

FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

WIESŁAW NOWAKOWSKI, ANTONI FUROWICZ, PIOTR B. HECZKO, STEFAN WIERZBOWSKI

Właściwości pałeczek ropy błękitnej wyosobnionych z nasienia buhajów

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Katowicach
Z Zakładu Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasielenia Zwierząt Instytutu Zootechniki
w Balicach k/Krakowa
Z Instytutu Mikrobiologii AM w Krakowie

Pałeczki ropy błękitnej stają się w ostatnich latach coraz częściej przyczyną różnego rodzaju schorzeń u ludzi i zwierząt (3, 4, 6, 8, 9, 10, 14, 19). Są one niewątpliwie jednymi z najbardziej typowych mikroorganizmów oportunistycznych, powodujących zakażenia ustrojów wyższych o obniżonym stanie odporności miejscowej lub ogólnej (6, 8). Z coraz większą częstością stwierdza się także *Pseudomonas aeruginosa* w różnych środowiskach biologicznych, także w bezpośrednim otoczeniu zwierząt hodowlanych (19). Doniesienia szeregu autorów oraz nasze poprzednie badania wykazały, że *Pseudomonas aeruginosa* należy do drobnoustrojów najczęściej występujących w nasieniu buhajów (7, 15, 16, 18, 21, 22). Ich obecność może prawdopodobnie wiązać się zarówno z zakażeniami narządów rodnych unasielenia krów, jak i ze zmniejszoną płodnością samego nasienia. Celem niniejszej pracy było zatem szczegółowe przebadanie właściwości biochemicznych i toksycznych szczepów *P. aeruginosa* wyizolowanych z nasienia buhajów, aby na tej podstawie móc wnioskować o ich potencjalnej chorobotwórczości dla narządu rodnego.

Materiał i metody

Z mrożonego nasienia buhajów, użytkowanych w 20 Stacjach Hodowli i Unasielenia Zwierząt wyizolowano za pomocą powszechnie stosowanej w bakteriologii metody (17) 125 szczepów należących do rodzaju *Pseudomonas*. Z grupy tej, w wyniku posiewu na podłoża wybiórcze: Bacto-*Pseudomonas* Agar P i F, Podłoże Kinga A i B oraz podłoże z dodatkiem 0,1% cetrymidu, wyosobniono 100 szczepów *Pseudomonas aeruginosa*. Do wszystkich testów biochemicznych jako kontroli użyto zestawu szczepów pochodzących z All-India Institute of Medical Sciences, Department of Microbiology, New Delhi, India oraz z Instytutu Weterynarii w Puławach. Do badań używano podłoża opartych na składnikach produkowanych przez firmę Difco oraz odczynników wytwarzanych przez firmy: Koch-Light, B. D. H., Merck i P. O. Ch. Do testowania szczepy przesiewano ze skosów agarowych na płytki Petriego zawierające agar zwykły i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C, a następnie wysiewano na odpowiednie podłoża, służące do badania właściwości biochemicznych. Badania zaplanowano w taki sposób, aby zredukować do minimum liczbę przesiewów, co mogło by wpłynąć na zmianę właściwości szczepów

Badania biochemiczne obejmowały wykonanie następujących testów; fermentacja — glukozy, sacharozy, fruktozy, eskuliny, maltozy, laktozy, inuliny, galaktozy, mannitolu, sorbitolu, dulcytolu; wytwarzanie — hemolizyn, nukleazy, fosfatazy, lecytynazy, ureazy, żelatynazy, siarkowodoru, oksydazy cytochromowej, pyocyjaniny; dekarboksylacja lizyny, dezaminacja fe-

nyloalaniny, hydroliza argininy, hydroliza Tweenu 20, redukcja azotanów (13, 17). Ponadto określano aktywność proteolityczną badanych szczepów za pomocą metody Arvidsona i wsp. (1) wobec kazeiny rozpuszczalnej w środowisku agarozym w pH zbliżonym do obojętnego, które jest optymalne dla większości proteaz bakteryjnych. Strefę proteolizy mierzono przed i po denaturacji nierozłożonej kazeiny za pomocą 10% kwasu nadchlorowego. Oceniono także zdolność badanych szczepów do wykrzepiania plazmy króliczej oraz rozpuszczania włókna (11).

Przeprowadzono również oznaczanie lekooporności badanych szczepów na penicylinę, streptomycynę, chloramfenikol, oksytetracyklinę, erytromycynę, neomycynę oraz sulfatiazol za pomocą metody krążkowej (12).

Wyniki i omówienie

W wyniku przeprowadzonych badań biochemicznych stwierdzono, że szczepy *Pseudomonas aeruginosa* wyizolowane z nasienia buhajów posiadają szereg bardzo charakterystycznych właściwości, tak pod względem taksonomicznym, jak również w aspekcie ich potencjalnej chorobotwórczości. Wyniki badań dotyczące rozkładu cukrów wykazały, że szczepy *Pseudomonas aeruginosa* rozkładały jedynie glukozę (94%) i galaktozę (87,1%) oraz w 30% glukozę w warunkach beztlenowych. W minimalnym procencie rozkładały one sacharozę (4,9%), fruktozę (3,9%), eskulinę (1,9%) i laktozę (1,0%) (tab. 1.)

Zdecydowana większość badanych szczepów wykazała znaczną aktywność enzymatyczną. Prawie wszystkie szczepy powodowały redukcję azotanów (95,5%) i dekarboksylację argininy (97%). Wszystkie szczepy hydrolizowały Tween 20 oraz wytwarzały żelatynazę oraz oksydazę cytochromową, 72,3% szczepów wytwarzało lecytynazę, 40,6% fosfatazę oraz 13,8% ureazę (tab. 1), natomiast ani jeden szczep nie wytwarzał siarkowodoru oraz nie powodował dekarboksylacji lizyny i dezaminacji fenyloalaniny. Aż 96,0% szczepów rozkładało włóknik, zaś 35,6% z nich powodowało koagulację plazmy. Zaobserwowano pewną korelację pomiędzy aktywnością fibrynolityczną, koagulacyjną i lecytynazową badanych szczepów.

Badane szczepy prezentowały bardzo różnorodną intensywność w wytwarzaniu pyocyjaniny. Około 24% wytwarzało bardzo silnie pyocyjaninę, 48% silnie, 18% słabo, natomiast 10% szczepów nie produkowało tego barwnika.

Wszystkie badane szczepy wykazały obecność proteaz w metodzie agarozowej Arvidso-

na, przy czym średnice stref rozkładu białka wahały się od 0,5 do 3,5 mm, co odpowiada aktywnościom większym od około 2 j.m./ml. Różnice w średnicach stref odczytywanych w różnych warunkach świadczą o obecności kilku enzymów o działaniu proteolitycznym u większości badanych szczepów.

Większość szczepów (94%) wykazało aktywność hemolityczną wobec krwinek różnych gatunków zwierząt: królika, barana i krowy w różnych kombinacjach.

Wyniki naszych oznaczeń wskazują na bardzo znaczną i wieloraką aktywność enzymatyczną badanych szczepów, przy czym wiele ze stwierdzonych enzymów stanowi *de facto* czynniki toksyczne tych drobnoustrojów (5).

Szczególnie wyraźnie występowały różne aktywności proteolityczne, wyrażające się rozkładem nie tylko podstawowych substratów takich jak kazeina czy żelatyna, lecz także białek układu krzepnięcia jak fibryna oraz protrombina. Potwierdzają to doniesienia innych autorów o różnych proteazach *Pseudomonas*, a także najnowsze spostrzeżenia Węgrzynowicza i wsp. o wpływie tych bakterii na proces krzepnięcia i fibrynolizy (20).

Prawie wszystkie badane szczepy posiadały także zdolność do hemolizy różnych rodzajów krwinek, co w przypadku większości z nich korelowało ze zdolnością do wytwarzania lecytynazy. Szereg autorów wykazało, że lecytynaza, obok innych hemolizyn o charakterze glikolipidów, spełnia u *Pseudomonas aeruginosa* rolę toksyny hemolitycznej (5).

Tak więc należy przyjąć, że szczepy *P. aeruginosa* wyizolowane z nasienia buhajów posiadają wszystkie właściwości biochemiczne i toksyczne przypisywane dotąd tym bakteriom, przy czym ich aktywność do rozkładu różnych substratów białkowych i lipidowych jest wybitnie zaznaczona, wskazując pośrednio na ich potencjalnie chorobotwórcze znaczenie dla zwierząt. Można także z dużym prawdopodobieństwem przyjąć, że produkty metabolizmu szczepów *P. aeruginosa* występujących w nasieniu, mogą w destrukcyjny sposób wpływać na składniki nasienia, obniżając w ten sposób jego żywotność.

Obiekcje Bartletta (2) dotyczące stosunkowo krótkiej ekspozycji nasienia na działanie toksyn bakterii pochodzących z worka napletkowego zwierząt, przy dużym stężeniu bakterii, jak to stwierdziliśmy poprzednio (18) oraz przy ich dużej aktywności, mogą być stosunkowo łatwo obalone, skoro z cytowanych badań wynikać może fakt namnażania się bakterii w nasieniu, a zatem ekspozycji wystarczającej do efektywnego działania destrukcyjnego.

Badania lekooporności wyizolowanych szczepów wykazały ich całkowitą oporność na penicylinę, erytromycynę, streptomycynę, chloramfenikol, oksytetracyklinę, neomycynę. Natomiast 81,1% szczepów było wrażliwych na sulfatiazol.

Wnioski

1. Szczepy *Pseudomonas aeruginosa* wyosobnione z nasienia buhajów posiadają szereg aktywności biochemicznych i toksycznych, które mogą składać się na ich potencjalne właściwości chorobotwórcze.

2. Zatem obecność pałeczek ropy błękitnej w nasieniu buhajów winna być możliwie maksymalnie ograniczona.

Piśmiennictwo

1. Arvidson S.: Acta path. microbiol. scand. B81, 538, 1973.
2. Bartlett D. E., Larson L. L., Parker W. G., Howard T. H.: Proc. 6th Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod. NAIB, 1976.
3. Bilińska M., Stankiewicz D.: Med. dośw. 27, 19, 1977.
4. Czarnobielska W., Królikowska I., Litwin J., Sielczuk M.: Wiad. lek. 22, 639, 1969.
5. Dzierżanowska D.: Post. Mikrobiol. 17, 81, 1978.
6. Edmonds P., Suskind R. P., MacMillan B. G., Holder I. A.: Appl. Microbiol. 24, 219, 1972.
7. Flis J., Flis I.: Medycyna Wet. 28, 427, 1972.
8. Forkner C. E.: *Pseudomonas aeruginosa* infections. Grune and Stratton, 1960.
9. Gaydos J. M., Carrick L., Berk S.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 149, 908, 1975.
10. Holder I. A.: *Pseudomonas aeruginosa*: ecological aspects and patient colonization, wyd. V, M. Young, Raven Press, 1977.
11. Jeljaszewicz J., Cybulska J., Dziarski R., Hryniewicz W., Ludwicka A., Switalski L. M.: Ziarenkowce Gram-dodatnie, biologia, rozpoznanie i różnicowanie. PZH, 1978.
12. Kalużewski S.: Zasady i metodyka oznaczania wrażliwości bakterii na chemioterapeutyki w rutynowych badaniach diagnostycznych, Wyd. PZH, 1976.
13. Kędzia W., Koniar H.: Diagnostyka mikrobiologiczna. PZWL, 1974.
14. Kozaczek W., Bergan T., Lachowicz K., Szczepański K.: Prz. epid. 27, 37, 1973.
15. Króliński J.: Medycyna Wet. 33, 164, 1977.
16. Króliński J.: Medycyna Wet. 33, 298, 1977.
17. Lenette E. H., Spaulding E. H., Truant J. P.: Manual of Clinical Microbiology, 2nd ed., Am. Soc. Microbiol., Washington, 1974.
18. Nowakowski W., Wierzbowski S.: Medycyna Wet. 34, 488, 1978.
19. Scharman W.: *Pseudomonas* Species — 3 Int. Symp. Vol. I, Poznań, 1977, s. 172.
20. Węgrzynowicz Z., Ko H. L., Jeljaszewicz J., Pulverer G.: Zbl. Bakt. ParasitKde I. A242, 485, 1979.
21. Wierzbowski S., Szymd D.: Medycyna Wet. 32, 339, 1976.
22. Wierzbowski S., Kruczek G., Gątkiewicz A., Wierchoś E.: Proc. Danish-Polish Conf. Actual Biol. and Hygienic Problems of A. I. in Cattle 1973, s. 60.

Adres autora: dr Wiesław Nowakowski. ul. Krzywa 41/10, 45-500 Chorzów.

Новаковский В., Фурувич А., Генко П. Б., Вежбовский С. — Свойства палочек голубого гноя, изолированных из семени быков.

Из замороженного семени быков изолировали 100 штаммов *Pseudomonas aeruginosa* и определили ряд их биохимических и токсических свойств. Констатировали, что исследуемые штаммы в высоком проценте ферментировали глюкозу и галактозу, относительно же других сахаров были почти бездействующими. Зато показывали они сильную активность по отношению к аминокислотам и белкам; почти все разлагали аргинин, желатин, казеин и фибрин. Среди активности токсичного характера в высоком проценте нашли штаммы, гемолизирующие различного вида кровяные тельца, производящие лецитиназу и коагулирующие плазму. Эти данные указывают на потенциально патогенную роль палочек голубого гноя для семени, а также для детородных органов.

Nowakowski W., Furowicz A., Heczko P. B., Wierzbowski S. — Properties of *Ps. aeruginosa* strains isolated from the semen of bulls.

From the frozen semen of bulls 100 strains of *Ps. aeruginosa* were isolated and their biochemical and toxic properties were determined. The strains split in high percentage glucose and galactose and almost did not ferment other sugars. They were very active against amine acids and proteins; almost all of them split arginine, gelatine, casein and fibrin. They often possessed haemolytic activity against erythrocytes of different species, produced lecithinases and coagulase. All these data point to potential pathogenic role of *Ps. aeruginosa* for the semen and reproductive organs.