. Epidemiol. Hebd*. **2**, 10–13 (2006)
16. Cruz A., Xicohtencatl-Cortes J., Gonza'lez-Pedrajo B., Bobadilla M., Eslava C., Rosas I.: Virulence traits in *Cronobacter* species isolated from different sources. *Can J. Microbiol.* **57**, 735–744 (2011)
17. Cui J.H., Yu B., Xiang Y., Zhang Z., Zhang T., Zeng Y.C., Cui Z.G., Huo X.X.: Two cases of multi-antibiotic resistant *Cronobacter* spp. infections of infants in China. *Biomed. Environ. Sci.* **30** , 601–605 (2017)
18. Dancer G.I., Mah J.H., Rhee M.S., Hwang I.G., Kang D.H.: Resistance of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) to environmental stresses. *J. Appl. Microbiol.* **107**, 1606–1614 (2009)
19. El-Sharoud W.M., O'Brien S., Negredo C., Iversen C. Fanning S., Healy B.: Characterization of *Cronobacter* recovered from dried milk and related products, *BMC Microbiol*. **9**, 1–9 (2009)
20. FAO-WHO Food Agricultural Organization-World Health Organization: *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula, Meeting Report Microbiological Risk Assessment 6, Geneva, Switzerland (2004) http://www.who.int/foodsafety/publications/mra6-enterobacter-sakazakii/en/ (03.12.2019)
21. FAO-WHO Food Agricultural Organization-World Health Organization:*Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula, Meeting Report Microbiological Risk Assessment 10, Geneva, Switzerland (2006) http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra10/en/index.html (03.12.2019)
22. FAO-WHO Food Agricultural Organization-World Health Organization: *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formula, Meeting Report Microbiological Risk Assessment 15, Geneva, Switzerland (2008) http://www.who.int/foodsafety/publications/mra_followup/en/ (03.12.2019)
23. Farmer J., Asbury M., Hickman F., Brenner D.: *Enterobacter sakazakii*, new species of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **86**, 221–225 (1980)
24. Friedemann M.: Epidemiology of invasive neonatal *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **28**, 1297–1304 (2009)
25. Garbowska M., Berthold-Pluta A., Stasiak-Różańska L.: Microbiological quality of selected spices and herbs including the presence of *Cronobacter* spp. *Food Microbiol.* **49,** 1–5 (2015)
26. Grim C.J., Tall B.D. i wsp.: Pan-genome analysis of the emerging foodborne pathogen *Cronobacter* spp. suggests a species-level bidirectional divergence driven by niche adaptation. *BMC Genomics*, **14**, 1–16 (2013)
27. Gupta T.B., Mowat E., Brightwell G., Flint S.H.: Biofilm formation and genetic characterization of New Zealand *Cronobacter* isolates. *J. Food Safety*. 1–13 (2017)
28. Gurtler J.B., Kornacki J.L., Beuchat L.R.: *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. *Int. J. Food Microbiol.* **104**, 1–34 (2005)
29. Hassan A., Akineden A., Kress C., Estuningsih S., Schneider E., Usleber E.: Characterization of the gene encoding the 16S rRNA of *Enterobacter sakazakii* and development of a species specific PCR method. *Int. J. Food Microbiol.* **116**, 214–220 (2007)
30. Henry M., Fouladkhah A.: Outbreak history, biofilm formation and preventive measures for control of *Cronobacter sakazakii* in infant formula and infant care settings. *Microorganisms*, **7**, 1–22 (2019)
31. Himelright I., Jernigan D. i wsp.: *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula-Tennessee, 2001. *J. Am. Med. Assoc.* **287**, 2204–2205 (2002)
32. Holỳ O., Forsythe S.: *Cronobacter* spp. as emerging causes of healthcare-associated infection. *J. Hosp. Infect.* **86**, 169–177 (2014)
33. Hu L., Grim C.J., Franco A.A., Jarvis K.G., Sathyamoorthy V., Kothary M.H., Tall B.D.: Analysis of the cellulose synthase operon genes, *bcsA, bcsB*, and *bcsC* in *Cronobacter* species: Prevalence among species and their roles in biofilm formation and cell-cell aggregation. *Food Microbiol.* **52**, 97–105 (2015)
34. Hurrell E., Kucerova, E., Loughlin M., Caubilla-Barron J., Forsythe, S.J.: Biofilm formation on enteral feeding tubes by *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella serovars* and other *Enterobacteriaceae*. *Int. J. Food Microbiol*. **136**, 227–231 (2009)

35. ISO 22964:2017 Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp. https://www.iso.org/standard/64708.html (04.11.2019)
36. ISO/TS 22964:2006 (IDF/RM 210: 2006) Milk and milk products – Detection of *Enterobacter sakazakii*, https://www.iso.org/standard/41258.html (04.11.2019)
37. Iversen C., Druggan P., Schumacher S., Lehner A., Feer C., Gschwend K., Joosten H., Stephan R.: Development of a Novel Screening Method for the Isolation of "*Cronobacter*" spp. (*Enterobacter sakazakii*). *Appl. Environ. Microb.* **74**, 2550–2553 (2008)
38. Iversen C., Forsythe S.: Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends Food Sci. Tech.* **14**, 443–454 (2003)
39. Iversen C., Lehner A., Mullane N., Bidlas E., Cleenwerck I., Marugg J., Fanning S., Stephan R., Joosten H.: The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecie. *BMC Evol. Biol.* **7**, 1–11 (2007)
40. Iversen C., Lehner A., Mullane N., Marugg J., Fanning S., Stephan R., Joosten H.: Identification of "*Cronobacter*" spp. (*Enterobacter sakazakii*). *J. Clin. Microbiol.* **45**, 11, (2007)
41. Jackson E.E., Flores J.P., Fernández-Escartín E., Forsythe S.J.: Reevaluation of a suspected *Cronobacter sakazakii* outbreak in Mexico. *J. Food Protect.* **78**, 1191–1196 (2015)
42. Jackson E.E., Forsythe S.J., Comparative study of *Cronobacter* identification according the phenotyping methods. *BMC Microbiol.* **16**, 146, (2016)
43. Jaradat Z.W., Mousa W.A., Elbetieha A., Nabulsi Al. A., Tall B.D.: *Cronobacter* spp. – opportunistic food-borne pathogens. A review of their virulence and environmental-adaptive traits. *J. Med. Microbiol.* **63**, 1023–1037 (2014)
44. Jarvis C.: Fatal *Enterobacter sakazakii* infection associated with powdered infant formula in a neonatal intensive care unit in New Zealand. *Am. J. Infect. Control.* **33**, 19– 54 (2005)
45. Joseph S., Forsythe S.J. i wsp.: Comparative analysis of genome sequences covering the seven *Cronobacter* species. *Plos ONE*, **7**, 1–13 (2012)
46. Joseph S., Forsythe S.J.: Predominance of *Cronobacter sakazakii* sequence type 4 in neonatal infections. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1713–1715 (2011)
47. Joseph S., Hariri S., Masood N., Forsythe S.J.: Sialic acid utilization by *Cronobacter sakazakii*. *Microb. Inform. Exp.* **3**, 1–11 (2013)
48. Kim J.B., Cho S.H., Park Y.B., Lee J.B., Kim J.C., Lee B.K., Lee H.K., Chae H.S.: Surveillance of stool samples for the presence of *Enterobacter sakazakii* among Korean people. *Yonsei Med. J.* **49**, 1017–1022 (2008)
49. Kim K., Jang S.S., Kim S.K., Park J.H., Heu S., Ryu S.: Prevalence and genetic diversity of *Enterobacter sakazakii* in ingredients of infant foods. *Int. J. Food Microbiol.* **122**, 196–203 (2008)
50. Kim K., Kim K.P., Choi J., Lim J.A., Lee J., Hwang S., Ryu S.: Outer membrane proteins A (OmpA) and X (OmpX) are essential for basolateral invasion of *Cronobacter sakazakii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 5188–5198 (2010)
51. Kim S., Kim Y.T., Yoon H., Lee J.H., Ryu S.: The complete genome sequence of *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 T, a goodborne pathogen, isolated from a child's throat. *Gut Pathog.* **9**, 1–7 (2017)
52. Kosikowska U., Stępień-Pyśniak D., Pietras-Ożga D., Andrzejczuk S., Juda M., Malm A.: Zastosowanie spektrofotometrii masowej MALDI-TOF MS w identyfikacji bakterii izolowanych z materiałów klinicznych od ludzi i zwierząt. *Diagn. Lab.* **51**, 23–30 (2015)
53. Lai K.K.: *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children and adults a case reports and a review of the literature. *Medicine*, **80**, 113–122 (2001)
54. Lee Y.D., Park J.H., Chang H.: Detection, antibiotic susceptibility and biofilm formation of *Cronobacter* spp. from various foods in Korea. *Food Control.* **24**, 225–230 (2012)
55. Lehner A., Tasara T., Stephan R.: 16S rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from differents ources and development of a PCR assay for identification. *BMC Microbiol.* **4**, 1–7 (2004)
56. Li Y., Chen Q., Zhao J., Jiang H., Lu F., Bie X., Lu Z.: Isolation, identification and antimicrobial resistance of *Cronobacter* spp. isolated from various foods in China. *Food Control*. **37**, 109–114 (2014)
57. Ling N., Zhang J., Li C., Zeng H., He W., Ye Y., Wu Q.: The Glutaredoxin Gene, *grxB*, Affects acid tolerance, Surface hydrophobicity, auto-aggregation and biofilm formation in *Cronobacter sakazakii*. *Front. Microbiol.* **9**, 1–12 (2018)
58. Liu Q., Mittal R., Emami C.N., Iversen C., Ford H.R., Prasadarao N.V.: Human isolates of *Cronobacter sakazakii* bind efficiently to intestinal epithelial cells in vitro to induce monolayer permeability and apoptosis. *J. Surg. Res*. **176**, 437–447 (2012)
59. Maćkiw E., Rzewsuka K., Tomczuk K., Izak D., Stoś K.: Występowanie *Cronobacter* sp. w wybranych produktach spożywczych. *Żywn. Nauk. Technol. Jakość.* **4**, 172–178 (2011)
60. Mange J.P., Stephan R., Borel N., Wild P., Kim K.S., Pospischil A., Lehner A.: Adhesive properties of *Enterobacter sakazakii* to human epithelial and brain microvascular endothelial cells. *BMC Microbiol.* **6**, 1–10 (2006)
61. McMullan R., Menon V., Beukers A.G., Jensen S.O., van Hal S.J., Davis R.: *Cronobacter sakazakii* infection from expressed breast milk, Australia. *Emerg. Infect. Dis*. **24**, 393–394 (2018)
62. Minor T., Lasher A., Brown B., Nordinelli Z., Zorn D.: The per case and total annual costs of foodborne illness in the United States. *Risk Anal*. **35**,1125–1139 (2015)
63. Molloy C., Cagney C., O'Brien S., Iversen C., Fanning S., Duffy G.: Surveillance and characterisation by pulsed-field gel electrophoresis of *Cronobacter* spp. in farming and domestic environments, food production animals and retail foods. *In. J. Food Microbiol.* **136** , 198–203 (2009)
64. Monroe P.W., Tift W.L.: Bacteremia associated with *Enterobacter sakazakii* (yellow, pigmented *Enterobacter cloacae*). *J. Clin. Microbiol.* **10**, 850–851 (1979)
65. Muytjens H.L., Zanen H.C., Sonderkamp H.J., Kollée L.A., Wachsmuth I.K., Farmer J.J.: Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii*. *J. Clin. Microbiol.* **18**, 115–120 (1983)
66. Nair M.K.M., Venkitanarayanan K.S.: Cloning and sequencing of the *ompA* gene of *Enterobacter sakazakii* and development of an *omp*A targeted PCR for rapid detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2539–2546 (2006)
67. Nazarowec-White M., Farber J.M.: Incidence, survival, and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *J. Food Protect.* **60**, 226–230 (1999)
68. Nikonorow E., Baraniak A., Gniadkowski M.: Oporność bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* na antybiotyki β-laktamowe wynikająca z wytwarzania β-laktamaz. *Post. Mikrobiol.* **3**, 261–271 (2013)
69. Ogrodzki P., Forsythe S.J.: DNA-sequence based typing of the *Cronobacter* genus using MLST, CRISPR-cas array and capsular profiling. *Front. Microbiol.* **8**, 1–15 (2017)

70. Oonaka K., Furuhata K., Hara M., Fukuyama M.: Powder infant formula milk contaminated with *Enterobacter sakazakii*. *J. Infect. Dis.* **63**, 103–107 (2010)
71. Pagotto F.J., Nazarowec-White M., Bidawid S., Farber J.M.: *Enterobacter sakazakii*: infectivity and enterotoxin production in vitro and in vivo. *J. Food. Prot*. **66**, 370–375 (2003)
72. Parra-Flores J., Cerda-Leal F., Contreras A., Valenzuela-Riffo N., Alejandra Rodríguez A., Aguirre J.: *Cronobacter sakazakii* and microbiological parameters in dairy formulas associated with a food alert in Chile. *Front. Microbiol.* **9**, 1–9 (2018)
73. Pavcnik-Arnol M., Hojker S., Derganc M.: Lipopolysaccharide – binding protein, lipopolysaccharide, and soluble CD14 in sepsis of critically ill neonates and children. *Intens. Care. Med.* **33**, 1025–1032 (2007)
74. Pei X., Li Y., Zhang H., Zhan L., Yu X., Lan G., Jia H., Li N., Yang D., Mei L.: Surveillance and characterization of *Cronobacter* in powdered infant formula processing factories. *Food Control.* **96**, 318–323 (2019)
75. Pitout J.D., Moland E.S., Sanders C.C., Thomson K.S., Fitzsimmons S.R.: Beta-lactamases and detection of betalactam resistance in *Enterobacter* spp. *Antimicrob. Agents. Chemother*. **41**, 35–39 (1997)
76. Raghav M., Aggarwal P.K.: Purification and characterization of *Enterobacter sakazakii* enterotoxin. *Can. J. Microbiol*. **53**, 750–755 (2007)
77. RASFF Alert notification 2002/190: *Enterobacter sakazakii* in infant formula from Germany(2002), https://webgate.ec.europa.eu/rasffwindow/portal/?event=notificationDetail&NOTIF_REFERENCE=2002.190 (02.06.2019)
78. RASFF Alert notification 2004/658: *Enterobacter sakazakii* in infant formula (2004) https://webgate.ec.europa.eu/rasffwindow/portal/?event=notificationDetail&NOTIF_REFERENCE=2004.658 (02.06.2019)
79. RASFF Alert notification 2007/452: *Enterobacter sakazakii* (present/10 g) in infant formula from Switzerland via Germany (2007) https://webgate.ec.europa.eu/rasffwindow/portal/?event=notificationDetail&NOTIF_REFERENCE=2007.452 (02.06.2019)
80. Ray P., Das A., Gautam V., Jain N., Narang A., Sharma M.: *Enterobacter sakazakii* in infants: novel phenomenon in India. *Indian J. Med. Microbiol*. **25**, 408–410 (2007)
81. Reich F., Konig R., Wiese W., Klein G.: Prevalence of *Cronobacter* spp. in a powdered infant formula processing environment. *Int. J. Food Microbiol.* **140**, 214–217 (2010)
82. Rozporządzenie Komisji (WE) NR 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych, https://eurlex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/PDF/?uri=CELEX:02005R2073-20111201&from=EN (04.09.2019)
83. Shadlia-Matung M., Aidoo K.E., Candlish A.A., Elgebri A.M.: Evaluation of some antibiotics against pathogenic bacteria isolated from infant foods in North Africa. *Open Food Sci. J.* **2**, 95–101 (2008)
84. Simmons B.P., Gelfand M.S., Haas M., Metts L., Ferguson J.: *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **10**, 398–401 (1989)
85. Sosnowski M., Czubkowska A., Korpysa-Dzirba W., Ostrowska M., Rola J., Osek J. *Cronobacter sakazakii* – charakterystyka i znaczenie w mikrobiologii żywności. *Med. Weter.* **70**, 669–672 (2010)
86. Stoll B.J., Hansen N., Fanaroff A.A., Lemons J.A.: *Enterobacter sakazakii* is a rare cause of neonatal septicemia or meningitis in VLBW infants. *J. Pediatr.* **144**, 821–823 (2004)
87. Stasiak-Różańska L., Garbowska M., Bertold A., Molska I., Ciepielewska-Janas J.: Jakość mikrobiologiczna preparatów do żywienia niemowląt i małych dzieci ze szczególnym uwzględnieniem *Enterobacteriaceae* i *E. sakazakii*. *Med. Weter.* **66**, 622–625 (2010)
88. Strydom A., Cameron M., Witthuhn R.C.: PCR-RFLP analysis of the *rpoB* gene to distinguish the five species of *Cronobacter*. *Food Microbiol.* **28**, 1472–1477 (2011)
89. Suijkerbuijk A.W.M. Gesignaleerd. *Infectieziekten Bulletin*, **16**, 1–3 (2005)
90. Sundararajan M., Cope J. R i wsp.: Notes from the Field: *Cronobacter sakazakii* meningitis in a full-term neonate fed exclusively with breast milk — Indiana, 2018. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep*. **67**, 1248–1249 (2018)
91. Townsend S.M., Hurrell E., Gonzalez-Gomez I., Lowe J., Frye J.G., Forsythe S., Badger J.L.: *Enterobacter sakazakii* invades brain capillary endothelial cells, persists in human macrophages influencing cytokine secretion and induces severe brain pathology in the neonatal rat. *Microbiology*, **153**, 3538–3547 (2007)
92. Townsend S., Hurrell E., Forsythe S.: Virulence studies of *Enterobacter sakazakii* isolates associated with a neonatal intensive care unit outbreak. *BMC Microbiol*. **8**, 1–9 (2008)
93. Urmenyi A.M., Franklin A.W.: Neonatal death from pigmented coli form infection. *Lancet*, **12**, 313–315 (1961)
94. van Acker J., de Smet F., Muyldermans G., Bougatef A., Naessens A., Lauwers S.: Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 293–297 (2001)
95. Vlach J., Javůrková B., Karamonová L., Blažková M., Fukal L.: Novel PCR-RFLP system based on *rpoB* gene for differentiation of *Cronobacter* species. *Food Microbiol.* **62**, 1–8 (2017)
96. Wang L., Hu X., Tao G., Wang X.: Outer membrane defect and stronger biofilm formation caused by inactivation of a gene encoding for heptosyltransferase I in *Cronobacter sakazakii* ATCC BAA-894. *J. App. Microbiol.* **112**, 985–997 (2012)
97. Wang Q., Forsythe S.J., Zhao X.J., Wang Z.W., Li D., Ma D., Cao J.Y., Zeng J.: Species identification and molecular characterization of *Cronobacter* spp. isolated from food imported over nine years into Beijing. China. *Food Microbiol.* **82**, 11–19 (2019)
98. Willis J., Robinson, J.E.: *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **7**, 196–199 (1988)
99. Xu X, Li C., Wu Q., Zhang J., Huang J., Yang G.: Prevalence, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. in Chinese ready-to-eat foods. *Int. J. Food Microbiol.* **204**, 17–23 (2015)
100. Ye Y., Jiao R., Gao J., Li H., Ling N., Wu Q., Zhang J., Xu X.: Proteins involved in responses to biofilm and planktonic modes in *Cronobacter sakazakii*. *LWT – Food Sci. Technol.* **65**, 1093–1099 (2016)
101. Zeng H., Wu Q. i wsp.: Novel multidrug-resistant *Cronobacter sakazakii* causing meningitis in neonate, China, 2015. *Emerg. Infect. Dis*. **24**, 2121–2124 (2018)
102. Zhou X., Gao J., Huang Y., Fu S., Chen H.: Antibiotic resistance pattern of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter sakazakii* isolates from powdered infant formula. *Afr. J. Microbiol. Res.* **5**, 3073–3077 (2011)

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2020, 59, 2, 153–165
DOI: 10.21307/PM-2020.59.2.012

MECHANIZMY POWSTAWANIA OPORNOŚCI DERMATOFITÓW NA SUBSTANCJE PRZECIWGRZYBICZE

Dominik Łagowski, Sebastian Gnat*, Aneta Nowakiewicz

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt, Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej

Wpłynęło w listopadzie 2019 r., zaakceptowano w marcu 2020 r.

Streszczenie: Dermatofity to grzyby chorobotwórcze, które mają wysokie powinowactwo do keratyny obecnej w paznokciach, skórze i włosach, powodujące zakażenia powierzchniowe znane jako grzybice skórne lub dermatomykozy. Rokowania w przebiegu dermatomykoz mogą być różne, a obraz kliniczny choroby w dużym stopniu zależny jest od statusu immunologicznego gospodarza i może mieć postać od ograniczonych zakażeń skórnych lub podskórnych do infekcji inwazyjnych, rozsianych i zagrażających życiu. W pierwszych dziesięcioleciach XX wieku pojawiły się pierwsze obawy związane z narastającą prewalencją infekcji grzybiczych u ludzi, której powodów upatrywano w różnych czynnikach środowiskowych i rozwoju cywilizacyjnym. W konsekwencji zostały podjęte pierwsze próby terapeutyczne ukierunkowane na leczenie tych infekcji. Obecnie lekarze mają do dyspozycji przynajmniej kilka różnych grup leków przeciwgrzybiczych. Niemniej jednak nakładające się mechanizmy działania tych substancji i przerywanie terapii przez pacjentów mogą być przyczyną pojawiania się szczepów wykazujących oporność, także wielolekową. Celem niniejszej pracy jest dokonanie przeglądu literatury traktującej o mechanizmach powstawania oporności wobec substancji przeciwgrzybiczych przez dermatofity. W drodze ewolucji grzyby te wytworzyły złożone układy odpowiedzi immunologicznej obejmujące elementy systemu sygnalizacji środowisko-komórka, reakcje na stresory jak i tolerancje na szkodliwe substancje chemiczne. Ekspozycja dermatofitów na lek przeciwgrzybiczy, uszkodzenie ich ściany komórkowej, zaburzenia osmolarności środowiska i pojawienie się w nim reaktywnych form tlenu stanowią bodźce, które mogą być aktywatorami szlaków sygnałowych, mających na celu przeciwdziałanie skutkom nagłego stresu komórkowego. Większość z mechanizmów molekularnych leżących u podstaw odpowiedzi na te stresory stanowi również mechanizm tolerancji i oporności na substancje przeciwgrzybicze. Poznanie tych mechanizmów może w przyszłości doprowadzić do opracowania nowych chemioterapeutyków, które stanowić będą kluczową strategię w leczeniu opornych na obecnie dostępne leki przeciwgrzybicze szczepów dermatofitów.

1. Wprowadzenie. 2. Obecnie stosowane leki przeciwgrzybicze. 3. Ekspozycja patogenu na lek, reakcja na stres i adaptacja. 4. Mechanizmy wyrzutu leku z komórki. 5. Mechanizmy detoksyfikacji leków. 6. Transkrypcyjna modulacja genów szlaków sygnałowych. 7. Rola białek szoku cieplnego w lekooporności. 8. Mutacje w genach docelowych enzymów wpływające na lekooporność. 9. Elementy strukturalne komórki wpływające na lekooporność. 10. Podsumowanie

MECHANISMS OF DERMATOPHYTE RESISTANCE TO ANTIFUNGAL SUBSTANCES

Abstract: Dermatophytes are pathogenic fungi with high affinity for keratinised structures present in nails, skin, and hair causing superficial infections known as skin mycoses or dermatomycoses. The disease is characterised by variable prognosis. Its clinical picture is largely dependent on the immune status of the host and can range from local skin or subcutaneous infections to invasive, disseminated, and life-threatening infections. In the first decades of the 20th century, the first concerns were raised about the growing prevalence of fungal infections in humans, which was ascribed to various environmental factors and anthropopressure. Consequently, the first therapeutic attempts were made to treat these infections. At present, at least several different groups of antifungal drugs are available for medical treatment. Nevertheless, the overlapping mechanisms of action of these substances and discontinuation of therapy by patients may contribute to the emergence of resistance of strains, including multi-drug resistance. The aim of this study is to review the literature focused on the mechanisms of resistance developed by dermatophytes to antifungal substances. Through evolution, these fungi have developed complex cellular response systems comprising elements of the environment-cell signalling system, responses to stressors, and tolerance to harmful chemical substances. Such stimuli as exposure of dermatophytes to an antifungal drug, damage to their cell wall, and disturbances in the osmolarity of the environment with generation of reactive oxygen species can be activators of signalling pathways targeted at mitigation of the effects of sudden cellular stress. A majority of molecular mechanisms underlying the response to these stressors also constitute a mechanism of tolerance and resistance to antifungal substances. In the future, elucidation of these mechanisms may lead to development of new chemotherapeutics that will become a key strategy in the treatment of dermatophyte strains exhibiting resistance to currently available antifungal drugs.

1. Introduction. 2. Current antifungal drugs. 3. Exposure of the pathogen to drugs, stress response, and adaptation. 4. Mechanisms of drug efflux from the cell. 5. Mechanisms of drug detoxification. 6. Transcriptional modulation of signalling pathway genes. 7. Role of heat shock proteins in drug resistance. 8. Mutations in target enzyme genes inducing drug resistance. 9. Structural elements of the cell contributing to drug resistance. 10. Summary

Słowa kluczowe: dermatofity, substancje przeciwgrzybicze, lekooporność
Key words: dermatophytes, antifungal substances, drug resistance

* Autor korespondencyjny: Sebastian Gnat, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt, Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; tel. 81 445 60 93; e-mail: sebastian.gnat@up.lublin.pl

1. Wprowadzenie

Dermatofity to grupa blisko spokrewnionych gatunków grzybów z rodziny *Arthrodermataceae*, które mają zdolność inwazji zrogowaciałych struktur u ludzi i zwierząt oraz wywoływania infekcji powierzchniowych. Dermatofity są grzybami chorobotwórczymi, które czerpią substancje odżywcze z keratyny znajdującej się w wytworach naskórka [34]. Wydzielają one szerokie i zróżnicowane spektrum enzymów litycznych, takich jak lipazy i proteazy, a zwłaszcza keratynazy, które umożliwiają im kolonizację i utrzymanie się w *stratum corneum* gospodarza [63, 72]. Dermatofitozy dotykają każdego roku miliony ludzi i zwierząt [35]. Chociaż ten stan chorobowy nie jest uważany za zagrażający życiu, obniża jego jakość i nakłada na pacjentów oraz hodowców znaczne koszty leczenia. Status immunologiczny gospodarza stanowi główny czynnik predylekcyjny przebiegu infekcji dermatofitowych i pozwala określić czy choroba będzie ograniczona wyłącznie do zmian powierzchniowych, czy ewentualnie istnieje możliwość przyjęcia formy rozsianej bądź głębokiej [50]. W zdecydowanej większości przypadków infekcje te dotykają jednak zarówno pacjentów z prawidłową, jak i z obniżoną odpornością [52]. Grzyby z rodzaju *Candida* i *Malassezia,* oprócz dermatofitów, mogą być również czynnikami etiologicznymi infekcji powierzchniowych [41].

Do dyspozycji dermatologów i lekarzy weterynarii znajduje się szeroki wachlarz dostępnych leków przeciwgrzybiczych. Podczas gdy stosowanie miejscowego środka przeciwgrzybiczego jest zwykle wystarczające do wyeliminowania dermatofitu i wyleczenia większości przypadków infekcji o charakterze antropofilnym, znacznych trudności nastręczają dermatofitozy zoofilne u ludzi, szczególnie *tinea capitis* i *tinea unguium*, często wymagające wprowadzenia leczenia ogólnoustrojowego [65]. Z kolei dermatofitozy u zwierząt, zwłaszcza hodowlanych, bywają lekceważone przez hodowców, a nieleczone stanowią źródło patogenów mogących ulegać transmisjom międzyosobniczym [51, 52]. Ważną cechą substancji stosowanych w leczeniu grzybic powierzchniowych jest możliwość łatwej penetracji przez te leki do *stratum corneum* i utrzymywanie się w nim w stałym stężeniu przez cały okres trwania terapii [49].

Celem niniejszej pracy jest przegląd literatury naukowej traktującej o różnych mechanizmach powstawania oporności na poziomie molekularnym i fenotypowym wobec substancji przeciwgrzybiczych przez dermatofity.

2. Obecnie stosowane leki przeciwgrzybicze

Pomimo dostępności przynajmniej kilku grup leków przeciwgrzybiczych przeznaczonych do użytku klinicznego, działają one na ograniczoną liczbę celów komórkowych, tj. blokują syntezę błony komórkowej, ściany komórkowej, kwasów nukleinowych i proces podziału komórek (Tabela I). Lekarze mają obecnie do dyspozycji w szczególności cztery klasy leków przeciwgrzybiczych: (1) imidazole i triazole (ketokonazol, klotrimazol, flukonazol, itrakonazol, worykonazol, pozakonazol, izawukonazol), które hamują enzymatyczną 14-α-demetylazę sterolu i zatrzymują biosyntezę ergosterolu; (2) leki polienowe (amfoterycyna B, nystatyna, natamycyna), które wiążą się z ergosterolem, doprowadzając do wzrostu przepuszczalności błony komórkowej; (3) echinokandyny (kaspofungina, mikafungina, anidulafungina), które hamują biosyntezę β-(1–3)-D-glukanu, jednego z głównych składników ściany komórkowej grzybów; i (4) pochodne allyloaminy (terbinafina, naftifina), których mechanizm działania polega na hamowaniu w błonie komórkowej grzyba syntezy ergosterolu na etapie epoksydacji skwalenu [57]. Rzadziej stosowanymi lekami są: (1) gryzeofulwina, która zaburza syntezę chityny i zakłóca tworzenie mikrotubul, upośledzając wzrost grzybów i podziały komórek; (2) pirymidynowy analog 5-fluorocytozyny, hamujący syntezę DNA i RNA, co prowadzi do zahamowania podziałów komórkowych i defektów syntezy białek; (3) oleamina cyklopiroksowa, działająca, jako inhibitor syntezy białek i zwiększająca przepuszczalność błony komórkowej dla aminokwasów, peptydów i potasu w efekcie nieodwracalnego wiązania z różnymi strukturami i organellami komórki [57]. Niestety, w wielu przypadkach środki te mają właściwości toksyczne dla ludzi, wykazują duże interakcje lekowe i/lub nie są wystarczająco aktywne w zwalczaniu infekcji, ponieważ grzyby stały się na nie oporne.

Nakładające się mechanizmy działania powszechnie stosowanych substancji przeciwgrzybiczych mogą przyczyniać się do pojawiania się szczepów wykazujących oporność wielolekową (multidrug resistance, MDR). Co więcej, pacjenci często zaniedbują leczenie bądź rezygnują z niego ze względu na konieczność długotrwałego stosowania i związane z tym działania niepożądane [60, 72], a to z kolei również może skutkować powstawaniem szczepów opornych. Z kolei oporność kliniczna i/lub mikrobiologiczna może spowodować niepowodzenie leczenia, skutkujące przewlekłością choroby bądź jej nawrotami. Dotychczas opisano przynajmniej kilka różnych mechanizmów powstawanie oporności lekowej u dermatofitów (Rycina 1).

3. Ekspozycja patogenu na lek, reakcja na stres i adaptacja

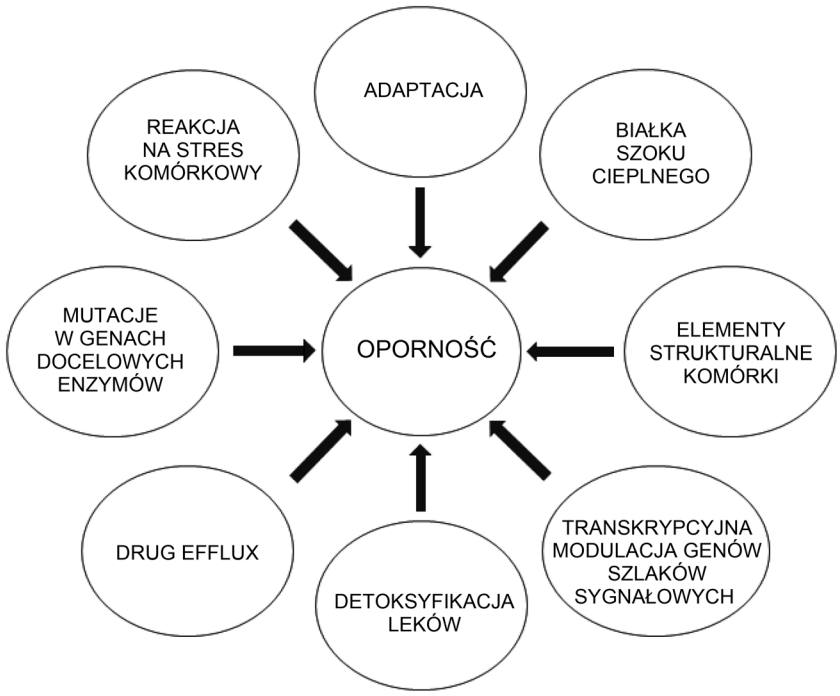
Odpowiednia reakcja na lek przeciwgrzybiczy i stres komórkowy nim wywołany są mechanizmem umożliwiającym przetrwanie dermatofitów [13]. W drodze ewolucji grzyby te wytworzyły złożone układy odpo-

Tabela I
Popularnie stosowane leki przeciwgrzybicze i mechanizmy ich działania

Grupa substancji	Przedstawiciele	Mechanizm działania
Azole	Flukonazol, Ketokonazol, Itrakonazol, Worikonazol, Posakonazol, Isawukonazol Klotrimazol, Mikonazol, Ekonazol, Lulikonazol, Lanokonazol, Efinakonzol, Sertakonazol, Oxikonazol, Eberkonazol, Fentikonazol, Bifonazol	Wiązanie z układem cytochromu P-450, co prowadzi do hamowania hydroksylacji i demetylacji prekursorów ergosterolu. W wyniku zahamowania demetylazy lanosterolu w miejscu ergosterolu podstawiane są zmetylowane sterole
Echinokandyny	Anidulafungina, Kaspofungina, Mikafungina	Zaburzenie biosyntezy ściany komórkowej grzyba przez blokadę aktywności syntetazy 1,3-β-D-glukanu, enzymu odpowiedzialnego za syntezę glukanu
Polieny	Nystatyna, Natamycyna, Amfoterycyna B	Wiązanie ergosterolu zawartego w błonie komórkowej; zaburzenie integralności błony komórkowej, zwiększenie jej przepuszczalności dla jonów potasu i aminocukrów
Fluorowane pochodne pirymidyny	Flucytozyna	Po konwersji do czynnych metabolitów, zahamowanie syntezy kwasów nukleinowych poprzez inhibicję syntetazy tymidylanowej i/lub włączanie się do grzybowego RNA zamiast kwasu urydylowego
Pochodne heterocykliczne benzofuranu	Gryzeofulwina	Zaburzenie tworzenie mikrotubul i powstawania wrzeciona podziałowego
Alliloaminy	Terbinafina, Butenafina, Naftifina	Hamowanie aktywności epoksydazy skwalenowej, wewnątrzkomórkowa kumulacja lanosterolu
Pochodne pirydynonu	Cyclopiroks	Chelatacja trójwartościowych kationów metali; hamowanie enzymów zależnych od jonów metali – katalazy, peroksydazy; hamowanie enzymów biorących udział w mitochondrialnych procesach transportu elektronów i produkcji energii
Pochodne fenylomorfoliny	Amorolfina	Hamowanie reduktazy C-14 i izomerazy C8 w szlaku syntezy ergosterolu
Tiokarbaminiany	Tolnaftat	Hamowanie epoksydazy skwalenowej
Inne	Kwas undekainowy	Hamowanie szlaku biosyntezy kwasów tłuszczowych u dermatofitów; w przypadku *C. albicans* zaburzanie morfogenezy
	Tawaborol	Inhibicja leucyl-t-RNA syntetazy
	Me1111	Inhibicja dehydrogenazy bursztynianowej

wiedzi immunologicznej obejmujące elementy systemu sygnalizacji środowisko-komórka, reakcje na stresory jak i oporność na substancje przeciwgrzybicze [13]. Ekspozycja dermatofitów na lek przeciwgrzybiczy, uszkodzenie ich ściany komórkowej, zaburzenia osmolarności środowiska wzrostu i pojawienie się w nim reaktywnych form tlenu stanowią bodźce, które mogą być aktywatorami szlaków sygnałowych, mających na celu przeciwdziałanie skutkom nagłego stresu komórkowego [42]. Główne szlaki sygnalizacyjne zaangażowane w tolerancję i oporność na środki przeciwgrzybicze są regulowane przez białko szoku cieplnego Hsp90, które kontroluje stabilność i aktywację kluczowych regulatorów odpowiedzi na stres, takich jak kalcyneuryna i kinaza MAP (mitogen-activated protein) w układzie integralności ściany komórkowej [14, 75].

Wśród grzybów chorobotwórczych większość znanych mechanizmów molekularnych leżących u podstaw tolerancji i oporności na substancje przeciwgrzybicze została wyjaśniona w przypadku grzybów z rodzaju *Candida*, *Cryptococcus* i *Aspergillus*, natomiast w przypadku dermatofitów jest bardzo słabo poznana. Niektóre dermatofity, szczególnie dobrze mechanizm ten został opisany dla *Trichophyton interdigitale* i *Trichophyton rubrum*, w wyniku ekspozycji na substancje przeciwgrzybicze w dawkach zbliżonych do wartości MIC (Minimal Inhibitory Concentration) modulują poziomy ekspresji genów związanych z różnymi procesami metabolicznymi, takimi jak transport białek, metabolizm lipidów, transdukcja szlaków sygnałowych czy modyfikacja potranslacyjna białek [62, 68, 71, 75]. Dodatkowo, u *T. interdigitale* wykazano, że geny kodujące elementy podlegające transpozycji ulegają zwiększonej ekspresji po ekspozycji grzyba na różne substancje przeciwgrzybicze [68, 71]. Z kolei transpozony mogą wpływać dodatnio na ekspresję genów odpowiedzialnych za odpowiedź na stres środowiskowy [26]. Podobne reakcje zostały opisane dla *Schizosaccharomyces pombe*, u których to grzybów odnotowano preferencyjną integrację retrotranspozonu Tf1 z promotorami



Ryc. 1. Czynniki wpływające na występowanie lekooporności u dermatofitów

genów odpowiedzi na stres, w konsekwencji doprowadzającą do zwiększenia ich ekspresji [26].

Mechanizmy regulacyjne biorące udział w odpowiedzi na stres są złożone i obejmują również molekularny poziom komórki grzyba. W przypadku ekspozycji *T. rubrum* na kwas undekanowy obserwowana jest wzmożona aktywność procesów obejmujących pre-RNA, regulujących ekspresję genów kodujących fosfoglukomutazę, która bierze udział w glukoneogenezie i biosyntezie ściany komórkowej [62]. Enzym ten działa w kooperacji z dehydrogenazą monofosforanu inozyny, która odgrywa kluczową rolę w dostarczaniu guaniny do komórek [62]. Zauważono, że powtarzająca się ekspozycja *T. rubrum* na leki przeciwgrzybicze w stężeniach zbliżonych do MIC, w modelu *in vitro,* może prowadzić do selekcji szczepów zdolnych do przeżycia przy wyższych stężeniach leków przeciwgrzybiczych. Usunięcie ze środowiska dermatofitu danej substancji powodowała po pewnym czasie odzyskanie wrażliwości [31].

Szczepy dermatofitów, które są w stanie przeżyć w wyższych stężeniach leków przeciwgrzybiczych można określić jako tolerancyjne, czyli zdolne do przetrwania przejściowej ekspozycji lub jako oporne, które w sposób trwały nabyły, najczęściej w drodze mutacji, zdolności przeżywania w obecności w środowisku substancji niekorzystnych [17]. U grzybów z rodzaju *Candida* i *Aspergillus* białko szoku cieplnego Hsp90 ma zdolność do zwiększania tolerancji na leki poprzez stabilizację kluczowych regulatorów odpowiedzi na stres komórkowy i innych elementów wrażliwych w wielu szlakach sygnalizacyjnych [75]. Obecność środków przeciwgrzybiczych w środowisku wzrostu grzybów i stres jaki wywołują, wymusza szybkie zmiany adaptacyjne, które obejmują modulację ekspresji genów w syntezie wielu białek jako jeden z głównych mechanizmów służących do przetrwania w niesprzyjającym środowisku i niwelowaniu negatywnych skutków stresu komórkowego [73, 75, 97]. Istotne znaczenie tych genów jakie posiadają w przeżyciu grzybów w warunkach stresowych sugeruje, że można je uznać za potencjalne cele w poszukiwaniu nowych substancji o działaniu przeciwgrzybiczym.

4. Mechanizmy wyrzutu leku z komórki

Działanie pomp wyrzutowych (efflux pump) polega na aktywnym wypompowywaniu z komórki grzyba różnych substancji, m.in. leków przeciwgrzybiczych, substancji czynnych preparatów dezynfekcyjnych itp. [9, 20]. W rezultacie tej aktywności dochodzi do zmniejszenia wewnątrzkomórkowego stężenia tych substancji, czego skutkiem jest ograniczenie ich działania bójczego [20, 74]. Pompy molekularne wymieniane są w literaturze naukowej jako jedna z głównych przyczyn niepowodzenia w terapii przeciwgrzybiczej. Czynne usuwanie szkodliwych względem grzyba substancji z wnętrza komórki prowadzi do stopniowego i niespecyficznego wzrostu oporności na leki poprzez zmniejszenie oczekiwanego efektu *in vivo*. Stanowi też jedną z kluczowych strategii wykorzystywaną przez dermatofity do przetrwania w niekorzystnym środowisku jak i uzyskania oporności na substancje, które się w nim pojawiają [9, 86].

Zdolność do modyfikacji ekspresji pomp wyrzutowych przyczynia się w sposób pośredni do zwiększenia patogenności dermatofitów, ułatwiając im kolonizację tkanek gospodarzy [12, 86]. Oporność wielolekowa wynika w dużej mierze ze zwiększonej ekspresji genów należących do nadrodziny kaset wiążących ATP, a przede wszystkim transporterów ABC, które to występują zarówno u prokariontów, jak i eukariontów [20]. Białka te zawierają dwa odrębne regiony: wysoce konserwatywną domenę wiążącą nukleotydy i zmienną domenę transbłonową. Transportery ABC aktywnie przenoszą wiele różnych pod względem strukturalnym i chemicznym związków przez błony komórkowe poprzez wiązanie i hydrolizę ATP, zmniejszając w ten sposób ich kumulację w komórce [12, 20]. Produkty genów należących do tej nadrodziny można podzielić na kilka podrodzin, tj. PDR (pleiotropic drug resistance), MDR (multidrug resistance), MRP (multidrug resistance associated protein), RL1 (RNase L Inhibitor 1), YEF3 (yeast elongation factor 3) oraz ALDP (adrenoleukodystrophy protein) [16]. Na podstawie dostępnych sekwencji genowych różnych gatunków dermatofitów stwierdzono, że te transportery stanowią jednorodną grupę o niskiej różnorodności genetycznej, tylko z nielicznymi wyjątkami pośród dermatofitów [8]. Analiza siedmiu gatunków dermatofitów (*Microsporum canis*, *Trichophyton equinum*, *Nannizzia gypsea*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans, Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton verrucosum*) wykazała, że geny transporterów ABC występują w genomie przynajmniej w kilku powtórzeniach [29]. Dodatkowo, geny transporterów ABC współdziałają z pozostałymi genami w taki sam sposób, pomimo fenotypowej i adaptacyjnej wyjątkowości każdego gatunku dermatofitu [29].

Aktywne usuwanie metabolitów przez pompy typu efflux jako możliwego mechanizmu oporności zostało szczególnie dobrze zbadane u *T. interdigitale* oznaczonego jako H6 (szczep pierwotnie zidentyfikowany jako *T. rubrum*). Fachin i wsp. [22] wysnuli hipotezę, że za zaobserwowaną oporność na gryzeofulwinę i tiokonazol u tego szczepu dermatofitu odpowiedzialny jest mechanizm wyrzutu substancji z komórki. Interesujące jest, że u tego szczepu zauważona została zwiększona transkrypcja genów *mdr1* i *mdr2* po ekspozycji na różne substancje o działaniu przeciwgrzybiczym [9, 23, 68]. W późniejszych badaniach wykazano, że zakłócenie funkcjonowania genu *mdr2* uczyniło mutanta bardziej wrażliwym na terbinafinę, ale nie na inne testowane preparaty (itrakonazol, bromek etydyny, 4NQO, ketokonazol, gryzeofulwinę, flukonazol, cykloheksymid, tiokonazol, akryflawinę, benomyl, imazil), przez co została odrzucona hipoteza modulacyjnej roli tego genu na podatność na leki wysnuta w pierwszym etapie badań zespołu Ana Fachin [23]. Inne wyniki badań wykazały, że po ekspozycji na środki przeciwgrzybicze obserwowana jest wzmożona ekspresja genu *mdr4* [61]. Aktywność produktu tego genu w pośredni sposób zależy od aktywności transportera ABC, co sugeruje istnienie interakcji sieciowej w odniesieniu do mechanizmu MDR, a także współzależności w aktywnym usuwaniu substancji z komórki grzyba różnych transporterów należących do omawianej nadrodziny [61, 94]. Należy uwzględnić fakt, że jednoczesne działania różnych transporterów ABC, których profile substratowe zachodzą na siebie, umożliwia komórce grzyba szybkie usunięcie niepożądanej i/lub szkodliwej substancji [32].

Badania poziomu ekspresji genów *pdr1*, *mdr2* i *mdr4* w trakcie eksponowania czterech gatunków dermatofitów sklasyfikowanych w rodzaju *Trichophyton*, tj. *T. equinum*, *T. interdigitale, T. rubrum* i *T. tonsurans* na różne warunki środowiskowe nie wykazały zależności filogenetycznej ani funkcjonalnej między nimi [29, 61]. Zauważono jednak, że u tych gatunków badane geny wydają się działać synergicznie, co pozwala stwierdzić, że brak działania jednego genu *mdr* może być kompensowane przez inne geny z tej grupy [29, 60, 61].

Ze względu na kluczową rolę pomp wyrzutowych w nabywaniu lekooporności u dermatofitów, zastosowanie inhibitorów lub modulatorów transporterów ABC do blokowania i odwracania odpowiedzi MDR stanowi potencjalnie alternatywną metodę w zwiększaniu skuteczności terapii przeciwgrzybiczej [32, 44, 86]. Dotychczas opracowano kilka związków, między innymi izonitryl, enniatyna, milbemycyna, ibuprofen i inhibitor kalcyneuryny FK506, które wykazują właściwości modulujące MDR poprzez synergistyczne działanie z substancjami przeciwgrzybiczymi [44]. Związki te wykazują skuteczne działanie blokujące aktywność pomp wyrzutowych u opornego na terbinafinę szczepu *Microsporum canis* [44, 48]. Należy jednak wziąć pod uwagę, że w zależności od warunków środowiskowych interakcje gospodarz – patogen, a także zależności między grzybami zasiedlającymi tę samą niszę ekologiczną, ekspresja genów transporterów ABC, a tym samym ich aktywność, będzie podlegała modulowaniu [61]. Dodatkowo, transportery ABC nie stanowią homogennej grupy genetycznej [44, 61]. Co więcej, wiele podobieństw między komórkami grzybowymi i ludzkimi stanowi wyzwanie terapeutyczne ze względu na ograniczony wybór leków przeciwgrzybiczych i ich toksyczny wpływ nie tylko dla grzyba, ale i dla gospodarza [60]. Idealny lek wpływający na modulowanie genów MDR musi zatem być zdolny do uwrażliwiania komórek grzyba na dostępne środki przeciwgrzybicze, jednocześnie nie wpływając na komórki gospodarza [32, 44]. Wysoce prawdopodobne jest, że w przyszłości wykorzystanie modulatorów genów MDR będzie stanowić kluczową strategię w leczeniu opornych na obecnie dostępne leki przeciwgrzybicze szczepów dermatofitów.

5. Mechanizmy detoksyfikacji leków

W trakcie ekspozycji dermatofitów na stężenia leków zbliżone do hamujących wzrost i namnażanie zauważono, że zwiększona jest ekspresja genów odpowiedzialnych za detoksykację komórkową. Persinoti i wsp. [73] wykazali na podstawie analizy sekwencji RNA szczepu *T. rubrum* eksponowanego na akryflawinę, że geny zaangażowane w detoksykację komórkową ulegały wzmożonej regulacji pozytywnej, a w szczególności dotyczyło to genów kodujących katalazy, enzymy chroniące komórkę przed stresem oksydacyjnym i reaktywnymi formami tlenu. Zwiększona ekspresja genów katalazy może stanowić mechanizm kompensacyjny w celu utrzymania stałego poziomu tego enzymu wewnątrz komórki, chroniąc ją w ten sposób przed negatywnymi skutkami działania leku. Ponadto, analiza sekwencji RNA w celu określenia ekspresji genów *T. rubrum* poddanego działaniu kwasu undecylenowego również wykazała regulację pozytywną kilku genów kodujących enzymy antyoksydacyjne [58]. W odpowiedzi na kwas undecylenowy, oprócz zwiększonej aktywności katalazy, wzmożeniu ekspresji ulegały także enzymy takie jak dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza, transferaza glutationowa i peroksydaza glutationowa, co prowadziło do enzymatycznej detoksykacji oksydacyjnej komórek grzybowych [62]. Podobnych obserwacji dokonano w przypadku szczepów *Candida* spp. wykazujących oporność na amfoterycynę B, gdzie zauważono zwiększoną aktywność katalazy [70].

Zdolność dermatofitów do zwiększonej sekrecji egzoenzymów można powiązać z patogennością tych grzybów i ich reakcją na stres komórkowy, a tym samem z mechanizmami detoksykacji. Brasch i wsp. [5] zaobserwowali *in vitro*, że w zależności od składu pożywki, na której wzrastał *T. rubrum,* zmieniał się również zakres wydzielanych przez dermatofit enzymów, m.in. esteraz. Ponadto, profil elektroforetyczny esteraz wydzielanych przez *T. rubrum* podlegał rekonfiguracji i wykazywał pojawienie się nowych izoform w zależności od tego, czy do jego środowiska była dodana gryzeofulwina czy też tiokonazol w stężeniach zbliżonych do hamujących [21]. Te dodatkowe formy esteraz mogą bezpośrednio uczestniczyć w detoksykacji lub mogą obejmować niespecyficzną odpowiedź komórkową na stres prowadzącą do tolerancji na lek. Udział esteraz w detoksykacji prowadzącej do oporności na leki został już opisany u innych mikroorganizmów, np. u bakterii [40, 77]. Nadekspresję genów kodujących niektóre grupy enzymów, stwierdzono również u kilku szczepów dermatofitów wykazujących oporność na leki z grupy azoli, co można uznać za mechanizm kompensacyjny w momencie zahamowania syntezy ergosterolu. W przypadku *Candida albicans* nadekspresja genu *erg11* następuje poprzez duplikację lewego ramienia chromosomu 5 [15, 79]. *Cryptococcus neoformans* natomiast dostosowuje się do wysokich stężeń flukonazolu przez tworzenie disomii chromosomu 1 w wyniku czego dochodzi do podwojenia dwóch genów: *erg11*, którego produkt jest celem dla flukonazolu oraz gen *afr1*, którego produkt jest uznawany za transporter dla substancji o charakterze azoli [88]. Podobnie u szczepów *Aspergillus fumigatus* opornych na terbinafinę występują dodatkowe kopie genu epoksydazy skwalenowej [56]. Sugerowane jest ponadto, że dodatkowe kopie genu 1-monooksygenazy salicylanowej (*salA*) są przyczyną oporności na terbinafinę u *Aspergillus nidulans* [56]. Na tej podstawie postawiono hipotezę, że rozszczepienie pierścienia naftalenowego obecnego w strukturze terbinafiny jest przyczyną jej inaktywacji [37]. Santos i wsp. [81] opisali szczep *T. rubrum* oporny na terbinafinę, który uzyskali poprzez wprowadzenie do genomu tego dermatofitu wielu kopi genu *salA*. Szczep ten wykazywał podwyższoną ekspresję genu *salA* i jednocześnie zwiększoną oporność na terbinafinę w porównaniu ze szczepem dzikim, a zatem udało się wykazać, że gen ten odgrywa rolę w oporności i odpowiedzi na terbinafinę u dermatofitów. Interesujące jest, że ten sam mutant oporny na terbinafinę, po kilku pasażach na pożywce bez terbinafiny tracił cechę oporności na ten lek. Co więcej, szczep dziki *T. rubrum* reagował na ekspozycję na terbinafinę zwiększeniem ekspresji genu *salA* [81]. Na podstawie uzyskanych wyników zespół Hemelin Santos wysnuł hipotezę, że dodatkowe kopie tego genu mogą wywoływać oporność na leki przeciwgrzybicze.

W przeciwieństwie do bakterii, u których mechanizmy oporności na antybiotyki poprzez degradację tych związków są dość dobrze poznanym zagadnieniem, tak w przypadku grzybów i ich oporności na środki przeciwgrzybicze poprzez inaktywację lub degradację mechanizmy te wymagają dalszych szczegółowych badań [60]. Biorąc pod uwagę, że grzyby wydzielają dużą liczbę enzymów [33], prawdopodobne jest, że podobne mechanizmy powodujące oporność lub tolerancję na leki przeciwgrzybicze mogą być częste. Ujawnienie enzymów grzybowych pełniących tę rolę może być zatem przydatne do opracowania ich inhibitorów, które można zastosować samodzielnie lub w połączeniu z konwencjonalną terapią.

6. Transkrypcyjna modulacja genów szlaków sygnałowych

Profilowanie ekspresji genów w całym genomie stało się jednym ze standardów w opracowywaniu nowych leków przez przemysł farmaceutyczny i zwiększyło ogólne zrozumienie dotyczące mechanizmów działania różnych substancji i ich efektów terapeutycznych.

Liczne badania wykazały istnienie różnych szlaków regulacyjnych i metabolicznych niezbędnych do rozwoju oporności na leki przeciwgrzybicze [80]. Biorąc pod uwagę naturę komórkowych systemów reakcji na stres i to, że niektóre białka komórkowe powiązane z tymi mechanizmami są fosforylowane, kinazy białkowe mogą stanowić potencjalny cel terapii przeciwgrzybiczej [30]. Wiadomo, że fosforylacja białek wyzwala kilka szlaków transdukcji sygnałów zaangażowanych w przekazywanie bodźców komórkowych, dlatego też wielu badaczy próbowało określić wpływ różnych substancji przeciwgrzybiczych na komórki grzybów poprzez zbadanie ekspresji różnego typu kinaz, jako potencjalnego mechanizmu oporności.

Dzięki zastosowaniu techniki hybrydyzacji udało się ustalić, że u szczepu *T. rubrum* eksponowanego na działanie ketokonazolu i amfoterycyny B dochodziło do obniżenie ekspresji czterech genów kinaz, z których dwa były to geny kodujące kinazy MAP (MpkA i STE7), należące do dwóch oddzielnych szlaków odpowiedzi na stres komórkowy [96]. Doniesienia naukowe wskazują również obniżoną ekspresję, w odpowiedzi na amfoterycynę B, genu kinazy serynowo/treoninowej (*sps1*) [28, 92, 96]. Natomiast *T. rubrum* hodowany *in vitro* w obecności terbinafiny wykazywał zwiększenie ekspresji genu *sps1* przy jednoczesnym obniżeniu ekspresji dwóch fosforylowanych elementów genetycznych biorących udział w regulacji kaskady kinaz MAP [96, 97]. Ponadto, analiza transkrypcji genów *T. rubrum* w odpowiedzi na związki PHS11A i PH11B, będące inhibitorami syntezy kwasów tłuszczowych, wykazała znaczący spadek ekspresji aż czterech genów kinaz: *pkaC*, *ssp1* i *sln1*, które są związane ze szlakami przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego oraz kinazy dihydroksyacetonowej (produkt genu *dak2*), związanej z transportem i metabolizmem węglowodanów, a tylko jeden gen związany z kinazami – *bck1* ulegał wzmożonej ekspresji w tych warunkach [97]. Dodatkowo, związek PH11B wzmagał ekspresję genu kinazy zależnej od pirofosforanu – fosfofrukto-1-kinazy (*pfk1*) i gen heksokinazy (*glk1*), które są związane z transportem węglowodanów [95]. Z kolei regulacja genu *mpkA* kinazy MAP po ekspozycji na amfoterycynę B polegała na zmniejszeniu ekspresji, a przy ekspozycji na itrakonazol na jej zwiększeniu [19]. Inny mechanizm odpowiedzi na obecność w środowisku amfoterycyny B, która łączy się z ergosterolem a w konsekwencji zaburza strukturę błony plazmatycznej grzyba, polegał na aktywacji szlaku integralności ściany komórkowej i rekompensatę utraty ciągłości okrywy komórkowej [19, 96].

Zastosowanie techniki supresyjnej hybrydyzacji odejmującej (SSH) pozwoliło wykazać zwiększony poziom ekspresji genu kinazy NIMA (*nima1*) po ekspozycji *T. rubrum* na flukonazol, gryzeofulwinę i terbinafinę. Natomiast stosowanie acyklowiru, terbinafiny i kwasu undecylenowego pozostawało bez wpływu na poziom ekspresji genu *nima1* [68]. Ponadto, gen ten ulegał zwiększonej ekspresji w niskim pH i obecności keratyny jako jedynego źródła węgla [68, 71]. Rodzina kinaz NIMA pełni kluczową rolę w cyklu komórkowym, a w szczególności na etapie przejścia komórki z fazy G2 do M. Doniesienia naukowe podają, że geny związane z kinazą NIMA (zwłaszcza *nek11L* i *nek11S*) związane są z replikacją DNA oraz odpowiedzią na stres komórkowy wywołany przez uszkodzenie komórki lub inne niespecyficzne czynnikami chemiczne [66, 68, 71]. Innych wniosków dostarczyły doświadczenia z wykorzystaniem techniki hybrydyzacji northern (northern blot). W jednym z badań, w którym *T. rubrum* hodowany był w środowisku z obecnością akryflawiny, za pomocą tej techniki wykazano zwiększenie poziomu transkrypcji genu kodującego kinazę ryboflawiny [84]. Enzym ten jest niezbędnym elementem w szlaku biosyntezy flawiny, kluczowego związku dla szeregu procesów biologicznych, w tym metabolizmu lipidów, białek i węglowodanów [82, 84].

Z kolei zastosowanie sekwencjonowania RNA, pozwoliło ocenić poziom ekspresji genów kodujących szlak kinaz u *T. rubrum* w kolejnych odstępach czasu po ekspozycji na leki przeciwgrzybicze. Udowodnione zostało, że trzy godziny po ekspozycji na akryflawinę poziom ekspresji kinazy fosfosiarczanu adenozyny i kinazy homoserynowej wzrastał, natomiast kinazy białkowej oraz kinazy pirydoksynowej obniżał się. Wydłużenie czasu ekspozycji na akryflawinę do 12 godzin powodowało wzrost ekspresji genu kinazy białkowej *cmgc/srpk*, a po 24 godzinach ekspozycji jedynie poziom ekspresji genów kodujących szlak sygnałowy zależny od wapnia/kalmoduliny wzrastał [73]. Persinoti i wsp. [73] na podstawie tych wyników badań sugerują, że akryflawina, prawdopodobnie w znaczący sposób, wpływa na poziomy ekspresji genów tego ostatniego szlaku sygnałowego u *T. rubrum*. Z kolei Huang i wsp. [45] wykazali, że po 24 godzinach ekspozycji na akryflawinę wyraźnie obniżył się poziom ekspresji genów kodujących atypową kinazę białkową ABC1, odpowiedzialną za regulację syntezę chinonu w komórkach *T. rubrum*. Innych wniosków dostarczają analizy zastosowania kwasu undecylenowego na *T. rubrum*. Stwierdzono, że subletalne dawki tej substancji powodowały wzrost poziomu ekspresji genów kinazy białkowej urydyna/cytydyna (produkt genu *uck*), kinazy białkowej STE7 (produkt genu *ste7*) oraz kinazy defosfo-CoA (produkt genu *dpck*) niezależnie od czasu ekspozycji [62, 91]. Ponadto, kwas undecylenowy powodował obniżenie poziomu ekspresji genu nukleozydowej kinazy difosforanowej już po 3 godzinach ekspozycji, a wydłużenie tego czasu do 12 godzin skutkowało obniżeniem poziomu ekspresji genów kodujących dwie odrębne kinazy serynowo/treoninowe: kinazę difosforanów

nukleozydów oraz kinazę białkową AGC/RSK [58, 62]. Interesujące jest, że 12-godzinna ekspozycja na kwas undecylenowy powodowała całkowite zahamowanie genów kodujących kinazę białkową AGC/RSK zależną od cAMP, kinazę białkową 1 (PKA) zależną od cGMP, kinazę białkową PKG i kinazę białkową C [69, 73]. Ostatnia z wymienionych kinaz odgrywa ważną rolę w syntezie białek [69]. Wyniki te wydają się być wyraźnie odmienne od siebie, wskazują jednak na zasadniczy udział zmian poziomów ekspresji genów kinaz i szlaków sygnałowych w odpowiedzi na obecność substancji leczniczej w środowisku wzrostu dermatofitu. Prawdopodobnie omawiane mechanizmy nie są uniwersalne dla wszystkich leków przeciwgrzybiczych i wymagają dalszych szczegółowych badań naukowych.

7. Rola białek szoku cieplnego w lekooporności

Białka szoku cieplnego (Hsp) stanowią grupę białek opiekuńczych obecnych we wszystkich badanych do tej pory organizmach [34, 90]. Uczestniczą w różnych procesach komórkowych, m.in. w transkrypcji, translacji, modyfikacjach potranslacyjnych, składaniu białek, czy też ich grupowaniu i rozgrupowywaniu [90]. Gwałtowana zmiana temperatury czy pH, albo ekspozycja komórki na niektóre substancje chemiczne może być czynnikiem, który powoduje indukcję białek szoku cieplnego i wyzwolenie odpowiedzi na stres jakim zaczyna być poddawana komórka [87, 90]. Białka te, w zależności od ich funkcji i masy cząsteczkowej można przypisać do jednej z szczęściu rodzin: Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100 i małe Hsp; u grzybów dominującymi białkami opiekuńczymi są Hsp20–40, Hsp70 i Hsp90 [90]. Zazwyczaj geny *hsp* są aktywowane przez czynnik transkrypcji szoku cieplnego (HSF) [54, 90]. To białko w warunkach stresowych jest fosforylowane i trimeryzowane, wiąże się z regionami promotorowymi genów *hsp* i indukuje ich transkrypcję [1]. Zależność między ekspresją genów *hsp* a stresem wywołanym przez leki przeciwgrzybicze udało się wykazać zarówno u drożdży jak i grzybów strzępkowych [90]. W przypadku dermatofitów ekspozycja na subletalne dawki różnych leków przeciwgrzybiczych powoduje modulację kilku genów *hsp*; w odpowiedzi na terbinafinę, acyklowir i związek PHS11A dochodzi do wzmożonej ekspresji genów kodujących białka należące głównie do rodziny Hsp70 a w przypadku odpowiedzi na itrakonazol i amfoterycynę B – do rodziny małych Hsp [47, 59]. Białka Hsp70 występują w postaci monomerów i współpracują z rodziną ko-chaperonów Hsp40, podczas gdy małe Hsp tworzą kompleksy oligomeryczne, które wiążą się z denaturowanymi białkami [83].

W odpowiedzi na terbinafinę i acyklowir u *T. rubrum* dochodzi do wzmożonej ekspresji genu kodującego Hsp90, czynnika transkrypcyjnego Hsf1 oraz czynnika regulującego funkcję Hsp90 i biorącego udział w dojrzewaniu kinaz – Cdc37 [47, 83]. W przypadku *T. interdigitale* oraz *T. rubrum*, które były poddawane zmianom temperatury dochodziło do zwiększonej ekspresji czynników transkrypcyjnych Hsf1 oraz PacC [47]. U szczepu *T. interdigitale* z nieaktywnym genem PacC, transkrypcja genu *hsf1* była zdecydowanie różna w porównaniu z innymi genami *hsp* [58]. Martinez-Rossi i wsp. [59] wysnuli na tej podstawie wniosek, że występuje powiązanie między PacC i białkiem Hsf1 a poziomem białek Hsp, co pośrednio moduluje odpowiedź komórki grzyba na stres związany z obecności substancji leczniczej w środowisku. Natomiast w przypadku *T. rubrum* narażonego na działanie kwasu undecylenowego, nie wykazano, aby doszło do wzmożonej ekspresji genów białek Hsp. Przypuszczalnie, istnieją inne strategie radzenia sobie z czynnikiem szkodliwym, którymi mogą być m. in. aktywacja szlaków związanych z metabolizmem lipidów czy elementów związanych ze stresem oksydacyjnym oraz alternatywnego modelu składania genów (w oryginale splicing) [62].

Białko Hsp90, jedno z najbardziej konserwatywnych białek z rodziny Hsp, jest funkcjonalnie powiązane z szeroką gamą innych białek w komórce, a jego działanie polega na kontrolowaniu składania białek do aktywnych konformacji [54]. U drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, Hsp90 oddziałuje z około 10% wszystkich białek [55]. Białko Hsp90 tworzy złożoną sieć z kalcyneuryną i innymi białkami komórkowymi, które koordynują kompensacyjne mechanizmy naprawcze, pełniąc decydującą rolę w wielu procesów wewnątrzkomórkowych, w tym w zmianach morfogenetycznych, adaptacji do stresu i oporności na substancje przeciwgrzybicze [14, 87]. U *C. albicans* i *S. cerevisiae*, białko Hsp90 może być odpowiedzialne za oporność na związki azolowe oraz przypuszcza się, że w sposób pośredni wpływa na wykształcenie oporności na echinokandyny [14, 87]. Mechanizm tego zjawiska polega na aktywacji fosfatazy kalcyneuryny przez Hsp90 w warunkach stresowych [13, 87]. Niemniej jednak lokalizacja komórkowa białka Hsp90 jest inna u różnych grup i gatunków grzybów chorobotwórczych, a tym samym funkcje jakie przyjmuje wobec czynników szkodliwych są odmienne. U *Cryptococcus neoformans* białko Hsp90 zlokalizowane jest głównie na powierzchni komórki, co przekłada się na naturalną oporność na inhibitory ściany komórkowej [10], natomiast w przypadku *A. fumigatus* występuje ono głównie w cytozolu, a dopiero w momencie działania substancji leczniczych, które doprowadzają do uszkodzenia ściany komórkowej, zaczyna gromadzić się w obszarach przegród strzępek i samej ścianie komórkowej [53].

Pomimo stosunkowo dobrze poznanych mechanizmów dotyczących roli białka Hsp90 w odpowiedzi

na substancje przeciwgrzybicze u grzybów drożdżopodobnych i niektórych pleśni, niewiele wiadomo na temat interakcji wewnątrzkomórkowych i biologicznej roli tych białek u dermatofitów. Zahamowanie *in vitro* funkcjonowania białka Hsp90 u *T. rubrum* powodowało zwiększoną wrażliwość na mykafunginę i itrakonazol, poprawiając skuteczność tych środków w terapii przeciwgrzybiczej [27, 58]. Dodatkowo, hamowanie aktywności białka Hsp90 upośledzało wzrost *in vitro* grzybów hodowanych na pożywce z fragmentami ludzkich paznokci i modulowało ekspresję innych genów *hsp*, a także genu *pacC* [4, 27]. Czynnik transkrypcyjny PacC zaangażowany jest w patogenność dermatofitów, co sugeruje, że białko Hsp90 odgrywa istotną rolę zarówno w patogenności, jak i podatności na leki u *T. rubrum* [4, 27, 47]. Zaobserwowany związek między hamowaniem aktywności białka Hsp90 a zwiększoną podatnością na niektóre środki przeciwgrzybicze u *T. rubrum* sprawia, że to białko opiekuńcze może zostać wykorzystane jako nowy cel terapii, a hamowanie jego aktywności jako potencjalna strategia leczenia dermatofitoz [47]. Dotychczas wykazano, że inhibitory i przeciwciała anty-Hsp90, takie jak radicikol, geldanamycyna i analogi tego związku, wiążą się z regionem N-końcowym białka Hsp90 w miejscu wiązania ATP i prowadzą do jego inaktywacji [36, 46].

8. Mutacje w genach docelowych enzymów wpływające na lekooporność

Opisanych jest wiele przykładów związanych z mutacjami w genach kodujących enzymy związane z syntezą ergosterolu i elementów ściany komórkowej, które spowodowały wystąpienie oporności na środki przeciwgrzybicze związane z tymi elementami. Azole hamują aktywność 14-α demetylazy lanosterolu przez wiązanie azotu w pierścieniu azolowym z atomem żelaza grupy hemowej białka [98]. Mutacje w genie *erg11*, który koduje 14-α demetylazę lanosterolu, często stwierdza się w izolatach klinicznych *C. albicans* wykazujących oporność na azole. Mutacje te nie wpływają na funkcję enzymu i często towarzyszy im utrata heterozygotyczności, co jeszcze zwiększa oporność na te leki przeciwgrzybicze [85]. Ponadto, mutacje w genie *erg11* mają różny wpływ na zmiany powinowactwa leków azolowych do elementów docelowych [64]. Niektóre mutacje osłabiają bądź zrywają wiązanie wodorowe między lekiem a docelowym białkiem, zmniejszając tym samym powinowactwo leków triazolowych o krótkich „ogonach" (np. worikonazol, flukonazol), ale już nie tych o długich „ogonach" [78]. Można więc stwierdzić, że w zależności od typu mutacji, oporność może wystąpić na wszystkie leki azolowe, albo tylko na pojedynczych przedstawicieli tej grupy [58, 85].

Ważnym enzymem docelowym leków przeciwgrzybiczych jest epoksydaza skwalenowa, która uczestniczy w szlaku biosyntezy ergosterolu poprzez katalizowanie epoksydacji skwalenu do 2–3-oksoskwalenu [58]. Terbinafina, która jest aktualnie najpopularniejszym lekiem stosowanym przy leczeniu dermatofitoz, hamuje aktywność epoksydazy skwalenowej, prowadząc do wyczerpania ergosterolu i akumulacji skwalenu [25]. Mutacje w genie kodującym epoksydazę skwalenową prowadzą do zmian strukturalnych w strukturze enzymu i zmniejszenia wiązania terbinafiny z białkiem bez powodowania zaburzeń w biosyntezie ergosterolu [60]. Dotychczas opisano kilka izolatów klinicznych *T. rubrum* opornych na terbinafinę, a tylko dwa z nich wykazały mutacje związane z tym genem [60]. Warty zauważenia jest fakt, że oba izolaty były oporne na wszystkie badane inhibitory epoksydazy skwalenowej, a molekularnie wykazano, że mutacje w genie znajdowały się w tym samym regionie, w którym zidentyfikowano je u szczepów *S. cerevisiae* opornych na terbinafinę [58, 60]. Ponadto, wykazano, że ekspresja genu epoksydazy skwalenowej niosącej mutacje, objawiające się podstawieniami pojedynczych aminokwasów w białku, u *C. albicans* zmniejszała podatność na inhibitory tego enzymu [58]. Podobnie, pojedyncze mutacje punktowe zmieniające sekwencje aminokwasów w białku u *A. nidulans* i *A. fumigatus* były związane z opornością na terbinafinę u tych szczepów [67, 76].

W badaniu, w którym oceniono 2056 izolatów *T. rubrum* i *T. interdigitale* pod kątem oporności na terbinafinę, stwierdzono, że tylko 17 z nich, mniej niż 1%, było opornych na ten lek [93]. Po analizie sekwencji genu epoksydazy skwalenowej wykryte zostały punktowe mutacje w czterech *loci*, które prawdopodobnie mogły być odpowiedzialne za oporność [93]. Ten sam układ mutacji wprowadzony doświadczalnie do dermatofitu modelowego *Arthoderma vanbreuseghemii,* objawił się powstaniem szczepów mniej podatnych na terbinafinę [93]. Co więcej, analiza poziomu ekspresji genów nie ujawniła żadnych innych istotnych różnic między mutantami a szczepami dzikimi, co wskazuje, że zwiększona odporność na tę substancję spowodowana była tymi czterema mutacjami [93].

Rosnąca oporność na azole u niektórych gatunków grzybów z rodzaju *Candida* sprawiła, że echinokandyny stały się terapią pierwszego rzutu w przypadkach inwazyjnej kandydozy. Ta klasa leków hamuje podjednostkę fks syntazy glukanu [89]. U szczepów *C. glabrata*, które wykazywały oporność na terbinafinę, zidentyfikowane zostały mutacje znajdujące się w genach kodujących podjednostki fks1 i fks2 enzymu, podczas gdy u innych gatunków rodzaju *Candida* mutacje wykazywano tylko w genie podjednostki fks1 [43]. Ten mechanizm opisano również u opornych na echinokandyny szczepów *A. fumigatus* [58]. Ponadto, zmniejszona wrażliwość

na te leki gatunków klasyfikowanych w kompleksach *C. parapsilosis* i *C. guilliermondii* wiąże się z występowaniem polimorfizmu podjednostki fks1, chociaż znaczenie kliniczne tego zjawiska nie jest pewne, ponieważ grzyby te są często skutecznie leczone echinokandynami [43, 89]. Poza konsekwencjami mutacji w genie kodującym podjednostkę fks1 syntazy glukanu, które skutkują występowaniem oporności na echinokandynę, nie są znane skutki jakie niosą mutacje w podjednostkach fks2 i fks3 [89]. Chociaż oporność na echinokandyny u *S. cerevisiae* wynika z mutacji w genie kodującym podjednostkę fks2, to eksperymentalna delecja zarówno genu *fks2*, jak i *fks3* u tego gatunku spowodowała lepszy wzrost *in vitro* w wyniku ekspozycji na kaspofunginy [89]. Wykazano również, że podjednostki fks2 i fks3 u *C. albicans* działają jako regulatory dla podjednostki fks1 syntazy glukanu [89]. Badania przeprowadzone w ostatnich latach wykazały również, że anidulafungina ma silne działanie przeciwko dermatofitom *in vitro*, ale jej znaczenie w użytku klinicznym nie zostało jeszcze ustalone [3, 18]. Brak badań skuteczności echinokandyn *in vivo* ogranicza zatem ich zastosowanie w leczeniu dermatofitoz, co może leżeć u podstaw braku opisanych dotychczas opornych na te leki szczepów dermatofitów.

9. Elementy strukturalne komórki wpływające na lekooporność

Oprócz mechanizmów obejmujących stres i modyfikację miejsca działania dla substancji przeciwgrzybiczej także inne czynniki, takie jak struktura komórki grzyba czy organizacja komórkowa, mogą wpływać na oporność i tolerancję na lek [24]. Przykładem takiej formy strukturalnej odpowiedzialnej za oporność jest zdolność do wytwarzania biofilmu. Struktury te składają się ze złożonych, powiązanych między sobą i mających kontakt ze środowiskiem populacji komórek, osadzonych w macierzy zewnątrzkomórkowej. Obecnie biofilmy uważane są za najbardziej rozpowszechnione formy wzrostu drobnoustrojów [75]. Biofilmy odpowiedzialne są za zakażenia szerokim spektrum drobnoustrojów prokariotycznych i eukariotycznych u ludzi i zwierząt, często związanych ze zwiększoną trudnością w leczeniu przeciwgrzybiczym. Czynniki, które przyczyniają się do wysokiej nieprzepuszczalności biofilmu dla wielu substancji leczniczych, wynikają przede wszystkim z jego złożonej struktury, obecności macierzy pozakomórkowej, heterogenności metabolicznej populacji zasiedlających i zwiększonego poziomu ekspresji genów związanych z pompami wypływowymi u organizmów, które go tworzą [75]. Macierz, która otacza populację drobnoustrojów zasiedlających biofilm działa jako bariera fizyczna, chroniąc te drobnoustroje przed lekami i odpowiedzią immunologiczną gospodarza oraz tworząc subpopulację zdolną tolerować wyższe stężenia leków [24, 75]. Ze względu na powiązanie oporności lekowej z dermatofitozami, sugerowane jest, że biofilmy mogą działać jako źródła trwałej infekcji i oporności przeciwgrzybiczej np. w onychomykozach [7, 39]. Wykazano także zdolność dermatofitów to tworzenia biofilmów w modelu z wykorzystaniem pożywki z ludzkimi paznokciami jako źródłem substancji odżywczych [6].

Artrokonidia, które powstają w wyniku fragmentacji strzępek i są głównym elementem transmisyjnym dermatofitów, uważane są za jeden z kluczowych elementów strukturalnych wpływających na oporność grzybów tej grupy [38]. Wynika to z faktu, że zarodniki te wykazują znacznie większą oporność na leki przeciwgrzybicze niż mikro- i makrokonidia, czy też same strzępki [2, 11]. Przekłada się to na sposób określania lekooporności u dermatofitów, gdzie w badaniu stężeń hamujących wzrost (MIC) z wykorzystaniem standardu opisanego przez CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) bądź EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) należy użyć spłukanej z powierzchni kultury dermatofitu zawiesiny konidów, a nie mycelium.

10. Podsumowanie

Dermatofity stanowią jedną z najczęstszych przyczyn infekcji grzybiczych na świecie, pomimo tego badania nad wprowadzaniem nowych standardów leczenia są opóźnione w porównaniu z innymi grupami grzybów, zwłaszcza wywołującymi zakażenia układowe. Co więcej, narastająca oporność na leki przeciwgrzybicze u dermatofitów w znaczny sposób wyprzedza badania nad nowymi celami terapii. W tym artykule zostały omówione najważniejsze molekularne mechanizmy powstawania oporności lekowej u dermatofitów, tj. mechanizmy wypływu leków z komórki, ich detoksyfikacji, transkrypcyjnej modulacji genów szlaków sygnałowych i powstawania mutacji w genach enzymów docelowych dla substancji przeciwgrzybiczych. Dodatkowo, scharakteryzowana została reakcja dermatofitów na stres komórkowy wywołany działaniem leku przeciwgrzybiczego, rola białek szoku cieplnego i elementów strukturalnych komórki na powstawanie oporności i tolerancji na leki.

Ponadto, należy mieć również na uwadze, że substancje przeciwgrzybicze stosowane przeciwko dermatofitom muszą przede wszystkim z łatwością przenikać do skeratynizowanych struktur powierzchniowych i utrzymywać się w nich wystarczająco długo, aby osiągnąć efekt terapeutyczny. Niestety, aktualny arsenał środków leczniczych odznacza się słabą zdolnością do penetracji takich struktur, co może pośrednio przekładać się na lekotolerancję i lekooporność u dermatofitów,

w wyniku eksponowania ich na subletalne stężenia leków. Brakuje również badań na temat korelacji między stężeniami hamującymi wzrost określanymi w badaniu *in vitro*, a realną wartością uzyskiwaną *in vivo* podcz terapii. Dane naukowe bądź z badań pojedynczych przypadków, nawet dotyczące samych dermatofitów, nie oferują wiele klinicystom w zakresie schematów skutecznego leczenia pacjentów, ponieważ kliniczne wartości stężeń terapeutycznych leków dla dermatofitów nie zostały jak dotąd opisane. Podczas gdy dostępne schematy leczenia przeciwgrzybiczego, tj. stosowanie różnych klas leków, bądź preparatów działających miejscowo i ogólnoustrojowo lub kombinacji tych metod są często przepisywane w przypadku dermatofitoz, praktyka ta nie ma poparcia w badaniach klinicznych [38]. Co najważniejsze, nie prowadzone są badania wśród pacjentów, u których terapia przeciwgrzybicza nie powiodła się, natomiast większość danych pochodzi z badań laboratoryjnych, prowadzonych na dermatofitach hodowanych w kontrolowanych warunkach. Kolejnym ważnym aspektem wpływającym na lekooporność dermatofitów jest fakt, że dermatomykozy są często leczone samodzielnie, bez konsultacji z lekarzem, a dopiero wówczas gdy brak jest efektów, pacjent decyduje się zasięgnąć porady specjalisty.

Piśmiennictwo

1. Akerfelt M., Morimoto R.I., Sistonen L.: Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 545–555 (2010)
2. Arrese J.E., Pierard-Franchimont C., Pierard G.E.: A plea to bridge the gap between antifungals and the management of onychomycosis. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2**, 281–284 (2001)
3. Badali H., Mohammadi R., Mashedi O., de Hoog G.S., Meis J.F.: In vitro susceptibility patterns of clinically important *Trichophyton* and *Epidermophyton* species against nine antifungal drugs. *Mycoses,* **58**, 303–307 (2015)
4. Bignell E., Negrete-Urtasun S., Calcagno A.M., Haynes K., Arst H.N.J., Rogers T.: The *Aspergillus* pH-responsive transcription factor PacC regulates virulence. *Mol. Microbiol.* **55**, 1072–1084 (2005)
5. Brasch J., Martins B.S., Christophers E.: Enzyme release by *Trichophyton rubrum* depends on nutritional conditions. *Mycoses,* **34**, 365–368 (1991)
6. Brilhante R.S.N., Rocha M.F.G. i wsp.: Quantitative and structural analyses of the in vitro and ex vivo biofilm-forming ability of dermatophytes. *J. Med. Microbiol.* **66**, 1045–1052 (2017)
7. Burkhart C.N., Burkhart C.G., Gupta A.K.: Dermatophytoma: Recalcitrance to treatment because of existence of fungal biofilm. *J. Am. Acad. Dermatol.* **47**, 629–631 (2002)
8. Burmester A., Shelest E., Glöckner G., Heddergott C., Schindler S., Staib P., Heidel A., Felder M., Petzold A., Szafranski K., Feuermann M., Pedruzzi I., Priebe S., Groth M., Winkler R., i wsp.: Comparative and functional genomics provide insights into the pathogenicity of dermatophytic fungi. *Genome Biol.* **12**, R7 (2011)
9. Cervelatti E.P., Fachin A.L., Ferreira-Nozawa M.S., Martinez-Rossi N.M.: Molecular cloning and characterization of a novel ABC transporter gene in the human pathogen *Trichophyton rubrum*. *Med. Mycol.* **44**, 141–147 (2006)
10. Chatterjee S., Tatu U.: Heat shock protein 90 localizes to the surface and augments virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, e0005836 (2017)
11. Coelho L.M., Aquino-Ferreira R., Maffei C.M.L., Martinez-Rossi N.M.: In vitro antifungal drug susceptibilities of dermatophytes microconidia and arthroconidia. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**, 758–761 (2008)
12. Coleman J.J., Mylonakis E.: Efflux in fungi: la piece de resistance. *PLoS Pathog.* **5**, e1000486 (2009)
13. Cowen L.E.: The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 187–198 (2008)
14. Cowen L.E.: Hsp90 Orchestrates Stress Response Signaling Governing Fungal Drug Resistance. *PLOS Pathog.* **5**, e1000471 (2009)
15. Cowen L.E., Sanglard D., Howard S.J., Rogers P.D., Perlin D.S.: Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **5**, a019752–a019752 (2014)
16. Decottignies A., Goffeau A.: Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nat. Genet.* **15**, 137–145 (1997)
17. Delarze E., Sanglard D.: Defining the frontiers between antifungal resistance, tolerance and the concept of persistence. *Drug Resist. Updat.* **23**, 12–19 (2015)
18. Deng S., Ansari S., Ilkit M., Rafati H., Hedayati M.T., Taghizadeh-Armaki M., Nasrollahi-Omran A., Tolooe A., Zhan P., Liao W., van der Lee H.A., Verweij P.E., Seyedmousavi S.: *In vitro* antifungal susceptibility profiles of 12 antifungal drugs against 55 *Trichophyton schoenleinii* isolates from *tinea capitis favosa* patients in Iran, Turkey, and China. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, (2017)
19. Diao Y., Zhao R., Deng X., Leng W., Peng J., Jin Q.: Transcriptional profiles of *Trichophyton rubrum* in response to itraconazole. *Med. Mycol.* **47**, 237–247 (2009)
20. El-Awady R., Saleh E., Hashim A., Soliman N., Dallah A., Elrasheed A., Elakraa G.: The role of eukaryotic and prokaryotic abc transporter family in failure of chemotherapy. *Front. Pharmacol.* **7**, 535 (2016)
21. Fachin A.L., Contel E.P., Martinez-Rossi N.M.: Effect of sub-MICs of antimycotics on expression of intracellular esterase of *Trichophyton rubrum*. *Med. Mycol.* **39**, 129–133 (2001)
22. Fachin A.L., Maffei C.M., Martinez-Rossi N.M.: In vitro susceptibility of Trichophyton rubrum isolates to griseofulvin and tioconazole. Induction and isolation of a resistant mutant to both antimycotic drugs. Mutant of *Trichophyton rubrum* resistant to griseofulvin and tioconazole. *Mycopathologia,* **135**, 141–143 (1996)
23. Fachin A., Ferreira-Nozawa M., Maccheroni W., Martinez-Rossi N.: Role of the ABC transporter TRUMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in *Trichophyton rubrum*. *J. Med. Microbiol.* **55**, 1093–1099 (2006)
24. Fanning S., Mitchell A.P.: Fungal biofilms. *PLoS Pathog.* **8**, e1002585 (2012)
25. Favre B., Ryder N.S.: Characterization of squalene epoxidase activity from the dermatophyte *Trichophyton rubrum* and its inhibition by terbinafine and other antimycotic agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 443–447 (1996)
26. Feng G., Leem Y.E., Levin H.L.: Transposon integration enhances expression of stress response genes. *Nucleic Acids Res.* **41**, 775–789 (2013)
27. Ferreira-Nozawa M.S., Silveira H.C.S., Ono C.J., Fachin A.L., Rossi A., Martinez-Rossi N.M.: The pH signaling transcription factor PacC mediates the growth of *Trichophyton rubrum* on human nail *in vitro*. *Med. Mycol.* **44**, 641–645 (2006)

28. Friesen H., Lunz R., Doyle S., Segall J.: Mutation of the SPS1--encoded protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae* leads to defects in transcription and morphology during spore formation. *Genes Dev.* **8**, 2162–2175 (1994)
29. Gadzalski M., Ciesielska A., Staczek P.: Bioinformatic survey of ABC transporters in dermatophytes. *Gene,* **576**, 466–475 (2016)
30. Garaizar J., Brena S., Bikandi J., Rementeria A., Ponton J.: Use of DNA microarray technology and gene expression profiles to investigate the pathogenesis, cell biology, antifungal susceptibility and diagnosis of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* **6**, 987–998 (2006)
31. Ghelardi E., Celandroni F., Gueye S.A., Salvetti S., Senesi S., Bulgheroni A., Mailland F.: Potential of ergosterol synthesis inhibitors to cause resistance or cross-resistance in *Trichophyton rubrum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 2825–2829 (2014)
32. Glavinas H., Krajcsi P., Cserepes J., Sarkadi B.: The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. *Curr. Drug Deliv.* **1**, 27–42 (2004)
33. Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Zięba P.: Phenotypic characterization of enzymatic activity of clinical dermatophyte isolates from animals with and without skin lesions and humans. *J. Appl. Microbiol.* **125**, 700–709 (2018)
34. Gnat S., Nowakiewicz A., Łagowski D., Zięba P.: Host- and pathogen-dependent susceptibility and predisposition to dermatophytosis. *J. Med. Microbiol.* **68**, 823–836 (2019)
35. Gnat S., Nowakiewicz A., Zięba P.: Taxonomy of dermatophytes – the classification systems may change but the identification problems remain the same. *Adv. Microbiol.* **58**, 49–58 (2019)
36. Gong Y., Li T., Yu C., Sun S.: *Candida albicans* heat shock proteins and hsps-associated signaling pathways as potential antifungal targets. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 520 (2017)
37. Graminha M.A.S., Rocha E.M.F., Prade R.A., Martinez--Rossi N.M.: Terbinafine resistance mediated by salicylate 1-monooxygenase in *Aspergillus nidulans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 3530–3535 (2004)
38. Gupta A.K., Kohli Y.: In vitro susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and in vitro evaluation of combination antifungal activity. *Br. J. Dermatol.* **149**, 296–305 (2003)
39. Gupta C., Das S., Ramachandran V.G., Saha R., Bhattacharya S.N., Dar S.A., Atri D.: Possible role of trichophytin antigen in inducing impaired immunological clearance of fungus in onychomycosis. *Mycopathologia,* **181**, 247–251 (2016)
40. Harms N., Ras J., Reijnders W.N., van Spanning R.J., Stouthamer A.H.: S-formylglutathione hydrolase of *Paracoccus denitrificans* is homologous to human esterase D: a universal pathway for formaldehyde detoxification? *J. Bacteriol.* **178**, 6296–6299 (1996)
41. Havlickova B., Czaika V.A., Friedrich M.: Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses,* **51**, 2–15 (2008)
42. Hayes B.M.E., Anderson M.A., Traven A., van der Weerden N.L., Bleackley M.R.: Activation of stress signalling pathways enhances tolerance of fungi to chemical fungicides and antifungal proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 2651–2666 (2014)
43. Healey K.R., Perlin D.S.: Fungal Resistance to Echinocandins and the MDR Phenomenon in *Candida glabrata*. *J. fungi* (*Basel, Switzerland*) **4**, 105 (2018)
44. Holmes A.R., Cardno T.S., Strouse J.J., Ivnitski-Steele I., Keniya M.V, Lackovic K., Monk B.C., Sklar L.A., Cannon R.D.: Targeting efflux pumps to overcome antifungal drug resistance. *Future Med. Chem.* **8**, 1485–1501 (2016)
45. Huang H., Yang M., Su Y., Qu L., Deng X.W.: *Arabidopsis* atypical kinases ABC1K1 and ABC1K3 act oppositely to cope with photodamage under red light. *Mol. Plant* **8**, 1122–1124 (2015)
46. Huang X., Yi J., Yin S., Li M., Ye C., Lai W., Chen J.: *Trichophyton rubrum* conidia modulate the expression and transport of Toll--like receptor 2 in HaCaT cell. *Microb. Pathog.* **83–84**, 1–5 (2015)
47. Jacob T.R., Peres N.T.A., Martins M.P., Lang E.A.S., Sanches P.R., Rossi A., Martinez-Rossi N.M.: Heat shock protein 90 (Hsp90) as a molecular target for the development of novel drugs against the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Front. Microbiol.* **6**, 1241 (2015)
48. Kano R., Hsiao Y.H., Han H.S., Chen C., Hasegawa A., Kamata H.: Resistance mechanism in a terbinafine-resistant strain of *Microsporum canis*. *Mycopathologia,* **183**, 623–627 (2018)
49. Khurana A., Sardana K., Chowdhary A.: Antifungal resistance in dermatophytes: Recent trends and therapeutic implications. *Fungal Genet. Biol.* **132**, 103255 (2019)
50. Kohler J.R., Hube B., Puccia R., Casadevall A., Perfect J.R.: Fungi that infect humans. *Microbiol. Spectr.* **5**, (2017)
51. Łagowski D., Gnat S., Nowakiewicz A., Osińska M., Trościańczyk A., Zięba P.: In search of the source of dermatophytosis: Epidemiological analysis of *Trichophyton verrucosum* infection in llamas and the breeder (case report). *Zoonoses Public Health* **66**, 982–989 (2019)
52. Łagowski D., Gnat S., Nowakiewicz A., Osińska M., Zięba P.: The prevalence of symptomatic dermatophytoses in dogs and cats and the pathomechanism of dermatophyte infections. **58**, 165–176 (2019)
53. Lamoth F., Juvvadi P.R., Fortwendel J.R., Steinbach W.J.: Heat shock protein 90 is required for conidiation and cell wall integrity in Aspergillus fumigatus. *Eukaryot. Cell, Adv. Microbiol.* **11**, 1324–1332 (2012)
54. Leach M.D., Budge S., Walker L., Munro C., Cowen L.E., Brown A.J.P.: Hsp90 orchestrates transcriptional regulation by Hsf1 and cell wall remodelling by MAPK signalling during thermal adaptation in a pathogenic yeast. *PLoS Pathog.* **8**, e1003069 (2012)
55. Leach M.D., Klipp E., Cowen L.E., Brown A.J.P.: Fungal Hsp90: a biological transistor that tunes cellular outputs to thermal inputs. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 693–704 (2012)
56. Liu W., May G.S., Lionakis M.S., Lewis R.E., Kontoyiannis D.P.: Extra copies of the *Aspergillus fumigatus* squalene epoxidase gene confer resistance to terbinafine: genetic approach to studying gene dose-dependent resistance to antifungals in A. fumigatus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 2490–2496 (2004)
57. Martinez-Rossi N.M., Peres N.T.A., Rossi A.: Pathogenesis of dermatophytosis: sensing the host tissue. *Mycopathologia,* **182**, 215–227 (2017)
58. Martinez-Rossi N.M., Bitencourt T.A., Peres N.T.A., Lang E.A.S., Gomes E. V, Quaresemin N.R., Martins M.P., Lopes L., Rossi A.: Dermatophyte resistance to antifungal drugs: mechanisms and prospectus. *Front. Microbiol.* **9**, 1108 (2018)
59. Martinez-Rossi N.M., Jacob T.R., Sanches P.R., Peres N.T.A., Lang E.A.S., Martins M.P., Rossi A.: Heat shock proteins in dermatophytes: current advances and perspectives. *Curr. Genomics* **17**, 99–111 (2016)
60. Martinez-Rossi N.M., Peres N.T.A., Rossi A.: Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. *Mycopathologia,* **166**, 369–383 (2008)
61. Martins M.P., Franceschini A.C.C., Jacob T.R., Rossi A., Martinez--Rossi N.M.: Compensatory expression of multidrug-resistance genes encoding ABC transporters in dermatophytes. *J. Med. Microbiol.* **65**, 605–610 (2016)
62. Mendes N.S., Bitencourt T.A., Sanches P.R., Silva-Rocha R., Martinez-Rossi N.M., Rossi A.: Transcriptome-wide survey of gene expression changes and alternative splicing in *Trichophyton rubrum* in response to undecanoic acid. *Sci. Rep.* **8**, 2520 (2018)
63. Monod M.: Secreted proteases from dermatophytes. *Mycopathologia,* **166**, 285–294 (2008)

64. Morio F., Loge C., Besse B., Hennequin C., Le Pape P.: Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **66**, 373–384 (2010)
65. Nenoff P., Verma S., Vasani R., Burmester A., Hipler U.C., Wittig F., Krüger C., Nenoff K., Wiegand C., Saraswat A., Madhu R., Panda S., Das A., Kura M., Jain A., i wsp.: The current Indian epidemic of superficial dermatophytosis due to *Trichophyton mentagrophytes*-A molecular study. *Mycoses,* (2018)
66. Noguchi K., Fukazawa H., Murakami Y., Uehara Y.: Nek11, a new member of the NIMA family of kinases, involved in DNA replication and genotoxic stress responses. *J. Biol. Chem.* **277**, 39655–39665 (2002)
67. Osborne C.S., Leitner I., Favre B., Ryder N.S.: Amino acid substitution in *Trichophyton rubrum* squalene epoxidase associated with resistance to terbinafine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2840–2844 (2005)
68. Paiao F.G., Segato F., Cursino-Santos J.R., Peres N.T.A., Martinez--Rossi N.M.: Analysis of *Trichophyton rubrum* gene expression in response to cytotoxic drugs. *FEMS Microbiol. Lett.* **271**, 180–186 (2007)
69. Pearce L.R., Komander D., Alessi D.R.: The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 9–22 (2010)
70. Peman J., Canton E., Espinel-Ingroff A.: Antifungal drug resistance mechanisms. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **7**, 453–460 (2009)
71. Peres N.T., Sanches P.R., Falco J.P., Silveira H.C., Paião F.G., Maranhão F.C., Gras D.E., Segato F., Cazzaniga R.A., Mazucato M., Cursino-Santos J.R., Aquino-Ferreira R., Rossi A., Martinez-Rossi N.M.: Transcriptional profiling reveals the expression of novel genes in response to various stimuli in the human dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *BMC Microbiol.* **10**, 39 (2010)
72. Peres N.T. de A., Maranhao F.C.A., Rossi A., Martinez--Rossi N.M.: Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. *An. Bras. Dermatol.* **85**, 657–667 (2010)
73. Persinoti G.F., de Aguiar Peres N.T., Jacob T.R., Rossi A., Vencio R.Z., Martinez-Rossi N.M.: RNA-sequencing analysis of *Trichophyton rubrum* transcriptome in response to sublethal doses of acriflavine. *BMC Genomics,* **15 Suppl 7**, S1 (2014)
74. Putman M., van Veen H.W., Konings W.N.: Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 672–693 (2000)
75. Robbins N., Caplan T., Cowen L.E.: Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* **71**, 753–775 (2017)
76. Rocha E.M.F., Gardiner R.E., Park S., Martinez-Rossi N.M., Perlin D.S.: A Phe389Leu substitution in ergA confers terbinafine resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2533–2536 (2006)
77. Rooker S., Guillemaud T., Berge J., Pasteur N., Raymond M.: Coamplification of esterase A and B genes as a single unit in *Culex pipiens* mosquitoes. *Heredity (Edinb).* **77 (Pt 5)**, 555–561 (1996)
78. Sagatova A.A., Keniya M. V, Wilson R.K., Sabherwal M., Tyndall J.D.A., Monk B.C.: Triazole resistance mediated by mutations of a conserved active site tyrosine in fungal lanosterol 14alpha-demethylase. *Sci. Rep.* **6**, 26213 (2016)
79. Sanglard D.: Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. *Front. Med.* **3**, 11 (2016)
80. Sanglard D., Coste A., Ferrari S.: Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res.* **9**, 1029–1050 (2009)
81. Santos H.L., Lang E.A.S., Segato F., Rossi A., Martinez--Rossi N.M.: Terbinafine resistance conferred by multiple copies of the salicylate 1-monooxygenase gene in *Trichophyton rubrum*. *Med. Mycol.* **56**, 378–381 (2018)
82. Santos M.A., Jimenez A., Revuelta J.L.: Molecular characterization of FMN1, the structural gene for the monofunctional flavokinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**, 28618–28624 (2000)
83. Schopf F.H., Biebl M.M., Buchner J.: The HSP90 chaperone machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 345–360 (2017)
84. Segato F., Nozawa S.R., Rossi A., Martinez-Rossi N.M.: Overexpression of genes coding for proline oxidase, riboflavin kinase, cytochrome c oxidase and an MFS transporter induced by acriflavin in *Trichophyton rubrum*. *Med. Mycol.* **46**, 135–139 (2008)
85. Selmecki A., Forche A., Berman J.: Genomic plasticity of the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell,* **9**, 991–1008 (2010)
86. Sharma M., Prasad R.: The quorum-sensing molecule farnesol is a modulator of drug efflux mediated by ABC multidrug transporters and synergizes with drugs in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 4834–4843 (2011)
87. Singh S.D., Robbins N., Zaas A.K., Schell W.A., Perfect J.R., Cowen L.E.: Hsp90 Governs echinocandin resistance in the pathogenic yeast *Candida albicans* via calcineurin. *PLOS Pathog.* **5**, e1000532 (2009)
88. Sionov E., Lee H., Chang Y.C., Kwon-Chung K.J.: *Cryptococcus neoformans* overcomes stress of azole drugs by formation of disomy in specific multiple chromosomes. *PLoS Pathog.* **6**, e1000848 (2010)
89. Suwunnakorn S., Wakabayashi H., Kordalewska M., Perlin D.S., Rustchenko E.: FKS2 and FKS3 genes of opportunistic human pathogen *Candida albicans* influence echinocandin susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, (2018)
90. Tiwari S., Thakur R., Shankar J.: Role of heat-shock proteins in cellular function and in the biology of fungi. *Biotechnol. Res. Int.* **2015**, 132635 (2015)
91. Wadler C., Cronan J.E.: Dephospho-CoA kinase provides a rapid and sensitive radiochemical assay for coenzyme A and its thioesters. *Anal. Biochem.* **368**, 17–23 (2007)
92. Widmann C., Gibson S., Jarpe M.B., Johnson G.L.: Mitogen--activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* **79**, 143–180 (1999)
93. Yamada T., Maeda M., Alshahni M.M., Tanaka R., Yaguchi T., Bontems O., Salamin K., Fratti M., Monod M.: Terbinafine resistance of *Trichophyton* clinical isolates caused by specific point mutations in the squalene epoxidase gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, (2017)
94. Yibmantasiri P., Bircham P.W., Maass D.R., Bellows D.S., Atkinson P.H.: Networks of genes modulating the pleiotropic drug response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biosyst.* **10**, 128–137 (2014)
95. Yu L., Zhang W., Liu T., Wang X., Peng J., Li S., Jin Q.: Global gene expression of *Trichophyton rubrum* in response to PH11B, a novel fatty acid synthase inhibitor. *J. Appl. Microbiol.* **103**, 2346–2352 (2007)
96. Yu L., Zhang W., Wang L., Yang J., Liu T., Peng J., Leng W., Chen L., Li R., Jin Q.: Transcriptional profiles of the response to ketoconazole and amphotericin B in *Trichophyton rubrum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 144–153 (2007)
97. Zhang W., Yu L., Leng W., Wang X., Wang L., Deng X., Yang J., Liu T., Peng J., Wang J., Li S., Jin Q.: cDNA microarray analysis of the expression profiles of *Trichophyton rubrum* in response to novel synthetic fatty acid synthase inhibitor PHS11A. *Fungal Genet. Biol.* **44**, 1252–1261 (2007)
98. Zonios D.I., Bennett J.E.: Update on azole antifungals. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **29**, 198–210 (2008)

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2020, 59, 2, 167–178
DOI: 10.21307/PM-2020.59.2.013

WPŁYW DROŻDŻY I BAKRERII MLEKOWYCH NA ZAWARTOŚĆ ZWIĄZKÓW LOTNYCH I INNE PARAMETRY ENOLOGICZNE WIN

Anna Stój

Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Wpłynęło w listopadzie 2019 r., zaakceptowano w kwietniu 2020 r.

Streszczenie: W pracy omówiono wpływ drożdży *Saccharomyces cerevisiae* na zawartość związków lotnych, etanolu, glicerolu i kwasowość lotną win oraz znaczenie inokulacji drożdżami nie-*Saccharomyces* i *S. cerevisiae* dla poprawy złożoności aromatycznej i charakterystycznych cech win. Ponadto przedstawiono oddziaływanie sekwencyjnej inokulacji *S. cerevisiae* i bakterii mlekowych z gatunku *Oenococcus oeni* na zawartość związków lotnych, diacetylu, acetoiny, kwasowość lotną, degradację kwasu jabłkowego, zawartość bursztynianu dietylu, mleczanu etylu, amin biogennych oraz podkreślono zaletę jednoczesnej inokulacji, jaką jest skrócenie czasu fermentacji. Zwrócono uwagę na rolę rodzimych szczepów drożdży i bakterii mlekowych w zwiększeniu regionalnego charakteru win. Omówiono także znaczenie enzymów wytwarzanych przez drożdże i bakterie oraz wzrost zainteresowania zdolnością przeprowadzania fermentacji jabłkowo-mlekowej przez gatunki bakterii nie-*O. oeni*, takie jak *Lactobacillus* i *Pediococcus*.

1. Wprowadzenie. 2. Fermentacja alkoholowa i jabłkowo-mlekowa. 3. Wpływ drożdży i bakterii mlekowych na parametry enologiczne win. 3.1. *S. cerevisiae*. 3.2. Nie-*Saccharomyces*. 3.3. Bakterie mlekowe. 4. Podsumowanie

INFLUENCE OF YEAST AND LACTIC ACID BACTERIA ON THE CONTENT OF VOLATILE COMPOUNDS AND OTHER OENOLOGICAL PARAMETERS OF WINES

Abstract: The effect of *Saccharomyces cerevisiae* yeast on the content of volatile compounds, ethanol, glycerol and volatile acidity of wines as well as the importance of inoculation with non-*Saccharomyces* and *S. cerevisiae* yeast for improving the aromatic complexity and characteristic features of wines were discussed in the paper. Moreover, the consequence of sequential inoculation of *S. cerevisiae* and lactic acid bacteria *Oenococcus oeni* on the content of volatile compounds, diacetyl, acetoine, volatile acidity, degradation of malic acid, content of diethyl succinate, ethyl lactate, biogenic amines was presented. The advantage of simultaneous inoculation, which is the reduction of fermentation time, was emphasized. The work highlights the role of indigenous strains of yeast and lactic acid bacteria in increasing the regional character of wines. The importance of enzymes produced by yeast and bacteria, as well as the increased interest in the ability of non-*O. oeni* species, such as *Lactobacillus* and *Pediococcus,* to perform malolactic fermentation were also discussed.

1. Introduction. 2. Alcoholic and malolactic fermentation. 3. Effect of yeast and lactic acid bacteria on oenological parameters of wines. 3.1. *S. cerevisiae*. 3.2. Non-*Saccharomyces*. 3.3. Lactic acid bacteria. 4. Summary

Słowa kluczowe: wino, drożdże, bakterie mlekowe
Keywords: wine, yeast, lactic acid bacteria

1. Wprowadzenie

Wino jest złożoną matrycą, zawiera związki o różnych właściwościach chemicznych. Związki lotne kształtują aromat wina, zatem odgrywają ważną rolę w jego jakości sensorycznej [9, 88]. Aromat wina można podzielić na cztery grupy: odmianowy (typowy dla odmiany winorośli), pre-fermentacyjny (powstający podczas przetwarzania winogron), fermentacyjny (wytwarzany przez drożdże podczas fermentacji alkoholowej i bakterie w trakcie fermentacji jabłkowo-mlekowej) i po-fermentacyjny (powstający w wyniku dojrzewania wina) [52, 88]. Część związków aromatycznych wina jest uwalniana z winogron i/lub modyfikowana przez drożdże i bakterie. Poprzez wybór kultury starterowej do przeprowadzenia fermentacji, można produkować wina o specyficznych profilach lotnych [77].

Tradycyjna fermentacja jest procesem spontanicznym prowadzonym sekwencyjnie przez różne rodzaje drożdży, naturalnie obecne na winogronach lub w winnicy. W nowoczesnym winiarstwie fermentacja alkoholowa zachodzi zazwyczaj przy użyciu kultur starterowych wybranych szczepów *S. cerevisiae* dostępnych w handlu [25]. Zastosowanie kultur startowych pozwala kontrolować proces fermentacji i poprawia jakość wina, z uwagi na redukcję wielu niepożądanych zapachów. Jednak w minionym dziesięcioleciu pojawiły się opinie, że używanie kultur starterowych doprowadziło do

* Autor korespondencyjny: dr inż. Anna Stój, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Skromna 8, 20-704 Lublin; e-mail: anna.stoj@up.lublin.pl

standaryzacji sensorycznej win i utraty ich typowości związanej z terroir (obszarem uprawy winorośli i produkcji win). Z tego względu, obecnie rośnie znaczenie wyboru rodzimych, autochtonicznych szczepów, które lepiej aklimatyzują się do pierwotnego środowiska i powodują zachowanie typowych właściwości sensorycznych wina [21, 26]. Mikrobiom winogron i wina, zależy od odmiany winorośli, położenia geograficznego winnicy, warunków klimatycznych i praktyk agronomicznych i jest uważany przez winiarzy i enologów za ważny czynnik wpływający na zapach wina [9]. W kilku publikacjach opisano izolację, selekcję i analizę rodzimych szczepów *S. cerevisiae* [20, 78, 81]. Jednocześnie opublikowano prace dotyczące wykorzystania rodzajów innych niż *Saccharomyces* do produkcji wina [31, 55, 78]. Sugerowane jest wykorzystanie multi-starterowego inokulum złożonego z drożdży nie-*Saccharomyces* i *Saccharomyces* w celu naśladowania spontanicznej fermentacji alkoholowej, uniknięcia ryzyka zahamowania lub powolnej fermentacji, a także polepszenia złożoności aromatycznej wina w porównaniu do fermentacji z czystą kulturą *S. cerevisiae* [21, 26].

W sprzyjających warunkach fermentacja jabłkowo-mlekowa może zachodzić spontanicznie. Wzrost populacji rodzimych bakterii mlekowych zależy od ich zdolności do wykorzystywania cukrów, aminokwasów i tolerowania wielu czynników stresowych, w tym kwasowości (pH < 3,5), SO_2 (> 10 mg/l), wysokich stężeń etanolu (> 16 % v/v) i niskich temperatur (< 12°C) [14, 23]. Jednak większość producentów wina woli zminimalizować ryzyko nieudanej lub powolnej fermentacji jabłkowo-mlekowej poprzez zaszczepienie niezawodną, dostępną w handlu kulturą starterową [6, 7, 14]. Bakterie mlekowe mogą być zaszczepione przed zakończeniem fermentacji alkoholowej lub po jej zakończeniu [7]. Gatunek *Oenococcus oeni* uważany jest za najbardziej wydajny i specyficzny dla fermentacji jabłkowo-mlekowej [53], aczkolwiek rośnie zainteresowanie wykorzystywaniem innych gatunków bakterii, np. *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus parvulus*, *P. damnosus* i *P. inopinatus*. Ponadto, w celu zwiększenia regionalnej tożsamości win, izolowane są również rodzime szczepy bakterii [7].

2. Fermentacja alkoholowa i jabłkowo-mlekowa

Podczas fermentacji alkoholowej (AF) z udziałem drożdży, obok etanolu i dwutlenku węgla, powstaje szereg lotnych metabolitów, których ilości są niewielkie, ale znaczące z punktu widzenia aromatu wina [77]. Należą do nich: alkohole wyższe, kwasy tłuszczowe, aldehydy, estry, ketony i lotne fenole [73]. Alkohole wyższe są przede wszystkim syntetyzowane przez drożdże w szlaku anabolicznym z glukozy oraz, w mniejszym stopniu, w szlaku katabolicznym z odpowiadających im aminokwasów, np. leucyna jest przekształcana w 3-metylo-1-butanol (alkohol izoamylowy), walina w 2-metylo-1-propanol (alkohol izobutylowy), a fenyloalanina w 2-fenyloetanol [38, 73]. Kwasy tłuszczowe mogą być wytwarzane przez drożdże za pośrednictwem szlaków anabolicznych lub podczas β-utleniania długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Aldehydy powstają z nienasyconych kwasów tłuszczowych (kwas linolowy, kwas linolenowy) oraz w wyniku aktywności lipooksygenazy. Estry octanowe są produktami reakcji acetylo-CoA z alkoholami wyższymi, które powstają w wyniku degradacji aminokwasów, węglowodanów i lipidów. Estry etylowe kwasów tłuszczowych powstają pod wpływem enzymów drożdży i etanolizy acetylo-CoA, który jest wytwarzany podczas syntezy lub degradacji kwasów tłuszczowych. Ketony są produktami kondensacji aktywowanych kwasów tłuszczowych. Lotne fenole (np. 4-etylofenol) mogą powstawać wskutek dekarboksylacji kwasów hydroksycynamonowych [49, 65, 73, 80]. Wytwarzanie i zawartość metabolitów, pożądanych lub niepożądanych, powstających podczas fermentacji zależy od udziału poszczególnych rodzajów i szczepów drożdży [83].

Fermentacja jabłkowo-mlekowa (malolaktyczna; MLF) polega na konwersji kwasu jabłkowego do kwasu mlekowego i dwutlenku węgla przy udziale bakterii kwasu mlekowego [23, 75, 77]. Podstawowymi celami MLF jest redukcja kwasowości i poprawa stabilności mikrobiologicznej poprzez usunięcie kwasu jabłkowego – potencjalnego źródła węgla, który może być wykorzystany przez bakterie (*Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Acetobacter*) i drożdże psujące (*Brettanomyces*). Ponadto efektem MLF jest modyfikacja aromatu wina [6, 14, 53]. Bakterie kwasu mlekowego produkują z kwasu cytrynowego związki karbonylowe lub acetonowe, w tym diacetyl, acetoinę i 2,3-butanodiol, przy udziale liazy cytrynianowej, co powoduje zwiększenie maślanego zapachu wina [75]. Fermentacja jabłkowo-mlekowa jest niezbędna w produkcji większości win czerwonych, pożądana w niektórych białych, a także w bazach win musujących [7, 76].

Szlaki metaboliczne i/lub reakcje biochemiczne przebiegające z udziałem drożdży oraz bakterii mlekowych są szczegółowo opisane w kilku pracach przeglądowych [9, 75, 77].

Moszcz winogronowy umożliwia wzrost ograniczonej liczby gatunków mikroorganizmów ze względu na niskie pH i wysoką zawartość cukru. Ponadto czynnikiem powodującym selekcję drożdży i bakterii jest dwutlenek siarki dodawany jako środek przeciwutleniający i konserwujący. W moszczu podczas fermentacji panują warunki beztlenowe, następuje wyczerpanie składników odżywczych i rośnie zawartość alkoholu, co eliminuje wrażliwe mikroorganizmy. Wśród mikro-

organizmów biorących udział w produkcji wina dominują drożdże. Należą one do następujących rodzajów: *Brettanomyces*, *Dekkera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora* i *Zygosaccharomyces*. W spontanicznych fermentacjach, we wczesnych stadiach, obserwuje się wzrost rodzimych drożdży z rodzajów *Kloeckera*, *Hanseniaspora* i *Candida*, w środkowych etapach, gdy etanol wzrasta do 3–4% rośnie kilka rodzajów *Metschnikowia* i *Pichia*, a ostatnie etapy są zdominowane przez tolerujące alkohol szczepy *S. cerevisiae* [77].

Spośród bakterii, w winie powszechnie występują jedynie bakterie kwasu mlekowego i bakterie kwasu octowego. Bakterie mlekowe odgrywają ważną rolę w produkcji wina, natomiast bakterie octowe są uważane za mikroorganizmy psujące, wytwarzające aldehyd octowy i kwas octowy. Tylko cztery rodzaje bakterii kwasu mlekowego: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* i *Pediococcus*, są w stanie przetrwać niekorzystne warunki panujące w winie. Najlepiej przystosowanym gatunkiem do przeprowadzenia MLF jest *O. oeni* [77].

3. Wpływ drożdży i bakterii mlekowych na parametry enologiczne win

3.1. *S. cerevisiae*

W winiarstwie, w większości przypadków, za fermentację alkoholową są odpowiedzialne komercyjne drożdże *S. cerevisiae*, które umożliwiają produkcję win o przewidywalnych cechach jakościowych. Są one zwykle stosowane jako kultury starterowe (aktywne drożdże suszone) [78]. Gammacurta i wsp. [34] rozważali wpływ różnych komercyjnych szczepów *S. cerevisiae* (jak również *O. oeni*) na profile aromatyczne win czerwonych. Wykazali, że stężenia estrów w winach z regionu Bordeaux zależały od szczepu *S. cerevisiae*. Znaczące różnice w produkcji estrów zaobserwowane pod koniec AF, nie ulegały zmianie po zakończeniu MLF i podczas dojrzewania.

Alternatywą dla *S. cerevisiae* mogą być także hybrydy międzygatunkowe drożdży *Saccharomyces*, dostępne w handlu. *Saccharomyces uvarum* i *Saccharomyces kudriavzevii* oraz ich hybrydy z *S. cerevisiae* wykazują dobre zdolności fermentacyjne w niskich temperaturach, co skutkuje winami o niższej zawartości etanolu, kwasu octowego oraz wyższej zawartości glicerolu i związków aromatycznych [66, 67]. Pérez-Torrado i wsp. [67] porównali parametry enologiczne szczepu hybrydowego *S. cerevisiae* × *S. uvarum* (S6U) oraz szczepów referencyjnych: *S. cerevisiae* T73 i *S. uvarum* CECT 12930, w dwóch moszczach z czerwonych winogron (Bobal i Tempranillo) i dwóch białych (Macabeo i Parellada), poddanych fermentacji w czterech różnych temperaturach: 14, 18, 22 i 32°C. *S. uvarum* wykazywał największą wydajność fermentacji w niskich i średnich temp.: 14, 18 i 22°C, *S. cerevisiae* – w wysokiej temp.: 32°C, natomiast szczep hybrydowy S6U – w temp. 18°C. W temp.: 14, 18, 22°C, *S. uvarum* wytwarzał więcej glicerolu niż *S. cerevisiae*. W temp. 32°C wszystkie szczepy wytwarzały taką samą ilość glicerolu. Szczep *S. cerevisiae* zwykle wytwarzał najniższą ilość glicerolu (z wyjątkiem temp. 32°C), a drożdże hybrydowe wytwarzały średnie lub podobne do szczepu *S. uvarum* ilości glicerolu. *S. uvarum* i hybryda produkowały znacznie mniej kwasu octowego w porównaniu do *S. cerevisiae*, z wyjątkiem fermentacji przeprowadzonych w moszczu z winogron Bobal i fermentacji moszczów przeprowadzonych w temp. 32°C. Szczep hybrydowy był największym lub średnim producentem 2-metylo-1-propanolu i 3-metylo-1-butanolu, z wyjątkiem fermentacji w 32°C, i największym producentem bursztynianu dietylu w temperaturze 18°C w badanych moszczach oraz w temperaturze 22°C w moszczu Tempranillo i Bobal. Ponadto autorzy porównali sumę wszystkich związków aromatycznych, estrów i alkoholi wyższych produkowanych podczas fermentacji alkoholowej przez wszystkie szczepy w każdej temperaturze i w każdym moszczu. Szczep hybrydowy S6U wytworzył najwyższe poziomy związków aromatycznych w moszczach Tempranillo i Parellada w temp. 18°C, najwyższe poziomy estrów w Tempranillo w temp. 14°C oraz w Tempranillo i Parellada w temp. 18°C. Podobne wyniki uzyskali González i wsp. [37] w moszczach z winogron Macabeo i Tempranillo poddanych fermentacji w temperaturach: 14, 18, 22 i 32°C z udziałem *S. kudriavzevii*, *S. cerevisiae* i hybrydy *S. cerevisiae* × *S. kudriavzevii*.

Callejon i wsp. [18] porównali profile lotne win z odmiany Merlot wyprodukowanych przy udziale czterech rodzimych szczepów drożdży *S. cerevisiae* (MY, NY, OY, AGY) i jednego komercyjnego szczepu (XR). Handlowe drożdże wybrano zgodnie z preferencjami winnicy, a szczepy autochtoniczne wyizolowano z piwnicy tej winnicy i winnicy sąsiedniej. Zaobserwowane różnice były raczej ilościowe niż jakościowe. Stężenie większości związków lotnych istotnie zależało od szczepu drożdży. Najwyższe zawartości związków lotnych stwierdzono w dwóch winach wyprodukowanych przez autochtoniczne szczepy drożdży (M i N). Autochtoniczne szczepy drożdży wytwarzały wina (M, N, O, AG) o różnych profilach lotnych. Wino M wyróżniało się najwyższą ogólną zawartością estrów etylowych (np. mleczanu etylu i bursztynianu dietylu), alkoholi (1-heksanolu i cis-3-heksen-1-olu) i kwasów (np. kwasu heksanowego). Wino N miało najwyższą zawartość aldehydów (np. aldehydu octowego), wino O – najniższą zawartość kwasów, natomiast wino AG

– najwyższą zawartość estrów octanowych. Wszystkie autochtoniczne szczepy nadawały się do produkcji win o różnym stylu.

Wybrane do przeprowadzenia fermentacji kultury startowe (komercyjne) będące mikroorganizmami wyselekcjonowanymi, powodują standaryzację właściwości sensorycznych win [25]. Dlatego proponowane jest stosowanie rodzimych starterów, wybranych spośród drożdży bytujących w danym regionie geograficznym, jako narzędzie do produkcji win najwyższej jakości, posiadających typowe cechy związane z miejscem pochodzenia. Wiele grup badawczych zaproponowało wykorzystanie miejscowych szczepów, wyizolowanych z określonych środowisk i wybranych na podstawie właściwości technologicznych i cech jakościowych [26, 39, 81]. W przypadku selekcji miejscowych szczepów *S. cerevisiae* należy wziąć pod uwagę wiele ważnych kryteriów enologicznych, takich jak niska produkcja kwasowości lotnej, niska produkcja siarkowodoru, wysoka tolerancja na alkohol, wyczerpanie potencjału cukrowego, wysoka aktywność fermentacyjna, odporność na dwutlenek siarki czy odporność na niskie pH [57, 70]. Badania Tufariello i wsp. [81] wykazały wpływ bioróżnorodności rodzimych szczepów *S. cerevisiae*, wyizolowanych ze spontanicznej fermentacji win z winogron Negroamaro z dwóch mikroobszarów Salento (Włochy), na aromat win. Profile aromatyczne tych win różniły się zawartością octanów, estrów etylowych kwasów tłuszczowych i alkoholi wyższych i były ściśle związane z geograficznym pochodzeniem drożdży wykorzystywanych w procesie fermentacji. Badania te udowodniły, że zastosowanie rodzimej kultury starterowej wzmacnia specyficzny charakter wina związany z regionem produkcji. Grieco i wsp. [39] stwierdzili, że dwa autochtoniczne szczepy drożdży wyizolowane ze spontanicznej fermentacji win Primitivo z regionu Apulia (Włochy) są dobrymi kandydatami na przemysłowe kultury starterowe, ponieważ zdominowały fermentację i były zdolne wyprodukować wina charakteryzujące się specyficznymi cechami enologicznymi i organoleptycznymi. Wyniki analizy sensorycznej tych win były bardzo dobre. Podobne badania dotyczące selekcji i oceny miejscowych szczepów drożdży winnych przeprowadzono w wielu regionach uprawy winorośli, takich jak: Amyntaio (Grecja) [63], Xinjiang (Chiny) [57] czy Galicja (Hiszpania) [15].

3.2. Nie-*Saccharomyces*

Współczesne trendy w produkcji wina zwróciły się w kierunku mniej znanych rodzajów drożdży, innych niż *Saccharomyces*. Drożdże z tych rodzajów przeprowadzają pierwsze etapy naturalnej, spontanicznej fermentacji i zapewniają różnorodność aromatyczną win [11]. Czyste kultury drożdży innych niż *Saccharomyces*, którymi szczepiono moszcze winogronowe, wytwarzały szereg metabolitów powodujących psucie win (kwas octowy, acetoina, octan etylu i aldehydu octowego), a także odpowiedzialnych za nieprzyjemny zapach (fenole winylowe i fenole etylowe związane z rozwojem *Brettanomyces*/*Dekkera*), co wyklucza stosowanie takich drożdży w wybranych kulturach starterowych. Jednak, gdy drożdże inne niż *Saccharomyces* są mieszane ze szczepem *S. cerevisiae*, ich negatywna aktywność metaboliczna może nie być wyrażona lub może być modyfikowana przez aktywność metaboliczną kultury starterowej *S. cerevisiae* [24, 25, 35]. Ponadto drożdże inne niż *Saccharomyces* na ogół nie są zdolne do zakończenia AF samodzielnie, dlatego muszą im towarzyszyć drożdże winiarskie *S. cerevisiae*. To można osiągnąć za pomocą inokulacji najpierw drożdżami nie-*Saccharomyces*, a następnie drożdżami winiarskimi *S. cerevisiae*, aby zakończyć fermentację. Jest to znane jako sekwencyjne szczepienie, w przeciwieństwie do jednoczesnej inokulacji (koinokulacji, kofermentacji, inokulacji mieszanej), w której dwa lub więcej rodzajów drożdży dodaje się w tym samym czasie. Drożdże inne niż *Saccharomyces* mają słabe zdolności fermentacyjne i mogą być hamowane przez *S. cerevisiae*, dlatego czas inokulacji może być kluczowy dla niektórych szczepów innych niż *Saccharomyces*, z punktu widzenia wpływu na skład wina lub profil sensoryczny [11, 12, 83].

W ostatnich latach, zaproponowano zastosowanie podczas fermentacji wina wybranych drożdży innych niż *Saccharomyces* wraz ze szczepem starterowym *S. cerevisiae*, w celu poprawy złożoności aromatycznej i charakterystycznych cech win [24, 25, 35]. Stosowanie drożdży innych niż *Saccharomyces* w procesach fermentacji poprawia parametry jakości, tzn. obniża zawartość etanolu, zwiększa zawartość glicerolu, polepsza złożoność aromatyczną win, zwiększa kwasowość, zwiększa zawartość antocyjanów, zwiększa zawartość polisacharydów i mannoprotein. Przy użyciu niektórych rodzajów innych niż *Saccharomyces* można również zmniejszyć zawartość amin biogennych lub karbaminianu etylu, związków szkodliwych, które wpływają na bezpieczeństwo żywności [11, 12]. W Tabeli I przedstawiono wyniki badań dotyczących wpływu inokulacji drożdżami nie-*Saccharomyces* i *S. cerevisiae* na związki aromatyczne i inne parametry enologiczne win.

Większość badań koncentrowała się na ocenie wpływu drożdży z rodzaju nie-*Saccharomyces* na związki lotne win. W kilku pracach oceniono wpływ enzymów wytwarzanych przez te drożdże na aromat win. Enzymy zwiększały uwalnianie związków lotnych podczas produkcji wina. β-glukozydaza ze szczepu *Hanseniaspora uvarum* wykazywała katalityczną specyficzność wobec aromatycznych glikozydów C13-norizoprenoidów i niektórych terpenów, powodując zwiększenie zawartości tych związków w winie i wzmocnienie

Tabela I
Wpływ inokulacji drożdżami *S. cerevisiae* i nie-*Saccharomyces* na związki aromatyczne i inne parametry enologiczne win w porównaniu do fermentacji z czystą kulturą *S. cerevisiae*

Gatunek	Komercyjny/ endogenny	Technika inokulacji	Odmiana winorośli	Wpływ na związki aromatyczne i parametry enologiczne win	Piśmiennictwo
Toluraspora delbrueckii	komercyjny lub endogenny	sekwencyjna	Tempranillo	poprawa złożoności aromatycznej win; wyższa zawartość estrów; niższa produkcja glicerolu, 2,3-butanodiolu; wyższa produkcja diacetylu, mleczanu etylu i octanu 2-fenyloetylu; produkcja 3-etoksypropanolu	[58]
Toluraspora delbrueckii	komercyjny	mieszana lub sekwencyjna	Corvina, Rondinella, Corvinone	wyższa zawartość 2-fenyloetanolu, alkoholu benzylowego, furfuralu, linalolu i α-terpineolu; niższa zawartość kwasu octowego, cyronellolu i nerolu	[4]
Toluraspora delbrueckii	endogenny	sekwencyjna	Tempranillo	wyższa produkcja alkoholi wyższych; wyższa produkcja 2-metylo-1-propanolu, 2-fenyloetanolu, 1-butanolu i metionolu	[31]
Lachancea thermotolerans	endogenny	sekwencyjna	Tempranillo	wyższa produkcja alkoholi wyższych; wyższa produkcja 2-metylo-1-propanolu i 1-propanolu, acetoiny i mleczanu etylu	[31]
Starmerella bacillaris (*Candida zemplinina*)	endogenny	mieszana lub sekwencyjna	Barbera	wyższa produkcja związków lotnych; poprawa profilu aromatycznego; wyższa zawartość glicerolu	[30]
Starmerella bacillaris (*Candida zemplinina*)	endogenny	sekwencyjna	Cabernet sauvignon, Merlot, Pinot noir, Shiraz	niższa zawartość estrów ogółem; niższa zawartość octanu etylu; wyższa zawartość kwasów ogółem; wyższa zawartość glicerolu	[29]
Starmerella bacillaris (*Candida zemplinina*)	endogenny	mieszana lub sekwencyjna	Kotsifali, Mandilari	poprawa złożoności aromatycznej win	[64]
Starmerella bacillaris (*Candida zemplinina*)	endogenny	sekwencyjna	Shiraz	wyższa zawartość laktonów i terpenów	[87]
C. stella	komercyjny i endogenny	mieszana	Cabernet sauvignon	poprawa złożoności aromatycznej win; wyższa zawartość estrów, kwasów tłuszczowych i norizoprenoidów	[56]
Hanseniaspora uvarum	endogenny	mieszana lub sekwencyjna	Cabernet sauvignon Ecolly	wyższa produkcja terpenów, C13-norizoprenoidów, estrów octanowych, estrów etylowych i kwasów tłuszczowych	[45]
Hanseniaspora uvarum	komercyjny i endogenny	mieszana	Cabernet sauvignon	wyższa produkcja alkoholi wyższych	[56]
Hanseniaspora uvarum	endogenny	sekwencyjna	Bolero, Rondo, Regent	wyższa produkcja glicerolu, octanu etylu i kwasu octowego	[55]
Metschnikowia pulcherrima	endogenny	sekwencyjna	Shiraz, Chardonnay	niższa zawartość etanolu; wyższa zawartość octanu etylu, fenyloetanolu i octanu 2-fenyloetanolu	[85]
Metschnikowia pulcherrima	endogenny	mieszana	Merlot	niższa zawartość etanolu; wyższa zawartość octanu etylu, estrów ogółem, alkoholi wyższych ogółem i związków siarki ogółem	[84]
Metschnikowia pulcherrima	endogenny	sekwencyjna	Tempranillo	wyższa produkcja alkoholi wyższych; wyższa produkcja 2-metylo-1-propanolu i metionolu	[31]
Metschnikowia pulcherrima	komercyjny i endogenny	mieszana	Cabernet sauvignon	poprawa złożoności aromatycznej win; wyższa produkcja alkoholi wyższych	[56]
M. viticola	endogenny	sekwencyjna	Bolero, Rondo, Regent	wyższa produkcja 2-heksenianu etylu i octanu (Z)-3-heksenylu	[55]
M. fructicola	endogenny	sekwencyjna	Bolero, Rondo, Regent	wyższa zawartość pentanianu etylu, heptanianu etylu i octanu 2-metylopropylu	[55]
Pichia kluyveri	komercyjny	sekwencyjna	Shiraz	wyższa zawartość aldehydu octowego i 2-fenylooctanu etylu	[87]

Tabela I. C.d.

Gatunek	Komercyjny/ endogenny	Technika inokulacji	Odmiana winorośli	Wpływ na związki aromatyczne i parametry enologiczne win	Piśmiennictwo
P. fermentans	komercyjny i endogenny	mieszana	Cabernet sauvignon	poprawa złożoności aromatycznej win; wyższa zawartość estrów, kwasów tłuszczowych i norizoprenoidów	[56]
Williopsis pratensis	endogenny	sekwencyjna	Tempranillo	wyższa produkcja octanów; wyższa produkcja 2-fenylooctanu etylu	[31]
Issatchenkia orientalis i endogenny	komercyjny i endogenny	mieszana	Cabernet sauvignon	wyższa produkcja alkoholi wyższych	[56]
Schizosaccharomyces pombe	endogenny	mieszana lub sekwencyjna	Garnacha	niższa produkcja kwasu jabłkowego	[13]

aromatów kwiatowych, słodkich, jagodowych i orzechowych [46]. Preparat glikozydazy ze szczepu *Rhodotorula mucilaginosa*, wykazujący wysoki poziom β-glukozydazy, hydrolizował glikozydy związków benzenowych i C13-norizoprenoidów, tak więc poprawiał aromaty kwiatowe i owocowe wina [47]. Z kolei *Kluyveromyces marxianus* miał wysoką aktywność β-liazy, a zatem wykazywał zdolność uwalniania tioli z prekursorów aromatów w winogronach [10]. Wysoki potencjał enzymatyczny drożdży nie-*Saccharomyces* sprawia, że stanowią przydatne narzędzie do poprawy aromatu win [8].

3.3. Bakterie mlekowe

W ciągu ostatnich lat opracowano i wprowadzono do handlu bakteryjne kultury starterowe do prowadzenia fermentacji jabłkowo-mlekowej (MLF). Przyczyniło się to do poprawy wydajności i niezawodności MLF. Najczęściej te kultury starterowe wykorzystują bakterie z gatunku *Oenococcus oeni*. Jednocześnie prowadzono badania mające na celu określenie optymalnego czasu zaszczepienia. Bakteryjne kultury starterowe *O. oeni* mogą być szczepione sekwencyjnie (po AF, technika tradycyjna) lub jednocześnie z drożdżami (na początku lub pod koniec AF) [7].

W winiarstwie najczęściej stosuje się szczepienie sekwencyjne. Opublikowano wiele prac dotyczących wpływu szczepienia sekwencyjnego na aromat i parametry enologiczne win. Costello i wsp. [27] wykazali, że zawartość związków aromatycznych w winie Cabernet Sauvignon, takich jak: diacetyl, mleczan etylu, estry etylowe kwasów tłuszczowych, kwasy lotne, alkohole wyższe, zależy od szczepu *O. oeni,* składu wina (szczególnie zawartości etanolu i pH przed MLF), a także od regionu pochodzenia winogron. Według Gammacurta i wsp. [33] stężenia większości związków lotnych w winach po fermentacji alkoholowej (AF) zależały od odmiany winogron (Cabernet Sauvignon i Merlot), natomiast były nieznacznie zmienione przez bakterie mlekowe. Jednak stężenia rozgałęzionych hydroksylowanych estrów, takich jak 2-hydroksy-3-metylobutanian etylu i 2-hydroksy-4-metylopentanian etylu, były silnie związane ze szczepem bakterii, natomiast nie zależały od odmiany winogron lub drożdży używanych do AF. López i wsp. [59] badali wina Tempranillo zaszczepione dwiema kulturami starterowymi *O. oeni* i wina Tempranillo poddane spontanicznej MLF. Zaszczepienie win bakteriami mlekowymi *O. oeni* skróciło czas MLF do 19 dni, a wina miały bardziej świeży i owocowy charakter w porównaniu do poddanych spontanicznej MLF. Ponadto niskie początkowe stężenie aminokwasów i wykorzystanie tych związków podczas AF przez zaszczepione drożdże zaowocowało winami o bardzo niskim poziomie amin biogennych po MLF i 3-miesięcznym okresie przechowywania. Zatem wybór odpowiedniego startera ma znaczenie w produkcji win gatunkowych. Malherbe i wsp. [60] zaobserwowali istotne różnice w degradacji kwasu cytrynowego, zależące od kultury starterowej *O. oeni* i odmiany winogron z której wyprodukowano wina (Shiraz i Pinotage). Czynniki te wpłynęły na związki powstające w wyniku metabolizmu kwasu cytrynowego, takie jak: diacetyl, kwas octowy i acetoina. Zastosowanie kultur starterowych spowodowało wzrost stężeń alkoholi wyższych, kwasów tłuszczowych i estrów ogółem, przy większym wzroście estrów etylowych niż estrów octanowych w porównaniu do fermentacji spontanicznej. Ponadto wzrosły stężenia mleczanu etylu, bursztynianu dietylu, oktanianu etylu, 2-metylopropanianu etylu i propionianu etylu. Natomiast poziomy octanu heksylu, octanu izoamylu, octanu 2-fenyloetylu i octanu etylu zmniejszyły się lub pozostały niezmienione, w zależności od szczepu bakterii i odmiany winogron. Ruiz i wsp. [71] stwierdzili istotne statystycznie różnice w degradacji kwasu cytrynowego zarówno między winami z różnych odmian (Syrah, Tinto Pámpana Blanca, Cabernet Sauvignon i Merlot), jak i między szczepami *O. oeni* (komercyjny i endogenny). Endogenny *O. oeni* słabo rozkładał kwas cytrynowy w winach o niskim pH (3,13–3,71) lub wysokiej zawartości alkoholu (12,22–13,20% v/v), co oznacza, że fermentację jabłkowo-mlekową można

Tabela II
Wpływ jednoczesnego i sekwencyjnego szczepienia *S. cerevisiae* i *O. oeni* na związki aromatyczne i inne parametry enologiczne win

Szczep *O. oeni*	Odmiana winorośli	Technika inokulacji	Wpływ na związki aromatyczne i inne parametry enologiczne win	Piśmiennictwo
endogenny	Tempranillo, Merlot	jednoczesna lub sekwencyjna	**jednoczesna:** skrócenie czasu fermentacji, brak wyraźnej degradacji kwasu jabłkowego, brak nadmiernego wzrostu kwasowości lotnej, wyższa zawartość kwasu cytrynowego, niższa zawartość amin biogennych, wyższa zawartość mleczanu etylu, niższa zawartość bursztynianu dietylu **sekwencyjna:** niższa zawartość kwasu cytrynowego, wyższa zawartość amin biogennych, niższa zawartość mleczanu etylu, niższa zawartość bursztynianu dietylu	[50]
komercyjny	Negroamaro	jednoczesna lub sekwencyjna	**jednoczesna:** skrócenie czasu fermentacji, niższa kwasowość lotna, wyższa zawartość bursztynianu dietylu i mleczanu etylu, wyższa ogólna zawartość estrów, alkoholi i kwasów **sekwencyjna:** wyższa kwasowość lotna, niższa ogólna zawartość estrów alkoholi i kwasów	[79]
komercyjny	Tannat	jednoczesna lub sekwencyjna	**jednoczesna:** zablokowanie fermentacji, wyższa kwasowość lotna **sekwencyjna:** zakończenie fermentacji	[62]
komercyjny	Cabernet sauvignon, Merlot, Teroldego, Marzemino	jednoczesna lub sekwencyjna	**jednoczesna:** spowolnienie aktywności drożdży, niższa zawartość kwasu jabłkowego, wyższa zawartość kwasu octowego **sekwencyjna:** problem z degradacją kwasu jabłkowego	[43]
komercyjny	100 odmian, np. Cabernet sauvignon, Merlot, Syrah, Sangiovese, Valpolicella	jednoczesna lub sekwencyjna	**jednoczesna:** skrócenie czasu fermentacji, niższa zawartość kwasu octowego **sekwencyjna:** wydłużenie czasu całkowitej degradacji kwasu jabłkowego, wyższa zawartość kwasu octowego	[5]
komercyjny	Shiraz	jednoczesna lub sekwencyjna	**jednoczesna:** skrócenie czasu fermentacji, mniejsze ryzyko zakażenia mikrobiologicznego **sekwencyjna:** wydłużenie czasu stabilizacji wina	[1]
komercyjny	Merlot	jednoczesna lub sekwencyjna	**jednoczesna:** skrócenie czasu fermentacji, wyższa zawartość octanu etylu, bursztynianu dietylu, diacetylu **sekwencyjna:** wydłużenie czasu fermentacji, niższa zawartość octanu etylu, bursztynianu dietylu, diacetylu	[3]
endogenny	Cabernet franc	jednoczesna lub sekwencyjna	**jednoczesna:** skrócenie czasu fermentacji, brak nadmiernego wzrostu kwasowości lotnej **sekwencyjna:** wydłużenie czasu fermentacji	[19]

przedłużyć bez ryzyka wytworzenia wysokich stężeń diacetylu i acetoiny. Natomiast różnice w zawartości głównych związków lotnych i amin biogennych między szczepami były nieznaczne.

Obecnie proponowane jest jednoczesne szczepienie moszczu drożdżami i bakteriami na początku fermentacji, szczególnie w przypadku moszczów o wysokiej kwasowości lub zawartości cukru, czemu towarzyszy wysoka zawartość etanolu po zakończeniu AF [76]. W przypadku jednoczesnego szczepienia bakterie mają korzystniejsze warunki do wzrostu, ponieważ w moszczu winogronowym jest więcej składników odżywczych niż w winie, mniej alkoholu i innych inhibitorów wytwarzanych przez drożdże, np. peptydów [7]. W Tabeli II przedstawiono wpływ jednoczesnego i sekwencyjnego szczepienia *S. cerevisiae* i *O. oeni* na związki aromatyczne i inne parametry enologiczne win. Niewątpliwą zaletą jednoczesnego szczepienia, zwiększającą opłacalność produkcji win, jest skrócenie czasu winifikacji, co udowodniono w większości badań [1, 3, 5, 19, 50, 79]. Fakt ten stwarza możliwość szybszej stabilizacji wina, a tym samym zmniejsza ryzyko zakażenia mikrobiologicznego [1]. Jednak nieliczne badania wykazały, że jednoczesne szczepienie spowalnia wzrost i pogarsza żywotność komórek drożdży, co może prowadzić do spowolnienia lub zablokowania AF [43, 62], zwiększając przy tym kwasowość lotną spowodowaną wyższą produkcją kwasu octowego przez heterofermentacyjny *O. oeni* (metabolizm cukru). Przeciwnie w innej pracy stwierdzono brak nadmiernego wzrostu kwasowości lotnej [50], a nawet niższą kwasowość lotną w przypadku koinokulacji, w porównaniu do szczepienia sekwencyjnego [5, 79]. Inną zaletą jednoczesnego szczepienia jest niższa zawartość amin biogennych [50].

Zmiany chemiczne podczas jednoczesnego zaszczepienia zależą silnie od szczepów drożdży i bakterii mlekowych, ich wzajemnych interakcji, czasu szczepienia, a także od odmiany winogron i składu chemicznego moszczu [3, 62, 79]. Jednoczesne szczepienie drożdży i bakterii w moszczu o niekorzystnym składzie

chemicznym (niskiej zawartości azotu) może być obiecującą alternatywą dla szczepienia sekwencyjnego. Konieczna jest jednak staranna kontrola składu moszczu, zarówno chemicznego (pH, zawartość cukrów), jak i mikrobiologicznego (negatywne interakcje między drożdżami i bakteriami), w celu uzyskania warunków niezawodnej aktywności mikrobiologicznej w pierwszych etapach produkcji wina [43]. Ponadto istnieje potrzeba dalszych badań nad jednoczesnym szczepieniem przy użyciu bakterii i drożdży w różnych warunkach winiarskich (temperatura, pH, zawartość SO_2, zawartość etanolu), zanim będzie ono zalecane jako praktyka enologiczna [5].

Podobnie jak w przypadku drożdży autochtonicznych, rośnie zainteresowanie zastosowaniem rodzimych szczepów *O. oeni*, w celu zwiększenia regionalnego charakteru win. W kilku laboratoriach wyizolowano i zidentyfikowano rodzime szczepy *O. oeni*, a także oceniono ich wpływ na aromat i inne parametry enologiczne win [19, 22, 32, 36, 50, 72]. Pochodzenie wina nabiera znaczenia w kontekście różnicowania produktów na rynku. Zwiększenie regionalnej tożsamości wina potencjalnie zwiększy jego atrakcyjność i wartość rynkową [7].

Spośród bakterii mlekowych, gatunek *O. oeni* jest najczęściej badany i stosowany w winiarstwie do zapoczątkowania MLF. W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie zdolnością przeprowadzania MLF także przez inne rodzaje bakterii mlekowych, takie jak *Lactobacillus* i *Pediococcus* [76]. W przeszłości unikano tych rodzajów ze względu na ich negatywny wpływ na wino. *Lactobacillus* powodował psucie się wina, w tym mysi posmak i nadmiar kwasu octowego, a niektóre szczepy *Pediococcus damnosus* zwiększały lepkość win w związku z syntezą egzopolisacharydów. Jednak nowsze badania wykazały, że niektóre szczepy *Lactobacillus*, a także *Pediococcus* nie wykazują negatywnych cech i nadają się do indukcji MLF [7, 28, 86]. Bravo-Ferrada i wsp. [16] wyizolowali i scharakteryzowali 53 szczepy *Lactobacillus plantarum* z patagońskiego wina Pinot noir, w celu opracowania komercyjnych kultur starterowych. Do dalszych badań wybrali 8 szczepów, na podstawie zdolności do tolerowania alkoholu o stężeniu 14%. Następnie autorzy zbadali tolerancję różnych czynników przez te szczepy (wysoka zawartość etanolu, pH, SO_2), aktywności glukozydazy i tanazy, wykorzystanie cytrynianu, obecność genów biorących udział w syntezie amin biogennych oraz konsumpcję kwasu L-jabłkowego. Wyniki otrzymane dla wybranych szczepów *L. plantarum* porównali z wynikami dla szczepu *O. oeni* UNQOe 73, również wyizolowanego z patagońskiego wina Pinot noir. Izolaty *L. plantarum* wykorzystywały wyższe ilości kwasu jabłkowego niż *O. oeni* UNQOe 73. Izolat UNQLp 155 wykazywał lepszy wzrost niż UNQOe 73 w warunkach stresowych (50 ppm SO_2, pH 3,5), a także dobrą aktywność malolaktyczną i implantację w sterylnym winie. UNQLp 133 był w stanie rosnąć tak samo jak *O. oeni* UNQOe 73 w sterylnym winie. Zdolności do wzrostu i wykorzystania kwasu jabłkowego przez szczepy UNQLp 155 i UNQLp 133 zadecydowały o poddaniu ich dalszym testom w winnicy pod kątem technologicznym. Brizuela i wsp. [17] zbadali zdolność do przetrwania w winie Pinot noir, konsumpcję kwasu L-jabłkowego i wpływ na profil lotny dwóch szczepów *O. oeni* (UNQOe 31b, UNQOe 73.2) i dwóch szczepów *L. plantarum* UNQLp 11, UNQLp 155). Oba szczepy *O. oeni* i jeden szczep *L. plantarum* (UNQLp 11) pozostały żywotne, zużywając kwas L-jabłkowy z jednoczesnym wzrostem zawartości kwasu L-mlekowego. Po 20 dniach inkubacji zaszczepionego, sterylnego wina, zawartość kwasu L-mlekowego wynosiła 2,86 g/l dla UNQOe 73.2 oraz 2.53 g/l dla UNQLp 11 i UNQOe 31b. Szczepy UNQLp 11 i UNQOe 31b produkowały wyższe stężenia alkoholi i niższe stężenia estrów w porównaniu do UNQOe 73.2. Ponadto UNQOe 73.2 wytwarzał odpowiedni poziom diacetylu (1,15 mg/l) i wyższe stężenia estrów owocowych (octan izobutylu, octan izoamylu, octan heksylu, oktanian etylu, dekanian etylu), które są charakterystyczne dla win Pinot noir. Z kolei Lerm i wsp. [54] stwierdzili, że zarówno szczepy *O. oeni*, jak i *L. plantarum* mogą zostać wykorzystane jako kultury starterowe, przy czym szczepy *L. plantarum* posiadały geny kodujące β-glukozydazę, dekarboksylazę kwasu fenolowego, iminopeptydazę prolinową i aminopeptydazę metioninową. Pierwszą komercyjną kulturę starterową, będącą mieszaniną bakterii *O. oeni* i *L. plantarum*, opracowano w Instytucie Biotechnologii Wina na Uniwersytecie Stellenbosch. Głównym celem dodania kultury *Lactobacillus* do kultury *Oenococcus* był jej korzystny wpływ na cechy sensoryczne [2]. Strickland [74] badał wpływ kilku szczepów *Pediococcus parvulus*, *P. damnosus* i *P. inopinatus* na skład chemiczny i jakość sensoryczną win Pinot noir pochodzących z Oregonu i Waszyngtonu. Poszczególne szczepy znacznie różniły się pod względem degradacji kwasu L-jabłkowego, produkcji kwasu D-mlekowego, diacetylu, a także wpływu na cechy sensoryczne win. Wszystkie szczepy były zdolne do co najmniej częściowej degradacji kwasu jabłkowego, a dwa szczepy całkowicie zdegradowały kwas jabłkowy. Żaden ze szczepów nie wytwarzał wysokiego poziomu amin biogennych. Wszystkie szczepy degradowały kwas p-kumarowy do 4-winylofenolu, co w konsekwencji przyspieszało produkcję 4-etylofenolu przez *Brettanomyces bruxellensis* w układzie modelowym. Ponadto w winach zwiększyły się pożądane aromaty „kwiatowe" i „czerwonych owoców". Juega i wsp. [51] wykazali, że *P. damnosus,* biorący udział w fermentacji malolaktycznej win białych (Albarino i Caino), nie produkował amin biogennych i egzopolisacharydów.

Zaobserwowali w winach zwiększenie takich cech jak: „ciało", „miękkość", aromat miodowy, a także zmniejszenie aromatu ziołowego i kwasowości. Konieczne są dalsze badania nad wpływem *Pediococcus* na właściwości sensoryczne win [86].

Bakterie mlekowe, zarówno *O. oeni*, jak i nie-*O. oeni* mają szeroki zakres aktywności enzymatycznych, z których wiele może potencjalnie wpływać na skład wina, a tym samym na jego właściwości organoleptyczne [6]. Największe znaczenie z punktu widzenia aromatu wina mają: glikozydazy, β-glukozydazy, esterazy, dekarboksylazy kwasów fenolowych i liazy cytrynianowe [23, 40, 41, 48, 82]. Wykazano, że na aktywność enzymatyczną glikozydazy *O. oeni* ma wpływ pH wina, zawartość etanolu i cukru resztkowego [42]. Stopień uwalniania związanych glikozydowo związków aromatycznych zależy nie tylko od rodzaju bakterii mlekowych, ale także od szczepu [44]. Podobne wyniki otrzymano w przypadku badań esterazy [61, 68], czy liazy cytrynianowej [69].

4. Podsumowanie

Zawartość związków lotnych i inne parametry enologiczne win zależą, poza czynnikami technologicznymi, od: gatunku drożdży (*S. cerevisiae*, różne gatunki inne niż *Saccharomyces)* i bakterii (*O. oeni*, nie-*O. oeni*), tego czy moszcz szczepiono tylko drożdżami *S. cerevisiae*, czy też drożdżami nie-*Saccharomyces* i *S. cerevisiae*, techniki szczepienia *S. cerevisiae* i *O. oeni* (jednoczesna, sekwencyjna), aktywności enzymatycznych drożdży i bakterii, a także interakcji między mikroorganizmami. Proponowane jest stosowanie rodzimych szczepów drożdży i bakterii mlekowych, wyselekcjonowanych spośród występujących w danym regionie, do produkcji win najwyższej jakości, posiadających typowe cechy związane z miejscem pochodzenia. Zastosowanie podczas fermentacji wina wybranych drożdży innych niż *Saccharomyces* wraz ze szczepem starterowym *S. cerevisiae* poprawia złożoność aromatyczną i charakterystyczne cechy win. Jednoczesne szczepienie moszczy/win drożdżami i bakteriami mlekowymi może być obiecującą alternatywą dla szczepienia sekwencyjnego, zwiększającą opłacalność produkcji win, poprzez skrócenie czasu winifikacji. Istnieje jednak potrzeba dalszych badań nad jednoczesnym szczepieniem w różnych warunkach winiarskich (temperatura, pH, zawartość SO_2, zawartość etanolu), zanim będzie zalecane jako praktyka enologiczna. W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie zdolnością przeprowadzania MLF przez inne rodzaje bakterii mlekowych, takie jak *Lactobacillus* i *Pediococcus* (do handlu wprowadzono kulturę starterową *L. plantarum* oraz kulturę będącą mieszanką *O. oeni* i *L. plantarum*). Jednak niewiele jest prac dotyczących tych bakterii, stąd konieczne są dalsze badania w tym kierunku. Drożdże i bakterie wykazują wiele aktywności enzymatycznych, które mogą poprawiać aromat win. Wpływ na aromat win mają również interakcje drożdże-drożdże i drożdże-bakterie.

Piśmiennictwo

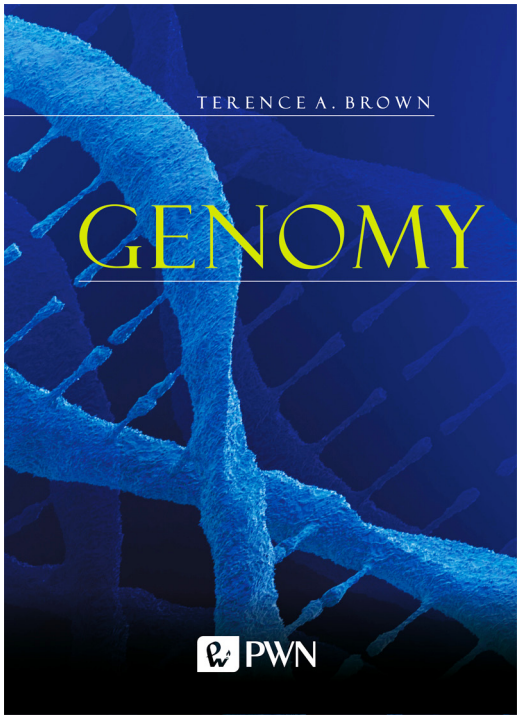
1. Abrahamse C.E., Bartowsky E.J.: Timing of malolactic fermentation inoculation in Shiraz grape must and wine: influence on chemical composition. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 255–265 (2012)
2. Anchor Oenology, http://www.oenobrands.com/en/our-innovation/mlf-starter-cultures (7.04.2020)
3. Antalick G., Perello M.C., de Revel G.: Co-inoculation with yeast and LAB under winery conditions: modification of the aromatic profile of Merlot wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **34**, 223–232 (2013)
4. Azzolini M., Fedrizzi B., Tosi E., Finato F., Vagnoli P., Scrinzi C., Zapparoli G.: Effects of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed cultures on fermentation and aroma of Amarone wine. *Eur. Food Res. Technol.* **235**, 303–313 (2012)
5. Azzolini M., Tosi E., Vagnoli P., Krieger S., Zapparoli G.: Evaluation of technological effects of yeast-bacterial co-inoculation in red table wine production. *Ital. J. Food Sci.* **3**, 257–263 (2010)
6. Bartowsky E.J., Borneman A.R.: Genomic variations of *Oenococcus oeni* strains and the potential to impact on malolactic fermentation and aroma compounds in wine. *Appl. Microbiol. Biot.* **92**, 441–447 (2011)
7. Bartowsky E.J., Costello P.J., Chambers P.J.: Emerging trends in the application of malolactic fermentation. *Aust. J. Grape Wine R.* **21**, 663–669 (2015)
8. Belda I., Ruiz J., Alastruey-Izquierdo A., Navascués E., Marquina D., Santos A.: Unraveling the enzymatic basis of wine "flavorome": a phylo-functional study of wine related yeast species. *Front Microbiol.* **7**, 12 (2016)
9. Belda I., Ruiz J., Esteban-Fernández A., Navascués E., Marquina D., Santos A., Moreno-Arribas M.: Microbial contribution to wine aroma and its intended use for wine quality improvement. *Molecules*, **22**, 189 (2017)
10. Belda I., Ruiz J., Navascués E., Marquina D., Santos A.: Improvement of aromatic thiol release through the selection of yeasts with increased β-lyase activity. *Int. J. Food Microbiol.* **225**, 1–8 (2016)
11. Benito S.: The impact of *Torulaspora delbrueckii* yeast in winemaking. *Appl. Microbiol. Biot.* **102**, 3081–3094 (2018)
12. Benito S.: The impacts of *Lachancea thermotolerans* yeast strains on winemaking. *Appl. Microbiol. Biot.* **102**, 6775–6790 (2018)
13. Benito S., Palomero F., Gálvez L., Morata A., Calderón F., Palmero D., Suárez-Lepe J.A.: Quality and composition of red wine fermented with *Schizosaccharomyces pombe* as sole fermentative yeast, and in mixed and sequential fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol. Biotech.* **52**, 376 (2014)
14. Betteridge A., Grbin P., Jiranek V.: Improving *Oenococcus oeni* to overcome challenges of wine malolactic fermentation. *Trends Biotechnol.* **33**, 547–553 (2015)
15. Blanco P., Mirás-Avalos J.M., Pereira E., Fornos D., Orriols I.: Modulation of chemical and sensory characteristics of red wine from Mencía by using indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains. *J. Int. Sci. Vigne Vin*. **48**, 63–74 (2014)
16. Bravo-Ferrada B.M., Hollmann A., Delfederico L., La Hens D.V., Caballero A., Semorile L.: Patagonian red wines: selection of

Lactobacillus plantarum isolates as potential starter cultures for malolactic fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 1537–1549 (2013)
17. Brizuela N.S., Bravo-Ferrada B.M., Pozo-Bayón M.Á., Semorile L., Tymczyszyn E.E.: Changes in the volatile profile of Pinot noir wines caused by Patagonian *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains. *Food Res. Int.* **106**, 22–28 (2018)
18. Callejon R.M., Clavijo A., Ortigueira P., Troncoso A.M., Paneque P., Morales M.L.: Volatile and sensory profile of organic red wines produced by different selected autochthonous and commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Anal. Chim. Acta*, **660**, 68–75 (2010)
19. Cañas P.M.I., Romero E.G., Pérez-Martín F., Seseña S., Palop M.L.: Sequential inoculation versus co-inoculation in Cabernet Franc wine fermentation. *Food Sci. Technol. Int.* **21**, 203–212 (2015)
20. Capece A., Siesto G., Romaniello R., Lagreca V.M., Pietrafesa R., Calabretti A., Romano P.: Assessment of competition in wine fermentation among wild *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Sangiovese grapes in Tuscany region. *LWT – Food Sci. Technol.* **54**, 485–492 (2013)
21. Capozzi V., Garofalo C., Chiriatti M.A., Grieco F., Spano G.: Microbial terroir and food innovation: the case of yeast biodiversity in wine. *Microbiol. Res.* **181**, 75–83 (2015)
22. Capozzi V., Russo P., Beneduce L., Weidmann S., Grieco F., Guzzo J., Spano G.: Technological properties of *Oenococcus oeni* strains isolated from typical southern Italian wines. *Lett. Appl. Microbiol.* **50**, 327–334 (2010)
23. Cappello M.S., Zapparoli G., Logrieco A., Bartowsky E.J.: Linking wine lactic acid bacteria diversity with wine aroma and flavour. *Int. J. Food Microbiol.* **243**, 16–27 (2017)
24. Ciani M., Comitini, F.: Non-*Saccharomyces* wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. *Ann. Microbiol.* **61**, 25–32 (2011)
25. Ciani M., Comitini F., Mannazzu I., Domizio P.: Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res.* **10**, 123–133 (2010)
26. Comitini F., Capece A., Ciani M., Romano P.: New insights on the use of wine yeasts. Curr. Opin. *Food Sci.* **13**, 44–49 (2017)
27. Costello P.J., Francis I.L., Bartowsky E.J.: Variations in the effect of malolactic fermentation on the chemical and sensory properties of Cabernet Sauvignon wine: Interactive influences of *Oenococcus oeni* strain and wine matrix composition. *Aust. J. Grape Wine R.* **18**, 287–301 (2012)
28. Du Toit M., Engelbrecht L., Lerm E., Krieger-Weber S.: *Lactobacillus*: the next generation of malolactic fermentation starter cultures – an overview. *Food Bioprocess Technol.* **4**, 876–906 (2011)
29. Englezos V., Rantsiou K., Cravero F., Torchio F., Giacosa S., Ortiz-Julien A., Gerbi V., Rolle L., Cocolin L.: Volatile profiles and chromatic characteristics of red wines produced with *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Res. Int.* **109**, 298–309 (2018)
30. Englezos V., Torchio F., Cravero F., Marengo F., Giacosa S., Gerbi V., Rantsiou K., Rolle L., Cocolin L.: Aroma profile and composition of Barbera wines obtained by mixed fermentations of *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) and *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT Food Sci. Technol.* **73**, 567–575 (2016)
31. Escribano-Viana R., González-Arenzana L., Portu J., Garijo P., López-Alfaro I., López R., Santamaría P., Gutiérrez A.R.: Wine aroma evolution throughout alcoholic fermentation sequentially inoculated with non-*Saccharomyces*/*Saccharomyces* yeasts. *Food Res. Int.* **112**, 17–24 (2018)
32. Franquès J., Araque I., El Khoury M., Lucas P.M., Reguant C., Bordons A.: Selection and characterization of autochthonous strains of *Oenococcus oeni* for vinification in Priorat (Catalonia, Spain). *OENO One*, **52,** 45–56 (2018)
33. Gammacurta M., Lytra G., Marchal A., Marchand S., Barbe J.C., Moine V., de Revel G.: Influence of lactic acid bacteria strains on ester concentrations in red wines: Specific impact on branched hydroxylated compounds. *Food Chem.* **239**, 252–259 (2018)
34. Gammacurta M., Marchand S., Albertin W., Moine V., de Revel G.: Impact of yeast strain on ester levels and fruity aroma persistence during aging of Bordeaux red wines. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 5378–5389 (2014)
35. García M., Esteve-Zarzoso B., Arroyo T.: Non-*Saccharomyces* yeasts: Biotechnological role for wine production (w) Grape and Wine Biotechnology, red. Morata A., Loira I., InTech, Rijeka, 2016, s. 249–272
36. Garofalo C., El Khoury M., Lucas P., Bely M., Russo P., Spano G., Capozzi V.: Autochthonous starter cultures and indigenous grape variety for regional wine production. *J. Appl. Microbiol.* **118**, 1395–1408 (2015)
37. González S.S., Gallo L., Climent M.D., Barrio E., Querol A.: Enological characterization of natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii*. *Int. J. Food Microbiol.* **116**, 11–18 (2007)
38. Gonzalez R., Morales P.: Wine secondary aroma: understanding yeast production of higher alcohols. *Microb. Biotechnol.* **10**, 1449–1450 (2017)
39. Grieco F., Tristezza M., Vetrano C., Bleve G., Panico E., Mita G., Logrieco A.: Exploitation of autochthonous micro-organism potential to enhance the quality of Apulian wines. *Ann. Microbiol.* **61**, 67–73 (2011)
40. Grimaldi A., Bartowsky E., Jiranek V.: Screening of *Lactobacillus* spp. and *Pediococcus* spp. for glycosidase activities that are important in oenology. *J. Appl. Microbiol.* **99**, 1061–1069 (2005)
41. Grimaldi A., Bartowsky E., Jiranek V.: A survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. *Int. J. Food Microbiol.* **105**, 233–244 (2005)
42. Grimaldi A., McLean H., Jiranek V.: Identification and partial characterization of glycosidic activity of commercial strains of the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *Am. J. Enol. Vitic.* **51**, 362–369 (2000)
43. Guzzon R., Villega T.R., Pedron M., Malacarne M., Nicolini G., Larcher R.: Simultaneous yeast-bacteria inoculum. A feasible solution for the management of oenological fermentation in red must with low nitrogen content. *Ann. Microbiol.* **63**, 805–808 (2013)
44. Hernandez-Orte P., Cersosimo M., Loscosa N., Cachoa J., Garcia-Moruno E., Ferreira V.: Aroma development from non--floral grape precursors by wine lactic acid bacteria. *Food Res. Int.* **42**, 773–778 (2009)
45. Hu K., Jin G.J., Xu Y.H., Tao Y.S.: Wine aroma response to different participation of selected *Hanseniaspora uvarum* in mixed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Res. Int.* **108**, 119–127 (2018)
46. Hu K., Qin Y., Tao Y.S., Zhu X.L., Peng C.T., Ullah N.: Potential of glycosidase from non-*Saccharomyces* isolates for enhancement of wine aroma. *J. Food Sci.* **81**, M935–M943 (2016)
47. Hu K., Zhu X.L., Mu H., Ma Y., Ullah N., Tao Y.S.: A novel extracellular glycosidase activity from *Rhodotorula mucilaginosa*: its application potential in wine aroma enhancement. *Lett. Appl. Microbiol.* **62**, 169–176 (2016)
48. Iorizzo M., Testa B., Lombardi S.J., García-Ruiz A., Muñoz-González C., Bartolomé B., Moreno-Arribas M.V.: Selection

and technological potential of *Lactobacillus plantarum* bacteria suitable for wine malolactic fermentation and grape aroma release. *LWT-Food Sci. Technol.* **73**, 557–566 (2016)
49. Ivanova Petropulos V., Bogeva E., Stafilov T., Stefova M., Siegmund B., Pabi N., Lankmayr E.: Study of the influence of maceration time and oenological practices on the aroma profile of Vranec wines. *Food Chem.* **165**, 506–514 (2014)
50. Izquierdo Cañas P.M., Pérez-Martín F., Romero E.G., Prieto S.S., Herreros M.D.L.L.P.: Influence of inoculation time of an autochthonous selected malolactic bacterium on volatile and sensory profile of Tempranillo and Merlot wines. *Int. J. Food Microbiol.* **156**, 245–254 (2012)
51. Juega M., Costantini A., Bonello F., Cravero M.C., Martinez--Rodriguez A.J., Carrascosa A.V., Garcia-Moruno E.: Effect of malolactic fermentation by *Pediococcus damnosus* on thecomposition and sensory profile of Albarino and Caino whitewines. *J. Appl. Microbiol.* **116**, 586–595 (2013)
52. Lambrechts M.G., Pretorius I.S.: Yeast and its importance to wine aroma – A Review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **21**, 97–127 (2000)
53. Lasik M.: The application of malolactic fermentation process to create good-quality grape wine produced in cool-climate countries: a review. *Eur. Food Res. Technol.* **237**, 843–850 (2013)
54. Lerm E., Engelbrecht L., du Toit M.: Selection and characterisation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* South African wine isolates for use as malolactic fermentation starter cultures. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **32**, 280–295 (2011)
55. Liu J., Arneborg N., Toldam-Andersen T.B., Petersen M.A., Bredie W.L.: Effect of sequential fermentations and grape cultivars on volatile compounds and sensory profiles of Danish wines. *J. Sci. Food Agric.* **97**, 3594–3602 (2017)
56. Liu P.T., Lu L., Duan C.Q., Yan G.L.: The contribution of indigenous non-*Saccharomyces* wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet Sauvignon wines by spontaneous fermentation. *LWT-Food Sci. Technol.* **71**, 356–363 (2016)
57. Liu N., Qin Y., Song Y., Ye D., Yuan W., Pei Y., Xue B., Liu Y.: Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains in Shanshan County (Xinjiang, China) for winemaking and their aroma-producing characteristics. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 1781–1792 (2015)
58. Loira I., Vejarano R., Bañuelos M.A., Morata A., Tesfaye W., Uthurry C., Villa A., Cintora I., Suárez-Lepe J.A.: Influence of sequential fermentation with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality. *LWT-Food Sci. Technol.* **59**, 915–922 (2014)
59. López R., López-Alfaro I., Gutiérrez A.R., Tenorio C., Garijo P., González-Arenzana L., Santamaría P.: Malolactic fermentation of Tempranillo wine: contribution of the lactic acid bacteria inoculation to sensory quality and chemical composition. *Int. J. Food Sci. Tech.* **46**, 2373–2381 (2011)
60. Malherbe S., Tredoux A.G., Nieuwoudt H.H., du Toit M.: Comparative metabolic profiling to investigate the contribution of *O. oeni* MLF starter cultures to red wine composition. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **39**, 477–494 (2012)
61. Matthews A., Grbin P., Jiranek V.: Biochemical characterisation of the esterase activities of wine lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**, 329–337 (2007)
62. Muñoz V., Beccaria B., Abreo E.: Simultaneous and successive inoculations of yeasts and lactic acid bacteria on the fermentation of an unsulfited Tannat grape must. *Braz. J. Microbiol.* **45**, 59–66 (2014)
63. Nikolaou E., Soufleros E.H., Bouloumpasi E., Tzanetakis N.: Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results. *Food Microbiol.* **23**, 205–211 (2006)
64. Nisiotou A., Sgouros G., Mallouchos A., Nisiotis C.S., Michaelidis C., Tassou C., Banilas G.: The use of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* and *Starmerella bacillaris* strains as a tool to create chemical complexity in local wines. *Food Res. Int.* **111**, 498–508 (2018)
65. Noguerol-Pato R., González-Barreiro C., Cancho-Grande B., Simal-Gándara J.: Quantitative determination and characterization of the main odourants of Mencía monovarietal red wines. *Food Chem.* **117**, 473–484 (2009)
66. Pérez-Torrado R., Barrio E., Querol A.: Alternative yeasts for winemaking: *Saccharomyces* non-*cerevisiae* and its hybrids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **58**, 1780–1790 (2018)
67. Pérez-Torrado R., González S.S., Combina M., Barrio E., Querol A.: Molecular and enological characterization of a natural *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* hybrid. *Int. J. Food Microbiol.* **204**, 101–110 (2015)
68. Pérez-Martín F., Seseña S., Izquierdo P.M., Palop M.L.: Esterase activity of lactic acid bacteria isolated from malolactic fermentation of red wines. *Int. J. Food Microbiol.* **163**, 153–158 (2013)
69. Pretorius N., Engelbrecht L., du Toit M.: Influence of sugars and pH on the citrate metabolism of different lactic acid bacteria strains in a synthetic wine matrix. *J. Appl. Microbiol.* **127**, 1490–1500 (2019)
70. Regodón J.A., Pére F., Valdés M.E., De Miguel C., Ramırez M.: A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains. *Food Microbiol.* **14**, 247–254 (1997)
71. Ruiz P., Izquierdo P.M., Seseña S., García E., Palop M.L.: Malolactic fermentation and secondary metabolite production by *Oenoccocus oeni* strains in low pH wines. *J. Food Sci.* **77**, M579–M585 (2012)
72. Ruiz P., Izquierdo P.M., Seseña S., Palop M.L.: Selection of autochthonous *Oenococcus oeni* strains according to their oenological properties and vinification results. *Int. J. Food Microbiol.* **137**, 230–235 (2010)
73. Stój A., Czernecki T., Domagała D., Targoński Z.: Comparative characterization of volatile profiles of French, Italian, Spanish, and Polish red wines using headspace solid-phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry. *Int. J. Food Prop.* **20**, S830–S845 (2017)
74. Strickland M.T.: Effects of *Pediococcus* spp. on Oregon Pinot noir, Master of Science in food science and technology thesis. Oregon State University, Corvallis, 2012
75. Styger G., Prior B., Bauer F.F.: Wine flavor and aroma. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **38**, 1145–1159 (2011)
76. Sumby K.M., Grbin P.R., Jiranek V.: Implications of new research and technologies for malolactic fermentation in wine. *Appl. Microbiol. Biot.* **98**, 8111–8132 (2014)
77. Swiegers J.H., Bartowsky E.J., Henschke P.A., Pretorius I.: Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine R.* **11**, 139–173 (2005)
78. Tempère S., Marchal A., Barbe J. C., Bely M., Masneuf--Pomarede I., Marullo P., Albertin W.: The complexity of wine: clarifying the role of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biot.* **102**, 3995–4007 (2018)
79. Tristezza M., di Feo L., Tufariello M., Grieco F., Capozzi V., Spano G., Mita G.: Simultaneous inoculation of yeasts and lactic acid bacteria: Effects on fermentation dynamics and chemical composition of Negroamaro wine. *LWT – Food Sci. Technol.* **66**, 406–412 (2016)
80. Tufariello M., Capone S., Siciliano P.: Volatile components of Negroamaro red wines produced in Apulian Salento area. *Food Chem.* **132**, 2155–2164 (2012)
81. Tufariello M., Chiriatti M.A., Grieco F., Perrotta C., Capone S., Rampino P., Tristezza M., Mita G., Grieco F.: Influence of autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains on volatile

profile of Negroamaro wines. *LWT – Food Sci. Technol.* **58**, 35–48 (2014)
82. Ugliano M., Moio L.: The influence of malolactic fermentation and *Oenococcus oeni* strain on glycosidic aroma precursors and related volatile compounds of red wine. *J. Sci. Food Agric.* **86**, 2468–2476 (2006)
83. Varela C.: The impact of non-*Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages. *Appl. Microbiol. Biot.* **100**, 9861–9874 (2016)
84. Varela C., Barker A., Tran T., Borneman A., Curtin C.: Sensory profile and volatile aroma composition of reduced alcohol Merlot wines fermented with *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. *Int. J. Food Microbiol.* **252**, 1–9 (2017)
85. Varela C., Sengler F., Solomon M., Curtin C.: Volatile flavour profile of reduced alcohol wines fermented with the non-conventional yeast species *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. *Food Chem.* **209**, 57–64 (2016)
86. Wade M.E., Strickland M.T., Osborne J.P., Edwards C.G.: Role of *Pediococcus* in winemaking. *Aust. J. Grape Wine R.* **25**, 7–24 (2018)
87. Whitener M.E.B., Stanstrup J., Carlin S., Divol B., du Toit M., Vrhovsek U.: Effect of non-*Saccharomyces* yeasts on the volatile chemical profile of Shiraz wine. *Aust. J. Grape Wine R.* **23**, 179–192 (2017)
88. Zhu F., Du B., Li, J.: Aroma compounds in wine (w) Grape and wine biotechnology, red. Morata A., Loira I., InTech, Rijeka, 2016, s. 273–284

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2020, 59, 2, 179–180



Autor: **Terence A. Brown**
Tytuł: **Genomy**
Redaktor PWN: **Joanna Forysiak**
Projektant okładki: **Lidia Michalak**

Wydawnictwo naukowe PWN S.A.
Warszawa, 2020
ISBN 978-83-01-20802-2

Recenzowana pozycja to już czwarte wydanie podręcznika Genomy. Od poprzedniego wydania minęło już 13 lat, co w naukach omicznych jest niemalże epoką, także był to już najwyższy czas na aktualizację przedstawionych w poprzednim wydaniu danych. Prezentowana książka jest podręcznikiem akademickim przeznaczonym głównie dla studentów kierunków biologicznych i biotechnologicznych uczelni, ale sądzę, że również studenci innych kierunków mogą znaleźć w niej wiele przydatnych informacji. Pierwsze dwa rozdziały zawierają dużo informacji podstawowych z zakresu genetyki klasycznej, molekularnej oraz podstaw badania genomów. Jest to niewątpliwie bardzo dobre wprowadzenie do bardziej zaawansowanych koncepcji genomiki. Takie znajdziemy już w kolejnych rozdziałach, które dotyczą budowy i funkcjonowania genomów, a także ewolucji genomów. Jest to bardzo kompletne kompendium wiedzy z zakresu genomiki, autor Terence A. Brown wykonał znakomitą pracę. Również należy docenić pracę zespołu tłumaczy z Instytutu Genetyki i Biotechnologii Uniwersytetu Warszawskiego pod redakcją Profesora Piotra Węgleńskiego, książkę bardzo dobrze się czyta. Opracowanie jest niezwykle przystępne, zawiera mnóstwo elementów bardzo pomocnych w nauce. Podręcznik zawiera: indeks, słowniczek pojęć, a każdy rozdział jest zakończony bardzo dobrym podsumowaniem oraz pytaniami sprawdzającymi nasza wiedzę. Piśmiennictwo zostało pogrupowane tematycznie, co ułatwia wyszukiwanie literatury uzupełniającej w interesującym czytelnika zakresie. Książka jest niezwykle bogato ilustrowana, można by nawet rzec że jest przerysowana. Strony książki posiadają specjalnie zostawione wolne miejsce na ryciny i opisy, oprócz tego zazwyczaj miejsce głównego tekstu również zajmują ilustracje. Niewątpliwie ułatwiają one zrozumienie tekstu, choć czasem niewiele wyjaśniają. Trzeba przyznać że jest to znany i trudny do rozwiązania problem przedstawiania danych omicznych, do dobrego zrozumienia których potrzebne są komputerowe, interaktywne bazy danych. Niektóre ryciny są z pewnością zbędne, przykładowo zdjęcie pandy umiejscowione przy opisie genomu tego niewątpliwie sympatycznego zwierzęcia, raczej nie wnosi zbyt wiele do treści.

Nie zmienia to faktu, że jest to doskonały podręcznik i źródło wiedzy z tej bardzo szerokiej dziedziny wiedzy. Jestem więc przekonany, że podręcznik z całą pewnością umożliwia poznanie zarówno podstawowych pojęć, jak i zdobycie obszernej wiedzy z dziedziny genomiki. Gorąco polecam!

Radosław Stachowiak

Autorzy: **Mieczysław Kazimierz Błaszczyk, Agata Goryluk-Salmonowicz**
Tytuł: **Przemysłowe wykorzystanie mikroorganizmów**
Redaktor PWN: **Mieczysława Kompanowska**
Projektant okładki: **Lidia Michalak**

Wydawnictwo naukowe PWN S.A.
Warszawa, 2020
ISBN 978-83-01-21021-2

Na początku zeszłego roku mieliśmy przyjemność recenzować książkę Prof. Mieczysława Błaszczyka dotyczącą biologicznych aspektów oczyszczania ścieków. W tym roku, również za sprawą wydawnictwa PWN, ukazał się podręcznik autorstwa Profesora oraz Doktor Agaty Goryluk-Salmonowicz przedstawiający całość zagadnień związanych z mikrobiologią przemysłową.

Autorzy przedstawiają krótką historię przemysłowego zastosowania mikroorganizmów oraz charakterystykę najczęściej wykorzystywanych mikroorganizmów, metody ich hodowli oraz ulepszania. Są one określane przez Autorów anglojęzycznym terminem „workhorse". Rozumiem prostotę takiego rozwiązania, jednak w opracowaniach polskojęzycznych stosowanie nieprzetłumaczonych zwrotów powinno być ograniczone do minimum. W kolejnych rozdziałach Autorzy opisują zastosowania mikroorganizmów w przemyśle, rozpoczynając od enzymów poprzez produkcję napojów alkoholowych do wytwarzania rozpuszczalników i kwasów organicznych. W podręczniku znajdziemy opis produkcji niekwestionowanych fundamentów globalnego rynku biotechnologicznego, takich jak: aminokwasy, antybiotyki oraz witaminy, a także mniej znane ale rosnące na znaczeniu pigmenty i polimery. Nie znajdziemy w omawianym podręczniku rozdziałów związanych z biotechnologią środowiskową, co jest w pełni zrozumiałe, biorąc pod uwagę kompleksowe opisanie tych zagadnień w poprzednim opracowaniu.

Autorzy podjęli się bardzo trudnego zadania, jakim jest opisanie bardzo rozlicznych tematów, bez wsparcia większego zespołu autorskiego, za co należy im się uznanie. Niestety, nie ustrzegli się w związku z tym drobnych błędów. Wydaje się, że w dzisiejszych czasach najlepszym rozwiązaniem jest powołanie zespołu redakcyjnego i opracowanie poszczególnych rozdziałów przez specjalistów w danej dziedzinie. Całość opracowania nie budzi jednak żadnych zastrzeżeń, jest to bardzo cenny podręcznik akademicki przeznaczony dla studentów kierunków biologicznych i biotechnologicznych, którzy z pewnością docenią przystępne i przeglądowe ujęcie omówionych zagadnień.

Bardzo się cieszę, że recenzowany podręcznik właśnie się ukazał, gdyż niewiele jest naszym rynku wydawniczym książek poświęconych tematyce mikrobiologii przemysłowej, szczególnie poruszających tak wiele rozmaitych zagadnień. Polecamy podręcznik jako niezwykle przystępne i bogate źródło informacji o wykorzystaniu mikroorganizmów w biotechnologii.

Radosław Stachowiak

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2020, 59, 2, 181–187

INFORMACJE Z POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW

Od ostatniej informacji o działalności Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, zamieszczonej w zeszytach nr 1 z 2020 r. kwartalników *Advancements of Microbiology – Postępy Mikrobiologii* i *Polish Journal of Microbiology*, ZG PTM zajmował się następującymi sprawami:

I. Zgodnie ze Statutem PTM raz w roku odbywa się zebranie członków ZG PTM, które było planowane na 30.03.2020 r. w Warszawie. Jednakże ze względu na panującą pandemię COVID-19 zdecydowano się na przeprowadzenie Zebrania ZG PTM w formie elektronicznej. Ankietę z pytaniem dotyczącym tej formy Zebrania dostarczono e-mailowo do członków ZG PTM. Wszyscy wyrazili zgodę na zaproponowaną formę zebrania. W **Uchwale 8-2020** z dnia 13.03.2020 r. podjęto decyzję w tej sprawie.
Odbyło się pierwsze w historii PTM zebranie internetowe Zarządu Głównego PTM. Przygotowane materiały w postaci plików zostały rozesłane w 19 e-mailach do wszystkich członków ZG PTM w piątek 27.03.2020. Przyjęcie Uchwał ustalono na dzień 30.03.2020 r. Podczas Zebrania ZG PTM w formie elektronicznej poruszano następujące zagadnienia:

1. Przedstawiono informację o działalności Prezydium PTM od 25.03.2019 r. do 27.03.2020 r.
Podjęto **Uchwałę 9-2020** w sprawie akceptacji działalności Prezydium ZG PTM za oceniany okres.

2. Przedstawiono informację o Konkursie o Nagrodę Naukową Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów im. prof. Edmunda Mikulaszka, edycja 2020. Tylko dwie osoby zgłosiły się do Konkursu: Pani mgr Karolina Furtak z Zakładu Mikrobiologii Rolniczej Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa Państwowy Instytut Badawczy z Puław, która zgłosiła cykl trzech publikacji oraz Pan dr inż. Łukasz Łopusiewicz z Centrum Bioimmobilizacji i Innowacyjnych Materiałów Opatrunkowych Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, który zgłosił jedną publikację. Materiały dotarły do Komisji powołanej pod przewodnictwem Pani prof. dr hab. Stefanii Giedrys-Kalemby. Zgodnie z Uchwałą 4-2020 Komisja do dnia 30.04.2020 powinna przedstawić wyniki konkursu. Szkoda, że konkurs cieszy się tak małym zainteresowaniem młodych adeptów nauki. Może mieć na to wpływ opracowany nowy Regulamin konkursu, w którym zastrzeżone jest, że konkurs dotyczy tylko członków PTM – to są nasze środki finansowe. Celowe byłoby informowanie na Zebraniach Oddziałów o Konkursie i nagrodach.

3. Podjęto **Uchwałę 10-2020** w sprawie uporządkowania listy członków zwyczajnych PTM i usunięcia z niej osób niepłacących składek członkowskich w statutowo przewidzianym terminie. W porównaniu z ubiegłym rokiem podobna jest liczba osób nieopłacających składki członkowskiej za rok 2019 r. (w 2018 r. z PTM usunięto 78 osób), pomimo przypominania o tym podstawowym obowiązku członka PTM przez OT PTM w styczniu 2020 r. i następnie dwukrotnie przez sekretariat ZG PTM w lutym i marcu b.r. Imienne listy osób usuwanych z poszczególnych Oddziałów zestawiono w załączniku do Uchwały 10-2020.

4. Podjęto **Uchwałę 11-2020** w sprawie przyjęcia nowych członków zwyczajnych. Zebrała się grupa 53 osób chętnych do przystąpienia do PTM, duża część to kandydaci do nowego Oddziału Terenowego PTM w Rzeszowie.

5. Spotykamy się z sytuacją, że osoby zaakceptowane Uchwałami PTM jako członkowie zwyczajni nie opłacają pierwszej składki członkowskiej, pomimo wyraźnej informacji, że trzeba spełnić oba warunki, aby być przyjętym do PTM. Przyjęto **Uchwałę 12-2020**, w której określono, że **deklaracja członka zwyczajnego**, zaakceptowana Uchwałą ZG PTM, której nie będzie towarzyszyć opłata składki członkowskiej wniesionej w ciągu 6 miesięcy od daty tej Uchwały, o której zawiadamiany jest kandydat na członka, **zostanie usunięta z archiwum PTM, a decyzja ZG PTM o akceptacji przyjęcia członka do PTM anulowana**. Osoba zostanie o tym fakcie poinformowana drogą elektroniczną. Wprowadzony zostanie odpowiedni zapis w formularzu.

6. Zgodnie z uchwalonym Regulaminem wydatkowania i rozliczania środków pieniężnych przez Oddziały Terenowe PTM, została przekazana informacja o udostępnianiu Oddziałom Terenowym PTM od stycznia 2019 r., na pokrycie kosztów prowadzenia działalności statutowej przez ten Oddział, 10% kwoty uzyskanej z tytułu składek członkowskich oraz 50% kwoty uzyskanej z tytułu pozyskania sponsora, Członka Wspierającego PTM, darowizny, lub innej dodatkowej kwoty, na rzecz PTM, przez dany Oddział. Przedstawiono Tabelę dotyczącą liczby członków w Oddziałach oraz Tabelę przyznanych Oddziałom środków finansowych w 2020 r. oraz w roku poprzednim.
Jednocześnie zauważamy pojawiający się problem kumulacji środków niewykorzystywanych przez Oddziały. Musimy tę sprawę uregulować, ponieważ za kilka lat może pojawić się problem, że w jednym roku kilka Oddziałów będzie chciało wykorzystać swoje nagromadzone fundusze, a wtedy budżet PTM tego może nie udźwignąć. Poprosiliśmy wszystkich członków ZG PTM o zastanowienie się nad rozwiązaniem tego problemu, przekazaniem swoich uwag i ewentualne propozycje aneksu do Regulaminu. Sprawa ta powinna zostać uregulowana w najbliższym czasie.

7. Przekazano informację o stanie finansowym PTM. Załączono bilans PTM za 2019 r. przygotowany przez Panią księgową PTM oraz Uchwałę Głównej Komisji Rewizyjnej (GKR) o zatwierdzeniu sprawozdania finansowego PTM za okres 2019 r. Sytuacja finansowa Towarzystwa jest stabilna.

8. Zgodnie ze Statutem PTM Główna Komisja Rewizyjna PTM powinna działać na podstawie swojego Regulaminu. Regulaminu takiego nie było. Członkowie GKR PTM opracowali roboczą wersję Regulaminu działalności GKR, tekst został oceniony przez członków Prezydium PTM oraz Kancelarię Prawną. **Uchwałą 13-2020** ZG PTM zaakceptował Regulaminu GKR do stosowania od 2020 r. Ostateczne zatwierdzenie Regulaminu GKR odbędzie się na Walnym Zgromadzeniu Delegatów PTM podczas XXIX Zjazdu PTM.

9. Dosyć bolesna dla Towarzystwa jest sprawa likwidacji Oddziału Terenowego PTM w Puławach. Liczba członków w Oddziale znacząco spadła, Zarząd Oddziału nie jest kompletny. Pan prof. Grzegorz Woźniakowski Przewodniczący Oddziału PTM w Puławach nie widzi możliwości funkcjonowania Oddziału zgodnie ze Statutem PTM i przekazał pismo, z prośbą o likwidację Oddziału. Członkowie Oddziału w Puławach, zgodnie z pismem Zarządu OT PTM, zostaną włączeni do Oddziału w Lublinie.
Podjęto **Uchwałę 14-2020** o rozwiązaniu Oddziału Terenowego w Puławach.

10. Mamy także bardzo pozytywną informację. Pan dr Mariusz Worek z Klinicznego Szpitala Wojewódzkiego Nr 1 im. Fryderyka Chopina w Rzeszowie, Podkarpackie Centrum Chorób Płuc, Kliniczny Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Regionalne Referencyjne Laboratorium Prątka Gruźlicy w województwie podkarpackim, zwrócił się do ZG PTM z prośbą o powołanie Oddziału Terenowego PTM w Rzeszowie. Pan doktor przekazał deklaracje członkowskie około 50 osób, które wyraziły chęć przystąpienia do nowego Oddziału Terenowego PTM. Z bardzo dużym zadowoleniem witamy tą cenną inicjatywę i życzymy powodzenia i sukcesów w działalności nowego Oddziału Terenowego PTM w Rzeszowie. Przyjęto **Uchwałę 15-2020** o powołaniu Oddziału Terenowego PTM w Rzeszowie.

11. Przedstawiono sprawozdania Zarządów Oddziałów Terenowych za okres od 25.03.2019 r. do 27.03.2020 r. oraz informacje o czynionych staraniach w celu pozyskania środków finansowych na XXIX Zjazd PTM, a także o planach Oddziałów na przyszłość.

12. Przedstawiono sprawę organizacji XXIX Zjazdu PTM w Warszawie, 15–18 wrzesień 2020 r. Została otwarta strona Zjazdu: www.zjazdptm2020.pl. Uruchomiony został również system rejestracyjny i system zgłaszania wykładów, doniesień ustnych, plakatów. Utworzono plan ramowy Zjazdu i określono sesje tematyczne z przyporządkowanymi osobami odpowiedzialnymi za organizacje tych sesji. Wszyscy członkowie ZG PTM oraz kilka osób zaproszonych, członków PTM, będzie pełniło funkcje przewodniczących i wiceprzewodniczących Sesji. Oczekujemy aktywnego włączenia się Oddziałów zarówno w organizacje Sesji, jak i poszukiwanie sponsorów i wystawców na Zjazd. Planujemy wykładowców do sesji plenarnych, którymi chcielibyśmy, aby byli Członkowie Honorowi PTM oraz laureaci dwóch konkursów o Nagrodę Naukową Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów im. prof. Edmunda Mikulaszka, edycje 2018 i 2020. Zwracamy uwagę na fakt, że Ogólnopolski Zjazd PTM jest organizowany co 4 lata i jest to największe wydarzenie w tym okresie związane z mikrobiologią. Obecny Zjazd organizowany jest po raz pierwszy przez członków ZG PTM i wszyscy powinni być zaangażowani w to wydarzenie. Prosimy się zastanowić, nad ewentualnymi kandydatami na nowych Członków Honorowych PTM. Najlepiej aby kandydatury członków PTM zasłużonych dla mikrobiologii i naszego Towarzystwa ustalić przed Zjazdem. Można będzie wtedy przy-

gotować dyplomy i wręczyć je na Zjeździe. Na razie zakładamy, że nasz Zjazd odbędzie się w określonym miejscu i terminie, dlatego też działamy przy jego organizacji. Nie wiemy jednak jak rozwinie się pandemia COVID-19 i czy Zjazd się odbędzie. Wiele osób zwłaszcza diagnostów laboratoryjnych i osób pracujących w laboratoriach medycznych zaangażowanych jest obecnie w walkę z koronawirusem SARS-CoV-2 i nie ma czasu, aby zajmować się Zjazdem – prowadzić badania, przygotowywać streszczenia zjazdowe. Mamy też poważne trudności z pozyskaniem środków finansowych na Zjazd, bo wiele firm walczy o przetrwanie w tym trudnym dla siebie okresie.
Bierzemy pod uwagę możliwość przełożenia Zjazdu na wrzesień 2021 r., a także odpowiednie przedłużenie kadencji obecnych władz PTM zarówno ZG jak i Oddziałów oraz kadencji wybranych Delegatów PTM na WZD PTM.
Rzeczywistość przekroczyła nasze wyobrażenie jakie mieliśmy przygotowując Statut PTM i nie przewidziano takiej nadzwyczajnej sytuacji jak pandemia COVID-19.
Będziemy Państwa informować o ewentualnej decyzji o przesunięciu daty organizacji Ogólnopolskiego XXIX Zjazdu PTM.

13. Przekazano informacje z FEMS i IUMS. Federacja FEMS przyznała dofinansowanie do: XXIX Zjazdu PTM 2020 w wysokości 3 000 Euro oraz do I Polish Yeast Conference w wysokości 2 000 Euro. Ponadto FEMS przyznała granty na realizację projektów

* „Siderophores and biosurfactants produced by Antarctic psychrotolerant bacteria as new bioproducts for cold-active biotechnologies – identification and characterisation of novel secondary metabolites" złożonego przez Pana Michała Styczyńskiego z Wydziału Biologii UW;
* „Susceptibility profiling of Mycobacterium tuberculosis isolates from Poland and Lithuania", złożonego przez Panią Zofię Bakułę z Wydziału Biologii UW.
  W przyszłym roku FEMS organizuje 9th Congress of European Microbiologists w dniach 11–15 lipca 2021 w Hamburgu, Niemcy (https://fems2021.org/).
* Federacja IUMS organizuje kongres IUMS w dniach 12–16 października 2020 r. w Daejon w Korei Południowej (https://www.iums2020.org/).

14. Omówiono sprawę nadawania punktów edukacyjnych na zebraniach Oddziałów PTM w stanowisku Komisji PTM, do określania zasad przyznawania punktów edukacyjnych za uczestnictwo w zebraniach i seminariach organizowanych przez Oddziały PTM, powołanej Uchwałą 10-2019. Polskie Towarzystwo Mikrobiologów, jako Towarzystwo Naukowe, zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 24 lipca 2017, może przyznać diagnostom laboratoryjnym za udział w spotkaniach naukowo-szkoleniowych co najwyżej 2 miękkie punkty edukacyjne, za wygłoszenie wykładu – 10 punktów edukacyjnych (miękkich). Możliwość przyznania tzw. punktów twardych za udział w spotkaniach organizowanych przez Towarzystwo wymaga nawiązania współpracy PTM z akredytowanymi jednostkami szkolącymi oraz poniesienia przez diagnostów laboratoryjnych dodatkowych kosztów wskazanych przez te jednostki. Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów sposób przydzielania punktów edukacyjnych pozostawia w gestii Oddziałów Terenowych.

15. Na zeszłorocznym zebraniu ZG PTM przedstawiono sprawę nieetycznego postępowania, członka zwyczajnego PTM, samodzielnego pracownika nauki i nauczyciela akademickiego, kierownika Zakładu na Warszawskim Uniwersytecie Medycznym, polegającego na przepisywaniu materiałów z 11 prac magisterskich do 21 publikacji współautorstwa opiekunki tych prac magisterskich, bez jakiegokolwiek zaznaczenia udziału magistranta w publikacjach. Najwyższa rangą w naszym kraju Komisja ds. Etyki w Nauce PAN, uznała takie postępowanie za niedopuszczalne i naganne. **Zgodnie z zapisem w Statucie PTM par. 15, ust. 1, p. 4 , za „czyny nie licujące z godnością członka Towarzystwa" można wykluczyć członka PTM z Towarzystwa.** Po dyskusji na ubiegłorocznym zebraniu ZG PTM, zdecydowano, aby wobec braku Komisji Dyscyplinarnej w Statucie PTM, powołać Uchwałą 12-2019 specjalną Komisję ds. etyki członków PTM, która będzie wydawała opinie do podejmowanych Uchwał przez ZG PTM w zgłaszanych sprawach. Z Komisji został wyłoniony zespół do oceny obecnej sprawy, który pod przewodnictwem Pani prof. dr hab. Stefanii Giedrys-Kalemby ze Szczecina przygotował opinię w oparciu o dostarczone materiały. Na podstawie przygotowanej opinii Komisji ds. etyki członków PTM oraz 13 załączników w tym opinii prawnej, **Uchwałą 16-2020** wykluczono członka zwyczajnego Oddziału Terenowego PTM w Warszawie z Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów **za czyny nie licujące z godnością członka Towarzystwa**".
Skala nieetycznego postępowania pracownika naukowego i nauczyciela akademickiego, członka PTM, jak i podjęta Uchwała 16-2020 mają charakter bezprecedensowy.

16. Sprawa zmiany sekretarki w biurze ZG PTM. Ze względu na zaawansowaną już ciążę i zwolnienie lekarskie Pani Karoliny Pawłowskiej, dotychczasowej sekretarki biura PTM, zaproponowano, aby od kwietnia br. obowiązki sekretarki przejęła Pani Monika Kucharska, która już pełniła tę funkcje na początku naszej kadencji w latach 2016–2017. Przyjęto **Uchwałę 17-2020** w tej sprawie.

17. Przedstawiono pomysł Przewodniczącego Zarządu Oddziału PTM w Warszawie dotyczący tworzenia logotypów i osobnych stron internetowych Oddziałów Terenowych PTM. Zbieramy opinie w tej sprawie.

18. Zamieszczono informacje Redakcji o wydawanych czasopismach PTM – *Advancements of Microbiology – Postępy Mikrobiologii* i *Polish Journal of Microbiology.*
Prosiliśmy o zastanowienie się członków ZG PTM nad kierunkiem rozwoju i sposobem wydawania kwartalnika PTM *Postępy Mikrobiologii* w przyszłości i przedstawienie swoich opinii.

Naświetlenie sytuacji

Jak informowano na zebraniach ZG PTM w 2017 i 2018 r., a także w 2019 r., wydawanie czasopism PM i PJM przynosi Towarzystwu istotne straty finansowe.
Aby temu zaradzić w pierwszym etapie zdecydowano znacznie ograniczyć wydawanie papierowej edycji zeszytów czasopism oraz ich wysyłkę do członków PTM.
W drugim etapie rozważano możliwości upublicznienia i umiędzynarodowienia obu czasopism, co miało zaowocować zwiększeniem cytowalności (przez autorów zagranicznych), tym samym zwiększeniem wartości współczynników IF i MNiSW (opartych na cytowalności), a w końcowym efekcie możliwości podniesienia opłat za publikacje artykułów w czasopismach, tak aby osiągnąć samofinansowanie się czasopism. Ta polityka wydaje się sprawdzać w przypadku czasopisma PJM.
Poczynając od 2017 r. gdy wygasła umowa z firmą wydawniczą Index Copernicus, członkowie Prezydium ZG PTM z Warszawy wraz z członkami redakcji PM i PJM starali się wypracować optymalne rozwiązanie dla poprawienia sytuacji finansowej czasopism. W ciągu dwóch lat nastąpiły zmiany członków redakcji PJM. Obecnie w celu ograniczenia kosztów redakcja PJM pracuje w dwu osobowym składzie. Nawiązano kontakt z firmą Exeley z Nowego Jorku, która obiecywała duże wsparcie w wydawaniu i upublicznianiu czasopism, co miało podnieść ich pozycje w rankingach. Podpisano umowy trzyletnie dotyczące wydawania PJM od 2018 r. oraz wydawania PM od 2019 r. na platformie Exeley. Wdrożenie nowej formy wydawniczej wiązało się z bardzo dużą pracą zespołów redakcyjnych. Zwłaszcza opanowanie systemu wydawniczego Editorial Manager i przygotowanie go do obecnej funkcjonalności przez dwu osobowy zespół PJM, wymagało dużego zaangażowania i czasu. Również współpraca z firmą Exeley nie jest idealna i nie spełniła wszystkich naszych oczekiwań.
Towarzystwo realizując zamiar podniesienia rangi czasopism wydawanych przez PTM wystąpiło w 2017 r. do MNiSW z wnioskiem o dofinansowanie wydawania obydwu czasopism i tłumaczenia artykułów na język angielski w PM. Otrzymaliśmy dwuletnie dofinansowanie (2018–2019), które skończyło się w ubiegłym roku, ale zaowocowało wydaniem kilku zeszytów PM w dwóch wersjach językowych polskiej i angielskiej. Skorygowano tytuł PM, tak aby był rozpoznawalny za granicą – *Advancements of Microbiology.* Było to spowodowane przekonaniem, że żaden autor zagraniczny nie będzie wysyłał manuskryptu do czasopisma o polskim tytule. Rozpropagowywano informacje o możliwości publikowania artykułów przez autorów zagranicznych w PM, a także starano się pozyskiwać recenzentów zagranicznych. Taki proces jest długotrwały, zanim zacznie przynosić efekty. Jak podaje Redakcja PM dopiero teraz zaczęły docierać artykuły zagranicznych autorów. Zróżnicowano opłaty za publikowanie manuskryptów w PM tylko w języku polskim (wyższa cena) i angielskim lub w wersji dwujęzycznej (niższa cena), co ma zdopingować autorów do tekstów angielskojęzycznych. Tylko zwiększając krąg czytelników można zwiększyć cytowalność artykułów, a to przekłada się na ocenę czasopisma.
Ze względu na wydawanie artykułów w języku polskim i niską cytowalność PM w ubiegłym roku został wykluczony z bazy Scopus. Zmniejszenie liczby artykułów w języku angielskim może w końcowym efekcie spowodować obniżenie oceny PM i utratę współczynnika IF, co skończy się fatalnie, bo niewiele osób będzie wtedy chciało publikować w PM. Z taką sytuacją obecnie boryka się kwartalnik *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia*, który choć przyjmuje artykuły eksperymentalne i przeglądowe w języku angielskim, to niewiele osób chce w nim publikować ze względu na brak współczynnika IF, chociaż czasopismo ma 20 punktów MNiSW. W ubiegłym roku ukazały się tylko 2 zeszyty MDiM.

Nieźle sobie chyba radzi kwartalnik *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, publikujący w podobny sposób jak MDiM, ale będąc wyżej notowanym w rankingach i posiadając współczynnik IF, może pozwolić sobie na pobieranie opłaty 1100 zł + VAT. Podobna opłata dla członków PTM (350 USD + VAT) dotyczy artykułów zamieszczanych w PJM. Ale dla autorów nie należących do PTM, publikujących w PJM to już 700 USD + VAT, co pozwala na znaczne obniżenie kosztów wydawania czasopisma. Na brak manuskryptów redakcja PJM nie narzeka. Mamy nadzieję, że w przyszłym roku PJM będzie już czasopismem samofinansującym się.

Redakcja PM oraz Zarząd Oddziału Warszawskiego PTM skierowały pisma do ZG PTM w trosce o przyszłość PM i rozważenia „wiodącej, jeśli nie wyłącznej roli języka polskiego w publikacjach czasopisma *Postępy Mikrobiologii*". Członkowie PTM muszą się nad tą sprawą zastanowić. Będziemy zbierać opinie na ten temat, ale wydaje się jednak, że konieczne jest czynienie dużych wysiłków w celu upublicznienia i umiędzynarodowienia czasopisma, co mogłoby w pewnej perspektywie przynieść korzyści w postaci podniesienia pozycji PM w rankingach i zmniejszenia strat ponoszonych przez PTM.

II. W związku z trwającą pandemią COVID-19, brakiem możliwości przewidzenia jej przebiegu w tym roku oraz niebezpieczeństwem zakażenia, związanym ze zgromadzeniem dużej liczby osób, a także zaangażowaniem osób pracujących w laboratoriach diagnostycznych, mikrobiologicznych, zespołach naukowych oraz firmach działających w obszarze mikrobiologicznym na walkę z SARS-CoV-2, niezbędne wydaje się podjęcie decyzji o przesunięciu terminu naszego Ogólnopolskiego XXIX Zjazdu PTM na wrzesień 2021 r. Zmiana terminu dotyczy również Walnego Zgromadzenia Delegatów PTM oraz wyborów nowych Władz PTM. W związku z powyższym przedłużeniu do września 2021 r. ulega kadencja Władz PTM na wszystkich szczeblach, tj. Prezesa PTM razem z Prezydium PTM i Zarządem Głównym PTM, Głównej Komisji Rewizyjnej PTM, Zarządów Oddziałów Terenowych PTM, Komisji Rewizyjnych OT PTM, oraz Delegatów poszczególnych OT PTM wybranych na kadencję 2016–2020.

W dniu 20.04.2020 r w drodze elektronicznej Zarząd Główny PTM podjął **Uchwałę 18-2020** w sprawie przesunięcia terminu Ogólnopolskiego XXIX Zjazdu PTM na wrzesień 2021 r. oraz przedłużenia o rok kadencji Władz PTM na wszystkich szczeblach, a także kadencji Delegatów PTM na Walne Zgromadzenie Delegatów PTM.

III. Prezydium ZG PTM podjęło **Uchwałę 19-2020 w sprawie przyznania Nagród Naukowych PTM im. Prof. Edmunda Mikulaszka za prace opublikowane w latach 2018–2019.** Do Nagrody Naukowej PTM im. prof. Edmunda Mikulaszka zgłosiło się dwoje kandydatów. Komisja Konkursowa pod przewodnictwem Pani prof. dr hab. Stefanii Giedrys-Kalemby postanowiła przyznać:

- **nagrodę I stopnia (5.000 zł) dla mgr biot. Karoliny Furtak** za cykl 3 prac: (**1). Furtak K.**, Grządziel J., Gałązka A., Niedźwiecki J. (2020): Prevalence of unclassified bacteria in the soil bacterial community from floodplain meadows (fluvisols) under simulated flood conditions revealed by a metataxonomic approach. Catena, 188, 104448; doi: 10.1016/j.catena.2019.104448 (IF = 3,851; 140 pkt. MNiSW); (**2). Furtak K.,** Grządziel J., Gałązka A., Niedźwiecki J. (2019): Analysis of soil properties, bacterial community composition, and metabolic diversity in fluvisols of a floodplain area. Sustainability, 11, 14, 3929; doi:10.3390/su11143929 (IF = 2,592; 70 pkt. MNiSW); (**3). Furtak K.**, Gałązka A., Niedźwiecki J. (2020): Changes in soil enzymatic activity caused by hydric stress. Polish Journal of Environmental Studies, 29, 4, 1–8; ISSN 1230-1485; doi: https://doi.org/10.15244/pjoes/112896 (IF = 1,186; 40 pkt. MNiSW);
- **nagrodę II stopnia (3.000 zł) dla dr inż. Łukasza Łopusiewicza** za pracę: **Ł. Łopusiewicz**, E. Drozłowska, P. Siedlecka, M. Mężyńska, A. Bartkowiak, M. Sienkiewicz, H. Zielińska-Bliźniewska, P. Kwiatkowski (2019) Development, characterization, and bioactivity of non-dairy kefir-like fermented beverage based on flaxseed oil cake. Food, 8, 554 (IF = 3,011; 70 pkt. MNiSW).

Gratulujemy laureatom, którzy przedstawią swoje prace na XXIX Zjeździe PTM.
Zachęcamy młodych adeptów nauki do bardziej licznego starania się o Nagrodę Naukową PTM im. Prof. Edmunda Mikulaszka za prace opublikowane w latach 2020–2021.

IV. Prezydium ZG PTM w dniu 08.05.2020 r. podjęło **Uchwałę 20-2020** o organizacji **Ogólnopolskiego XXIX Zjazdu PTM w terminie 14–17 września 2021 r. w Sangate Airport Hotel w Warszawie.** Mamy nadzieję, że do tak odległego terminu, pandemia COVID-19 zostanie opanowana i będzie wystarczająco czasu aby przygotować prezentacje na Zjazd oraz pozyskać środki finansowe na jego organizację.

V. PTM podpisało umowę „Agreeement for Full Participation of *Polish Journal of Microbiology* in NIH PubMed Central Archive" dotyczącą indeksowania PJM w bazie PubMed, co jest bardzo ważne dla wizualizacji i indeksacji naszego kwartalnika.
Dnia 05.06.2020 r. otrzymaliśmy wiadomość, że **Polish Journal of Microbiology** znalazł się w bazie PubMed Central po adresem: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/3847/

VI. Członkowie ZG PTM w stanowisku z dnia 22.04.2020 r. nie zaakceptowali pomysłu Przewodniczącego Oddziału Terenowego PTM w Warszawie, aby Oddziały utworzyły swoje osobne strony internetowe i opracowały swoje logotypy, wychodząc z założenia, że PTM jest jednolitym stowarzyszeniem posiadającym swoją stronę internetową i podstrony dla wszystkich Oddziałów oraz logotyp PTM wyłoniony w konkursie zorganizowanym kilka lat temu.

VII. Polskie Towarzystwo Mikrobiologów wyrażało swoje opinie dla Krajowej Rady Diagnostów Laboratoryjnych w sprawie testów genetycznych służących do wykrywania wirusa SARS CoV-2 i testów serologicznych do wykrywania przeciwciał dla tego wirusa.

VIII. Organizatorzy kongresu IUMS, 12–16 października 2020 r. w Daejon w Korei Południowej przesunęli terminy: przesłania abstraktów – do 30.06.2020 r. oraz wczesnej rejestracji – do 31.07.2020 r.

IX. Zmieniono formę dorocznego spotkania przedstawicieli europejskich towarzystw mikrobiologicznych FEMS Council 2020. Odbędzie się ono 04.09.2020 r. (13:00-15:00) on-line.

X. W dniu 08.06.2020 r. odbyło się wirtualne spotkanie członków Komitetu Organizacyjnego XXIX Zjazdu PTM. Omawiano sprawy:
1) pozyskiwania środków finansowych (zdecydowano podpisać umowę z MNiSW dotyczącą dofinansowania organizacji Zjazdu na kwotę 70 000 zł – występowaliśmy o 300 000 zł),
2) zaangażowania firm mogących wspierać logistycznie organizację Zjazdu,
3) zdecydowano popierać i udzielać patronatu konferencjom mikrobiologicznym organizowanym w 2021 r. w innym terminie niż XXIX Zjazd PTM. Jednocześnie prosimy wszystkie Zarządy OT PTM oraz wszystkich członków PTM o nieorganizowanie konferencji mikrobiologicznych w planowany terminie naszego Zjazdu PTM, to jest 14–17.09.2021.

XI. Zwróciliśmy się do kancelarii prawnej w sprawie opinii na temat poprawności Uchwały ZG PTM nr 18-2020 dotyczącej przesunięcia terminu Ogólnopolskiego XXIX Zjazdu PTM na wrzesień 2021 r. oraz przedłużenia o rok kadencji Władz PTM na wszystkich szczeblach, a także kadencji Delegatów PTM na Walne Zgromadzenie Delegatów PTM. O ile sprawa przesunięcia terminu Zjazdu jest poprawna pod względem prawnym, to „przedłużenie o rok kadencji Władz PTM na wszystkich szczeblach, a także kadencji Delegatów PTM na Walne Zgromadzenie Delegatów PTM" wymaga innego niż Uchwala ZG PTM trybu postępowania. Zgodnie z opinią prawną, kadencja władz wszystkich stowarzyszeń w Polsce, w tym PTM, zostaje wydłużona w drodze Ustawy z dnia 04.06.2020 r. (Czwarta Tarcza), a nie decyzją ZG PTM. Według tej Ustawy wybór władz stowarzyszenia na nową kadencję musi być dokonany w terminie do 60 dni od dnia odwołania stanu zagrożenia epidemicznego lub stanu epidemii.

XII. Na dzień 1 maja 2020 r. nasze Towarzystwo liczy 924 członków. Najliczniejsze oddziały terenowe, grupujące ponad 100 członków, to OT Warszawa i OT Kraków.

Warszawa, 10.06.2020 r.

SEKRETARZ
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów
dr hab. n. farm. Agnieszka E. Laudy

PREZES
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów
prof. dr hab. Stefan Tyski

CZŁONKOWIE WSPIERAJĄCY PTM

Członek Wspierający PTM – Złoty
od 27.03.2017 r.

HCS Europe – Hygiene & Cleaning Solutions
ul. Warszawska 9a, 32-086 Węgrzce k. Krakowa
tel. (12) 414 00 60, 506 184 673, fax (12) 414 00 66
www.hcseurope.pl

Firma projektuje profesjonalne systemy utrzymania czystości i higieny dla klientów o szczególnych wymaganiach higienicznych, m.in. kompleksowe systemy mycia, dezynfekcji, osuszania rąk dla pracowników służby zdrowia, preparaty do dezynfekcji powierzchni dla służby zdrowia, systemy sterylizacji narzędzi.

Członek Wspierający PTM – Srebrny
od 12.09.2017 r.

Firma Ecolab Sp. z o.o. zapewnia: najlepszą ochronę środowiska pracy przed patogenami powodującymi zakażenia podczas leczenia pacjentów, bezpieczeństwo i wygodę personelu, funkcjonalność posiadanego sprzętu i urządzeń.
Firma jest partnerem dla przemysłów farmaceutycznego, biotechnologicznego i kosmetycznego.

Członek Wspierający PTM – Zwyczajny
od 12.09.2017 r.

Firma Merck Sp. z o.o. jest częścią międzynarodowej grupy Merck KGaA z siedzibą w Darmstadt, Niemcy i dostarcza na rynek polski od roku 1992 wysokiej jakości produkty farmaceutyczne i chemiczne, w tym podłoża mikrobiologiczne.

Członek Wspierający PTM – Zwyczajny
od 06.06.2019 r.

Firma BART jest producentem i dystrybutorem surowców oraz dodatków dla przemysłu spożywczego i farmaceutycznego.
Specjalizujemy się w probiotykach oraz surowcach uzyskiwanych metodami biotechnologicznymi.
Współpracujemy z renomowanymi producentami: Probiotical, Gnosis, Lesaffre.

SPIS TREŚCI

Prof. dr. hab. nauk med. Mieczysław Metzger 1920–1984 113
S. Siebielec, M. Woźniak, A. Gałązka, G. Siebielec – Mikroorganizmy jako biologiczne zanieczyszczenia wewnętrznego i zewnętrznego powietrza 115
B. Fiecek, M. Matławska, E. Gołąb, T. Chmielewski – Ryzyko transmisji chorób zakaźnych przenoszonych przez kleszcze poprzez transfuzję krwi 129
M. Gemba, E. Rosiak, D. Kołożyn-Krajewska – *Cronobacter* spp. – poważne zagrożenie w żywności dla niemowląt 139
D. Łagowski, S. Gnat, A. Nowakiewicz – Mechanizmy powstawania oporności dermatofitów na substancje przeciwgrzybicze 153
A. Stój – Wpływ drożdży i bakterii mlekowych na zawartość związków lotnych i inne parametry enologiczne win 167

RECENZJE 179

KOMUNIKATY, INFORMACJE 181

CONTENTS

Prof. dr. hab. nauk med. Mieczysław Metzger 1920–1984 113
S. Siebielec, M. Woźniak, A. Gałązka, G. Siebielec – Microorganisms as indoor and outdoor air biological pollution 115
B. Fiecek, M. Matławska, E. Gołąb, T. Chmielewski – Risk of transmission of tick-borne diseases by blood transfusion 129
M. Gemba, E. Rosiak, D. Kołożyn-Krajewska – *Cronobacter* spp. – the serious risk in a baby food 139
D. Łagowski, S. Gnat, A. Nowakiewicz – Mechanisms of dermatophyte resistance to antifungal substances 153
A. Stój – Influence of yeast and lactic acid bacteria on the content of volatile compounds and other oenological parameters of wines 167

REVIEW 179

NEW REPORTS, INFORMATION 181

Warunki prenumeraty

Zapytania o warunki prenumeraty oraz zamówienia proszę kierować do Wydawcy
Roma Walendzewicz
tel. 22 115 38 10, 607 217 879
e-mail: roma.walendzewicz@gmail.com

Wpłaty należy dokonywać na rachunek bankowy
Bank BGŻ 57 2030 0045 1110 0000 0261 2550
Polskie Towarzystwo Mikrobiologów
ul. Banacha 1 b, 02-097 Warszawa

Cena 1 zeszytu 40 zł + VAT 8%