

调查研究

澳门市售即食海产中嗜水气单胞菌的污染情况及其致泻性毒力基因分析

李婉芬,邓凯殷,黄海怡,莫嘉雯

(澳门理工大学健康科学及体育学院,中国 澳门 999078)

摘要:目的 对澳门地区市售即食海产品进行嗜水气单胞菌的分离鉴定及致泻毒力基因检测。方法 从甲壳类、鱼类、贝类、头足纲类共4类80份样本中分离嗜水气单胞菌,使用实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)方法检测菌株16S rRNA基因进行菌株鉴定,使用多重PCR测定分离菌株4种致泻毒力基因。结果 澳门地区市售的80份即食海产品中,有57份样本(71.25%)分离出嗜水气单胞菌,其中6份(10.53%)带有致泻毒力基因。在6株携带毒力基因的嗜水气单胞菌中,4株携带2种毒力基因,其余的只携带1种毒力基因。其中携带 *alt* 有4株(7.02%)、*aerA* 3株(5.36%)、*ast* 2株(3.51%)及 *act* 1株(1.75%)。即食海产品的4个分类与嗜水气单胞菌检出率,经 χ^2 检验分析差异无统计学意义($P>0.05$)。此外,在15个经烹煮过样本中分离鉴定出13株嗜水气单胞菌。结论 嗜水气单胞菌有较高的检出率可能是因不当包装、运输及处理过程中受到交叉污染。致泻性毒力基因检出率不高,但存在嗜水气单胞菌的致病风险。

关键词:澳门;嗜水气单胞菌;即食海产品;致泻毒力基因

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2023)03-0411-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2023.03.014

Prevalence of *Aeromonas hydrophila* and its diarrheagenic virulence genes in the ready-to-eat seafood sold in Macao

LEI Iun Fan, TENG Hoi Ian, WONG Hoi I, MOK Ka Man

(Faculty of Health Sciences & Sports, Macao Polytechnic University, Macao 999078, China)

Abstract: Objective To identify and detect the diarrheagenic virulence genes of *Aeromonas hydrophila* in ready-to-eat seafood sold in Macao. **Methods** *Aeromonas hydrophila* were isolated from 80 ready-to-eat seafood samples of crustaceans, fish, shellfish and cephalopods. And they were identified by real-time polymerase chain reaction based on 16S rRNA gene. Multiplex polymerase chain reaction was used to determine the diarrheagenic virulence genes in the isolated strains. **Results** Fifty seven of the 80 samples (71.25%) were positive with *Aeromonas hydrophila*. Among the positive samples, 6 of the samples (10.53%) were detected with diarrheagenic toxic genes. Among 6 strains which carried toxic genes, 4 strains carried 2 toxic genes and 2 strains carried only 1 toxic gene. Four strains carried *alt* (7.02%), followed by 3 strains with *aerA* (5.36%), 2 strains with *ast* (3.51%), and only 1 strain with *act* (1.75%). After Chi-square test and analysis, there was no direct relationship between the detection rate and 4 types of ready-to-eat seafood ($P>0.05$). In addition, 13 strains of *Aeromonas hydrophila* were isolated from 15 cooked samples. **Conclusion** The high isolation rate of *Aeromonas hydrophila* may be due to contamination caused by improper packaging, transport and processing. The detection of toxic genes was low, but the risk cannot be ignored and integrated monitoring based on food chain is important.

Key words: Macao; *Aeromonas hydrophila*; ready-to-eat seafood; diarrheagenic virulence genes

嗜水气单胞菌广泛存在于水环境中,是能够感染动物与人类的条件致病菌,能够引起鱼类暴发性败血症,亦可导致人类食物中毒、腹膜炎及败血症等^[1]。随着饮食文化的改变,寿司、生鱼片等即食海

产品或经过加工的即食水产品受到大众的欢迎,消费量增加,但这类食品容易被气单胞菌污染,若食用前不经过加热处理,人摄入后极易受到气单胞菌感染而使患病概率大大增加。

嗜水气单胞菌能够产生多种致病因子,外毒素是气单胞菌属的主要毒力因子,与人类腹泻密切相关^[2]。具有致泻性的毒力基因包括耐热肠毒素(*ast*)、不耐热肠毒素(*alt*)、肠毒素(*act*)以及气溶素(*aerA*)^[3]。

收稿日期:2021-09-15

作者简介:李婉芬 女 副教授 研究方向为微生物检验

E-mail: iflei@mpu.edu.mo

本研究对澳门地区市售的即食海产品中嗜水气单胞菌污染进行研究,并对分离菌株4种致泻性的外毒素基因检测,以探讨其在即食海产品中的污染状况及其致病性。

1 材料与方法

1.1 样本来源

2020年9月—2021年3月,从澳门市场上的日本料理店或超市购买即食海产品,包括20份甲壳类,20份鱼类,22份贝类,18份头足纲类,共4类80份(表1),每份样本不少于25g。在4类即食海产品中,甲壳类和鱼类样本全部是未经烹饪过的,而贝类及头足纲类样本分别有8个和7个是烹饪过的。为避免购买批次相同的样本,在不同的店铺购买不同类型的样本。样本按照GB 4789.1—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 总则》进行收集、贮存和运送。

表1 即食海产品样本种类

样本种类	样本类型	总数/份
贝类	赤贝、帆立贝、北寄贝、马刀贝、活赤贝、翡翠螺	22
甲壳类	虎虾、甜虾、牡丹虾、天使虾、阿根廷红虾、玻璃虾、赤虾	20
鱼类	三文鱼、鲷鱼、油甘鱼、黄鳍吞拿鱼、希灵鱼、剑鱼、池王鱼	20
头足纲类	墨鱼片、八爪鱼、鱿鱼须	18

1.2 主要仪器及试剂

天平(美国, Ohaus)、均质器(英国, Seward Stomacher 400)、离心机(德国, Hermle)、培养箱(德国, Binder)、高压灭菌锅(日本, Tomy ES-135)、Applied Biosystems 7300 实时荧光定量 PCR 仪、Applied Biosystems GeneAmp 9700 PCR 仪(美国赛默飞世尔科技)、凝胶电泳仪、ChemiDoc XRS+凝胶成像仪(美国伯乐)。

胰蛋白酶大豆肉汤、胰蛋白酶大豆琼脂、气单胞菌培养基(Ryan agar, RA)及三糖铁培养基(青岛海博生物),氨苄青霉素(福州飞净生物),氧化酶试剂(广东环凯微生物), iTaq universal SYBR Green Supermix(美国赛默飞世尔科技), TBE 缓冲液、TE 缓冲液、PCR Master Mix 缓冲液、核酸呈色剂和引物(碧云天生物)。

1.3 实验方法

参考美国农业部食品安全检查署微生物实验室手册第三版(1998)^[4]、TRAKHNAF 等^[5]、FATEN 等^[6]、CHANG 等^[7]和 BALAKRISHNA^[8]等的研究,进行菌株分离、生化反应、分子生物学鉴定以及致泻

性毒力基因检测。

1.3.1 样本前处理

无菌操作称取(25±0.1)g 样本,加入 225 mL 氨苄青霉素胰蛋白酶大豆肉汤,230 r/min 均质 2 min。28 °C 下增菌培养 18~24 h。

1.3.2 菌株分离

取 10 μL 增菌液划线接种在气单胞菌培养基上,在 28 °C 孵育 24~48 h。在 RA 上气单胞菌属的特征为绿色中心菌落。挑取 3 个典型菌落转接种在三糖铁培养基斜面 and 胰蛋白酶大豆琼脂斜面上,并在 28 °C 下孵育 24 h。气单胞菌属在三糖铁培养基上表现为斜面呈红色或黄色,底部呈黄色,无硫化氢产生,产气或不产气。使用氧化酶测试作初筛,气单胞菌属为氧化酶阳性细菌。

1.3.3 菌株分子生物学鉴定

挑取单个可疑菌落加入 200 μL 无菌水混匀后,置沸水浴 10 min^[9]。冷却后,以 10 000×g 离心 3 min,上清液即为 PCR 扩增所用的样本 DNA^[5]。使用定量 PCR(qPCR)对嗜水气单胞菌 16S rRNA 基因进行扩增。qPCR 反应体系为 20 μL,包括:iTaq universal SYBR Green Supermix 10 μL;引物 2 μL(引物浓度为 0.3 μmol/L);样本 DNA 2 μL,无菌水补足至 20 μL。qPCR 反应程序为 50 °C 热启动 2 min;95 °C 预变性 2 min;95 °C 变性 15 s,60 °C 退火/延伸 1 min,进行 40 个循环^[6]。鉴定嗜水气单胞菌的引物序列如表 2^[5]。由碧云天生物技术公司合成,CT 值 <35 定为阳性,CT 值 >35 定为阴性,16S rRNA qPCR 产物熔解温度(T_m)为 81.1 °C^[6]。

表2 鉴定嗜水气单胞菌的引物序列^[6]

目标基因	引物序列 5'-3'	产物长度/bp
嗜水气单胞菌(16S rRNA)	F: GGCCTGCGCGATTGTATAT R: GTGCGGATCATCTTCTCAGA	103

1.3.4 致泻性毒力基因检测

1.3.4.1 引物制备及检测条件

使用多重 PCR(Multiplex-PCR, mPCR)对阳性菌株的致泻性的毒力基因进行检测,由碧云天生物技术公司合成,引物设计如表 3^[7-8],按产品说明加入适量的 TE 缓冲液,配制成 100 μmol/L 的原液,再按所需浓度配制成引物混合物。mPCR 反应体系为 25 μL,包括 2X Master Mix 12.5 μL;引物混合物 2.5 μL(4 对引物终浓度均为 0.2 μmol/L);样本 DNA 2 μL;无菌水补足至 25 μL。使用 Applied Biosystems GeneAmp 9700 PCR 仪进行扩增,其反应程序为 94 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 30 s,58 °C 退

表3 嗜水气单胞菌毒力基因的引物序列
Table 3 Primers used to amplify diarrheagenic virulence genes of *Aeromonas hydrophila*

目标基因	引物序列 5'-3'	产物长度/bp	参考文献
ast	F: GACAACAAGGGCGCTCATGA	99	[7]
	R: GACCACCTTCAGGGTGCCT		
alt	F: CAGAACATCGGCCGCTTC	153	[7]
	R: CAGCGCATAGCCGTTCTCT		
act	F: CAGCACAGTCGGAATTTTCAT	250	[7]
	R: TCACGTACCATGTTTGAAG		
aerA	F: ACTGTCTGCCCTGGATATTC	759	[8]
	R: GTTCCAGTTCGGACGGTTGT		

火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 进行 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min。

1.3.4.2 致泻性毒力基因的电泳检测

将 2 μL 核酸呈色剂(6X)与 10 μL PCR 产物混合, 配制出 12 μL 样本混合液; 称量琼脂糖 1.5 g, 加入 50 mL 0.5× TBE 缓冲液配制成 3.0% 琼脂糖凝胶。使用 50 bp DNA ladder 作为分子量参照标准, 电泳 150 V, 60 min。电泳后使用 Gel Doc XR+凝胶成像仪进行扫描, 按 DNA ladder 分子尺对比扩增条带的大小, 分析结果。

1.4 统计学分析

利用 SPSS 26.0 软件进行 χ^2 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 嗜水气单胞菌及其致泻基因检出率

从 80 个样本中分离到的可疑菌落进行 qPCR 检测, 结合溶解曲线分析, 参考 TRAKHNA 等^[5]的研究, 将 $C_T < 35$ 定为阳性, $C_T > 35$ 定为阴性, 16S rRNA qPCR 产物溶解温度(T_m)为 81.1 °C, 实验结果与文献结果一致, 见图 1。在 80 份样本中, 有 57 份样本分离出嗜水气单胞菌, 阳性检出率为 71.25% (57/

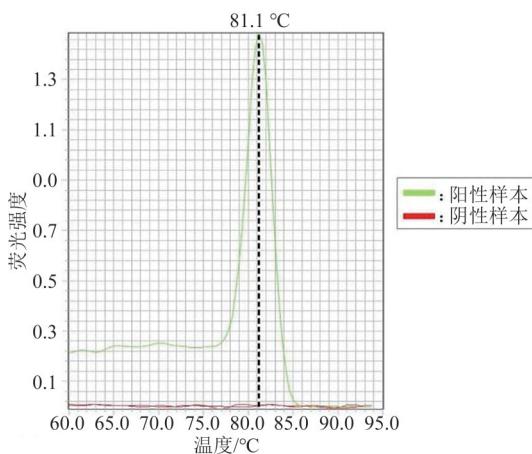


图1 16S rRNA qPCR 产物之溶解曲线及其温度

Figure 1 The melting curve and melting point of 16S rRNA qPCR product

80), 其中甲壳类占 17.50% (14/80); 鱼类占 15.00% (12/80); 贝类占 23.75% (19/80); 头足纲类占 15.00% (12/80), 见图 2。在 57 个阳性样本中, 共检测出 6 个阳性样本中的嗜水气单胞菌带有致泻毒力基因, 检出率为 10.53%。甲壳类检出率为 5.26% (3/57), 鱼类为 3.51% (2/57), 贝类为 1.75% (1/57), 头足纲类占 0.00% (0/57), 见图 2。在 57 个阳性样本中的嗜水单胞菌进行 4 种致泻基因检测。结果显示 4 种致泻基因均有检出, 各致泻基因片段大小对照如图 3。分析样本种类与嗜水气单胞菌检出率的关系, 差异无统计学意义 ($P = 0.274$)。

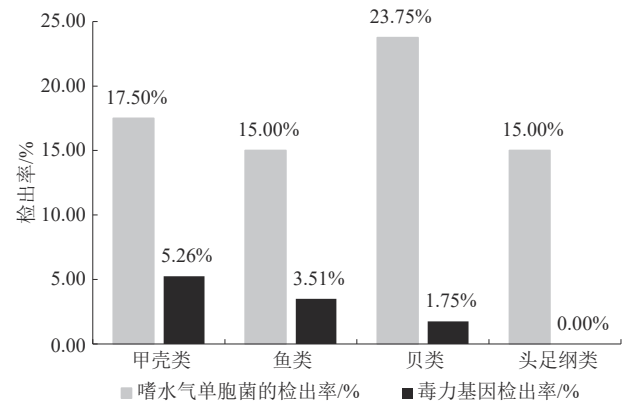
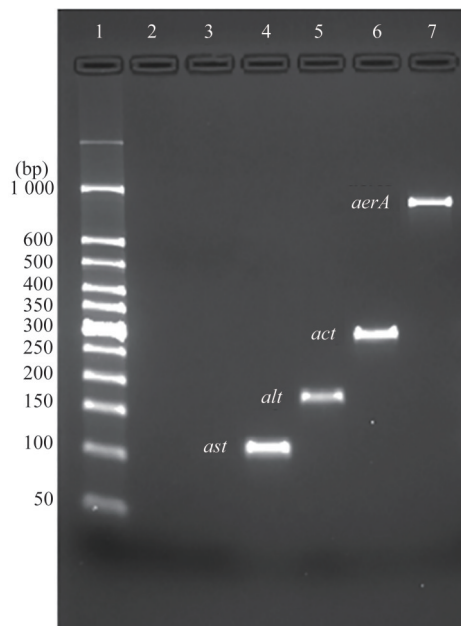


图2 4类即食海产品中嗜水气单胞菌的检出率及其致泻基因检出率

Figure 2 The detection rate of *Aeromonas hydrophila* and its diarrheagenic virulence genes in 4 types of ready-to-eat seafood products



注: 1. DNA ladder; 2. 空白对照; 3. E.coli 阴性对照;

4. ast 毒力基因 (99 bp); 5. alt 毒力基因 (153 bp); 6. act 毒力基因 (250 bp); 7. aerA 毒力基因 (759 bp)

图3 4种致泻毒力基因片段大小

Figure 3 The fragment size of the 4 diarrheagenic virulence genes

2.2 嗜水气单胞菌致泻毒力基因组合

由于每个样本都会从 RA 挑取 3 个典型菌落进行检测,在同一个阳性样本中所分离出的菌株,若其毒力基因型相同,便视为来自同一个克隆。在 57 个阳性样本中,从 2 个阳性的甲壳类样本中分离出两株嗜水气单胞菌,1 株为携带毒力基因的,另一株则不具毒力基因。4 类即食海产品检出的 6 株携带毒力基因的菌株中有 4 株携带两种毒力基因,有 2 株检出携带 *ast+alt*,携带 *alt+act* 和 *alt+aerA* 基因的各有 1 株检出,另有 2 株只检出 *aerA* 基因,具体见表 4。

表 4 4 类即食海产品中嗜水气单胞菌阳性样本所携带的致泻毒力基因组合

Table 4 The combination of diarrheagenic virulence genes carried in positive samples of *Aeromonas hydrophila* in 4 types of ready-to-eat seafood

样本种类	<i>ast+alt</i>	<i>alt+act</i>	<i>alt+aerA</i>	<i>aerA</i>	总数
甲壳类	2(3.51%)	0	0	1(1.75%)	3(5.26%)
鱼类	0	0	1(1.75%)	1(1.75%)	2(3.51%)
贝类	0	1(1.75%)	0	0	1(1.75%)
头足纲类	0	0	0	0	0
总数	2(3.51%)	1(1.75%)	1(1.75%)	2(3.51%)	6(10.53%)

2.3 嗜水气单胞菌的检出率及其单个致泻毒力基因检出率

毒力基因以 *alt* 检出率最高,检出率为 7.02%,其次为 *aerA*,占 5.36%,*ast* 占 3.51%,*act* 占 1.75%。在甲壳类中,*alt* 及 *ast* 的检出率同为 3.51%,*aerA* 的检出率为 1.75%,而 *act* 则未被检出;在鱼类中,检出的毒力菌株均带有 *aerA* 基因,检出率为 3.51%,其次为 *alt* 基因,占 1.75%,*ast* 及 *act* 则未被检出;在贝类中,只检出 *act* 及 *alt* 基因,检出率均为 1.75%;而头足纲类的样本中的嗜水气单胞菌则未检出致泻毒力基因,见表 5。

表 5 4 类即食海产品中嗜水气单胞菌的检出率及其单个致泻毒力基因检出率

Table 5 The distribution of diarrheagenic virulence genes carried in positive samples in 4 types of ready-to-eat seafood

样本种类	阳性样本数	各致泻毒力基因分布/%			
		<i>ast</i>	<i>alt</i>	<i>act</i>	<i>aerA</i>
甲壳类	14(70.0%)	2(3.51%)	2(3.51%)	0	1(1.75%)
鱼类	12(60.0%)	0	1(1.75%)	0	2(3.51%)
贝类	19(86.4%)	0	1(1.75%)	1(1.75%)	0
头足纲类	12(66.7%)	0	0	0	0
总数	57(71.3%)	2(3.51%)	4(7.02%)	1(1.75%)	3(5.36%)

本次研究样本中,贝类及头足纲类样本分别有 8 个和 7 个样本是经过加工的,先烹饪后冷藏,再包装制成即食海产品,对相关数据进行 χ^2 检验分析,分析样本生熟状态与嗜水气单胞菌检出率的关系,差异无统计学意义($P=0.143$)。

3 讨论

本研究结果显示澳门地区即食海产品的嗜水气单胞菌检出率为 71.25%,远高于我国台湾(26.27%)^[7]和上海(6.7%)^[10]的水产品嗜水气单胞菌检出率,也高于土耳其在淡水鱼中嗜水气单胞菌的检出率(30.0%)^[11]及沙特阿拉伯生肉、生鱼和乳制品中的检出率(23.2%)^[12]。而在巴西,鱼类食品嗜水气单胞菌的检出率为 67.8%,与本研究检出率相近^[13]。推测其与澳门即食海产品大部分以进口为主,冷链运输和供应链容易造成交叉污染,故检出率较高。

有文献指出,大部分的嗜水气单胞菌(68.42%)携带 1 种以上毒力基因,且携带多种毒力基因的气单胞菌具有较大的潜在致病力,不同种型之间可能存在不同的腹泻致病机制^[14]。本研究中,嗜水气单胞菌阳性样本有 66.67% 都带有两种毒力基因,相比其他文献,有同时携带 3 种或 4 种毒力基因的菌株,本研究并没有携带两种以上的毒力菌株,其中以 *alt* 基因的检出率最高。中国台湾亦有研究指出,从市售鱼类产品分离出的嗜水气单胞菌中,全部带有 *alt* 基因^[15];而巴西的研究中,在海鲜及肉类食品中以 *act* 的检出率最高^[13];有研究则指出从韩国水域养殖的太平洋鲍鱼中分离的嗜水气单胞菌毒力基因以 *aerA* 检出最多^[16]。由此可见,嗜水气单胞菌的毒力基因分布可能有地区性^[17]。

即食海产品的 4 类与嗜水气单胞菌检出率经 χ^2 检验分析后,差异无统计学意义($P=0.274$)。嗜水气单胞菌均不耐热,其 D 值在 60 °C 为 7 min^[18]。在 15 个经烹煮过样本中,包括 8 个贝类和 7 个头足纲类样本,仍能鉴定出 13 株嗜水气单胞菌,样本的生熟状态与嗜水气单胞菌检出率的相比差异无统计学意义($P=0.143$),由此推断样本可能在供应和运输链受到交叉污染。碍于无法追溯整个运输链的过程,因此未能对经烹饪样本的检出率作更多的分析。

根据本研究结果推测,虽然澳门即食海产品中的嗜水气单胞菌检出率比较高,但是致泻毒力基因检出率低,所以由即食海产品中嗜水气单胞菌引起的食物中毒风险相对低^[13-16]。然而,本研究样本数量较少,且只针对致泻相关的 4 种毒力因子进行了分析,因此有必要在未来开展即食海产品中的嗜水气单胞菌连续动态监测。

参考文献

- [1] LEHANE L, RAWLIN G T. Topically acquired bacterial zoonoses from fish: a review[J]. The Medical Journal of Australia, 2000,

- 173(5): 256-259.
- [2] KINGOMBE C I, D'AOUST J Y, HUYS G, et al. Multiplex PCR method for detection of three *Aeromonas* enterotoxin genes [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(2): 425-433.
- [3] 王闻卿, 朱林英, 郝莉鹏, 等. 气单胞菌研究概况[J]. *疾病监测*, 2016, 31(7): 591-597.
WANG W Q, ZHU L Y, HAO L P, et al. Progress in research of aeromonas[J]. *Disease Surveillance*, 2016, 31(7): 591-597.
- [4] ROSE B E, OKREND A J G. FSIS Microbiology Laboratory Guidebook Chapter 7 Isolation and Identification of *Aeromonas* Species from Meat and Poultry Products USA: USDA [S]. U.S.: U.S. Department of Agriculture, 1998.
- [5] TRAKHNA F, HARF-MONTEIL C, ABDELNOUR A, et al. Rapid *Aeromonas hydrophila* identification by TaqMan PCR assay: comparison with a phenotypic method [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2009, 49(2): 186-190.
- [6] FATEN T, ABDERRAZAK M, PASCALE G W. Using a real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) method for reliable enumeration of *Aeromonas hydrophila* in water samples [J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2013, 7(19): 2119-2126.
- [7] CHANG Y C, WANG J Y, SELVAM A, et al. Multiplex PCR detection of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. from suspect food samples in northern Taiwan [J]. *Journal of Food Protection*, 2008, 71(10): 2094-2099.
- [8] BALAKRISHNA K, MURALI H S, BATRA H V. Detection of toxigenic strains of *Aeromonas* species in foods by a multiplex PCR assay [J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2010, 50(2): 139-144.
- [9] 高智玲, 纪雪, 陈萍, 等. 致病性嗜水气单胞菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. *中国人兽共患病学报*, 2016, 32(4): 400-405, 411.
GAO Z L, JI X, CHEN P, et al. Identification and antimicrobial resistance of pathogenic aeromonas hydrophila [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2016, 32(4): 400-405, 411.
- [10] 王闻卿, 苏靖华, 傅慧琴, 等. 食源性气单胞菌属种水平监测和表型特征研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2014, 26(1): 1-5.
WANG W Q, SU J H, FU H Q, et al. Monitoring and phenotype characteristics study on food-borne *Aeromonas* species [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2014, 26(1): 1-5.
- [11] ERDEM B, KARIPTAŞ E, KAYA T. Siderophore, hemolytic, protease, and pyrazinamidase activities and antibiotic resistance in motile *Aeromonas* isolated from fish [J]. *Turkish Journal of Biology*, 2010, 34: 453-462.
- [12] ALHAZMI M I. Isolation of *Aeromonas* spp. from food products: Emerging *Aeromonas* infections and their significance in public health [J]. *Journal of AOAC International*, 2019, 98(4): 927-929.
- [13] ROGES E M, GONÇALVES V D, CARDOSO M D, et al. Virulence-associated genes and antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolates from animal, food, and human sources in Brazil [J]. *BioMed Research International*, 2020, 2020: 1052607.
- [14] OLIVEIRA S T L, VENERONI-GOUVEIA G, COSTA M M. Molecular characterization of virulence factors in *Aeromonas hydrophila* obtained from fish [J]. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2012, 32(8): 701-706.
- [15] WU C J, KO W C, LEE N Y, et al. *Aeromonas* isolates from fish and patients in Tainan City, Taiwan: genotypic and phenotypic characteristics [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(21): e01360-19.
- [16] WICKRAMANAYAKE M V K S, DAHANAYAKE P S, HOSSAIN S, et al. Antimicrobial resistance of pathogenic *Aeromonas* spp. isolated from marketed Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) in Korea [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2020, 128(2): 606-617.
- [17] 符贵红, 肖丹, 胡鲲, 等. 鲫源嗜水气单胞菌毒力基因多重 PCR 检测及 ERIC-PCR 分子分型 [J]. *海洋渔业*, 2014, 36(6): 549-556.
FU G H, XIAO D, HU K, et al. Multiplex PCR and ERIC-PCR genotype in virulence genes of *Aeromonas hydrophila* in Crucian carp [J]. *Marine Fisheries*, 2014, 36(6): 549-556.
- [18] GUZ L, Sopińska A. Influence of temperature on the growth, protease production, and heat resistance of *Aeromonas hydrophila* (HG-1), *A. bestiarum* (HG-2), and *A. salmonicida* (HG-3) [J]. *Bulletin-Veterinary Institute in Pulawy*, 2008, 52(1): 45-52.