

Szkilnik S., Kobusiewicz T., Wiśniewski J., Baranowski Cz., Jankowska J. — **The influence of cattle epithelium preservation on the immunogenic properties of the vaccine prepared acc. to Frenkel's method.**

In order to explain the influence of epithelium preservation on the quality of viral materials and therefore on the immunogenic properties of the vaccine

against FMD, there was done several multiplications of FMD virus type O. For the culture there was used the epithelium directly after removing from tongues and after 1—12 days since preservation. Positive results were obtained only when the epithelium was preserved not more than 3 days. The virus multiplied in older cells did not give profitable findings.

ANDRZEJ KOMOROWSKI, JERZY ZAHACZEWSKI

## Aktywność enzymatyczna lipolitycznych laseczek beztlenowych

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Krakowie

Na wytwarzanie lipazy przez beztlenowe laseczki izolowane z mączek rybnych zwrócono uwagę we wcześniejszej publikacji (13). Lipaza jest enzymem z grupy esteraz i posiada zdolność hydrolitycznego rozkładu trójglicerydów (9). Inicjująca rola lipazy w złożonym łańcuchu destrukcyjnych przemian tłuszczu zmusza do zwrócenia szczególnej uwagi na drobnoustroje będące jej źródłem, a występujące w produktach bogatych we frakcje tłuszczowe — np. w mączkach rybnych.

Lipazy zostały stwierdzone w licznych rodzajach drobnoustrojów — m. in. *Staphylococcus*, *Diplococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Mycobacterium*, *Enterobacteriaceae* (6, 11, 12). Alford (2, 3) zwrócił uwagę na specyfikę lipaz różnych gatunków drobnoustrojów. Najczęściej wyraża się ona zwiększoną aktywnością w stosunku do estrów określonych kwasów tłuszczowych.

Szybkość procesu lipolizy zależy od warunków fizyko-chemicznych (1, 2, 6) oraz stopnia aktywności enzymatycznej. Oznaczanie aktywności lipaz bakteryjnych można przeprowadzić badając szybkość reakcji enzymatycznej na podłożach zawierających tłuszcze lub substraty tłuszczowe — np. podłoże Willis-Hobbs (12), Alforda (4) czy Gonzalesa-Sierry (5). Inną metodą określania aktywności lipaz jest alkalimetryczne oznaczanie stężenia kwasów tłuszczowych, uwolnionych w wyniku działania enzymu na substrat tłuszczowy. Ze względu na bardzo szybkie zakwaszenie podłoża w czasie wzrostu drobnoustrojów beztlenowych, metody alkalimetryczne są w tym przypadku mało obiektywne (8).

Lipazy bakteryjne są enzymami konstytucyjnymi-encellularnymi lub adaptacyjnymi-egzocellularnymi. Posługując się metodą Sebalda i Prevot (10) z użyciem wyciągów bezbakt-

teryjnych, można ustalić lokalizację lipaz badanych drobnoustrojów.

Celem naszej pracy było określenie zdolności i czasu rozkładu preparatów Tween użytych jako substraty tłuszczowe, przez lipazy beztlenowych laseczek izolowanych z mączek rybnych oraz stwierdzenie lokalizacji tego enzymu w kulturze bakteryjnej.

### Materiał i metody

**Szczepy bakteryjne.** Do badań użyto 12 szczepów laseczek beztlenowych o typowych właściwościach morfologicznych i biochemicznych, wyizolowanych z importowanych mączek rybnych. Sposób izolacji oraz właściwości szczepów podano w poprzedniej publikacji (13).

**Podłoża bakteriologiczne.** Hodowlę szczepów prowadzono na bulionie Wrzoska o pH = 7,6. Posiewy inkubowano 48 godzin w temp. 37°C. Czystość hodowli kontrolowano mikroskopowo.

**Podłoża z preparatami Tween-20, 40, 60 i 80** przygotowano wg metody Sebalda i Prevot (10). Do określania aktywności lipolitycznej kultur bakteryjnych używano podłoża półpłynnych, rozlanych do probówek o wymiarach 10×120 mm. Lokalizację lipaz badano metodą dyfuzji na podłożach stałych, rozlanych na płytki Petriego o średnicy 9 cm. W agarze wycinano okrągłe baseniki o pojemności 0,06 ml. Na jednej płytce znajdowało się 6 baseników w odległości 10 mm od siebie.

**Wyciągi bezkomórkowe.** Uzyskiwano je przez wirowanie młodych, 48 godzinnych kultur bakteryjnych w ciągu 30 min przy szybkości 4 tys. obrotów na minutę. Jałowość supernatantów kontrolowano mikroskopowo oraz posiewając je na podłoża Willis-Hobbs.

**Badanie aktywności lipolitycznej.** Półpłynne podłoża z preparatami Tween regenerowano przed posiewem i po ochłodzeniu wysiewano na nie po 0,2 ml kultury bakteryjnej. Inkubację prowadzono w temp. 37°C przez okres 10 dni. Rozkład Tween-ów kontrolowano mikroskopowo, zwracając uwagę na tworzenie się kryształów soli wapniowych kwasów tłuszczowych.

**Badanie lokalizacji lipaz.** Do baseników nanoszono wyciągi bezkomórkowe szczepów. Płytki inkubowano w temp. 37°C przez okres 10 dni, kontrolując codziennie przebieg reakcji. Celem uniknięcia wysychania podłoża w czasie inkubacji, na wieczkach płytek umieszczano jałową, wilgotną ligninę.

## Wyniki i omówienie

Rezultaty badań aktywności lipolitycznej laseczek beztlenowych przedstawia tab. 1.

Tab. 1. Aktywność lipaz laseczek beztlenowych w stosunku do preparatów Tween

Nr szczepu	Tween-20	Tween-40	Tween-60	Tween-80
7	--	+++ (6)	+++ (10)	--
10	--	++ (3)	+++ (10)	--
13	--	+++ (7)	+	(5)
14	--	+++ (7)	--	+(10)
15	--	+++ (10)	--	--
26	--	+++ (7)	--	--
28	--	++ (6)	--	--
29	--	+++ (5)	--	--
II	--	++ (4)	+++ (10)	++ (8)
V	--	++ (6)	--	--
VI	--	+	(7)	--
IX	--	+(10)	--	--

Objaśnienia: +++ = bardzo intensywna krystalizacja w całym słupku podłoża; ++ = średnio intensywna krystalizacja wokół strefy wzrostu drobnoustrojów; + = krystalizacja bardzo słaba, widoczna jedynie mikroskopowo; -- = brak krystalizacji. Cyfry w nawiasach oznaczają czas (w dobach) występowania reakcji od momentu posiewu kultury bakteryjnej.

Badanie lokalizacji lipaz z użyciem wyciągów bezbakteryjnych dało wynik ujemny. W czasie 10-cio dniowej obserwacji nie stwierdzono wystąpienia krystalizacji wokół baseników.

Na podstawie badań aktywności enzymatycznej laseczek beztlenowych na podłożach z preparatami Tween, stwierdzono występowanie reakcji charakterystycznych dla lipaz. Pod wpływem tego enzymu następowało uwalnianie kwasów tłuszczowych, które z chlorkiem wapnia zawartym w podłożu tworzyły sole wapniowe w formie kryształów o swoistej dla każdego kwasu strukturze. Aktywność lipaz badanych drobnoustrojów była różna w stosunku do poszczególnych Tween'ów. Estrы kw. laurynowego (Tween-20) nie były rozkładane przez żaden szczep. Największą aktywność lipaz stwierdzono w stosunku do estrów kw. palmitynowego (Tween-40), które były rozkładane przez wszystkie szczepy. Estrы kw. stearynowego (Tween-60) były rozkładane przez 4 szczepy (33,3%), a estrы kw. oleinowego (Tween-80) przez 2 szczepy (16,6%).

Cechą charakterystyczną wszystkich badanych szczepów było występowanie dodatnich reakcji na podłożach z preparatami Tween najwcześniej w 2 do 4 dni po namnożeniu się laseczek.

Różna była szybkość i intensywność reakcji enzymatycznych. Najwcześniej obserwowano krystalizację Tween'u-40 po upływie 3 dni, najpóźniej po 10 dniach. Przeciętą szybkość reakcji charakterystyczna dla liczniejszej grupy szczepów wynosiła 6—7 dni. Rozkład Tween'u-60 następował znacznie wolniej. Tylko w jednym przypadku trwał on 5 dni, w 3 pozostałych wymagał 10 dni. Tween-80 rozkładany był również wolno — w jednym przypadku 8 dni, w drugim -- 10 dni.

Na 12 badanych szczepów tylko jeden był aktywny w stosunku do trzech preparatów Tween, 5 szczepów w stosunku do 2 Tween'ów, a 6 pozostałych w stosunku do jednego Tween'u.

Po przeanalizowaniu uzyskanych wyników nie stwierdzono zależności pomiędzy intensywnością reakcji enzymatycznych, a czasem potrzebnym do ich wystąpienia. Cechy te, będące wykładnikiem aktywności lipaz, są swoiste dla poszczególnych szczepów.

Stosunkowo powolny rozkład preparatów Tween, zachodzący dopiero po intensywnym namnożeniu się laseczek oraz ujemny wynik reakcji dyfuzji z wyciągami bezkomórkowymi wskazuje na endocellularny, a więc konstytucyjny charakter lipaz badanych szczepów.

## Wnioski

1. Wszystkie badane drobnoustroje beztlenowe izolowane z mączek rybnych posiadają endocellularną lipazę.

2. Enzym ten jest szczególnie aktywny w stosunku do preparatów Tween-40. Nie wykazuje natomiast aktywności w stosunku do Tween'u-20.

3. Szybkość i intensywność rozkładu estrów kwasów tłuszczowych przez lipazy badanych szczepów jest niższa w porównaniu z wzorcowymi lipazami *Cl. botulinum* A i *Cl. sporogenes*, a bardzo zbliżona do właściwości lipaz *Cl. perfringens* i *Cl. bifermentans* (7).

## Piśmiennictwo

- Alford J. A., Elliott L. E.: *Fd. Res.* 25, 296, 1960.
- Alford J. A., Pierce D. A., Sulzbacher W. L.: *Proceeding of the 15-th Research Conference — American Meat Inst. Foundation, University of Chicago* 11, 1963.
- Alford J. A., Pierce D. A., Suggs F. G.: *J. Lipid Res.* 26, 390, 1964.
- Alford J. A., Steinte E. E.: *J. appl. Bact.* 30, 488, 1967.
- Gonzales C., Sierra G.: *Nature* 18, 601, 1961.
- Laurance R. C., Fryer T. F., Reiter B.: *J. gen. Microbiol.* 48, 401, 1967.
- Lencner A. A., Toom M. A., Tamman K. J.: *Labor. Delo* 11, 688, 1967.
- Nashif S. A., Nelson F. E.: *J. Daire Sci.* 36, 459, 1953.
- Pezacki W.: *Zmiany poubojowe w surowcach rzeźnych.* WPZLS, 1961.
- Sebald M., Prevot A. R.: *Annls. Inst. Pasteur* 9—10, 397, 1960.
- Truszczyński M.: *Bakteriologia weterynaryjna.* PWRiL, 1969.
- Willis A. T.: *Anaerobic Bacteriology in Clinical Medicine.* London, Butterworths, 1964.
- Zahaczevski J., Komorowski A.: *Medycyna Wet.* 28, 632, 1972.

Adres autora: Andrzej Komorowski, 31-513 Kraków, ul. Brodowicza 13a.

Коморовски А., Захачевски Е. — Энзиматическая активность липолитических анаэробных палочек.

Исследовали активность липаз анаэробных палочек выделенных из рыбных мук. В качестве жировых субстратов употребляли препараты Tween-20, 40, 60 и 80. Установили высокую активность липаз в отношении к препарату Tween-40 (разлагаемому всеми 12 штаммами), меньшую в отношении к препарату Tween-60 (разлагаемому только 4 штаммами) и Tween-80 (только 2 штаммами). Препарата Tween-20 не разлагал ни один штамм. Процесс гидролиза эстров жирных кислот протекал сравнительно медленно, только после интенсивного размножения микробов. Этот факт, а также отсутствие кристаллизации в реакции диффузии с безклеточными экстрактами, указывает что исследованные липазы имели эндоцеллюлярный характер.

Komorowski A., Zahaczewski J. — **The enzymatic lipolytic activity of anaerobic bacteria.**

There was studied the activity of lipases of anaerobic bacteria isolated from fish meals. Tween-20, 40, 60 and 80 served as substrates. There was found a high activity of lipases against Tween-40 (split by all 12 strains), lower against Tween-60 (split by 4 strains)

and Tween-80 (split by 2 strains). The strains under study did not split Tween-20. Hydrolysis of the esters of fatty acids run relatively slowly, following an intensive multiplication of the bacteria. This fact, as well as, a lack of crystallization in a diffusion test with the extracts free of cells point to an intracellular character of lipases produced by the strains examined.

TERESA MACIAK

## Określenie przynależności gatunkowej drobnoustrojów z rodzaju *Lactobacillus* i *Streptococcus* gr. D (*Enterococcus*) izolowanych z przewodu pokarmowego prosiąt

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Warszawie

Prawidłowe funkcjonowanie przewodu pokarmowego w dużej mierze zależy od stanu ilościowego i jakościowego flory bakteryjnej oraz odpowiedniego stosunku różnych grup drobnoustrojów względem siebie. Do stałych „mieszkańców” przewodu pokarmowego należą między innymi drobnoustroje z rodzaju *Lactobacillus* i *Streptococcus* gr. D (*Enterococcus*). W pracy niniejszej podjęto badania nad określeniem przynależności gatunkowej wspomnianych drobnoustrojów wyizolowanych z różnych miejsc przewodu pokarmowego zdrowych, dotychczas nie leczonych prosiąt.

### Materiał i metody

Drobnoustroje z rodzaju *Lactobacillus* i *Streptococcus* gr. D (*Enterococcus*) izolowano od 8—10 tygodniowych prosiąt rasy wielkiej białej angielskiej. Zwierzęta pochodziły z jednego gospodarstwa; identyczne warunki żywieniowe były zachowane. Stan zdrowia prosiąt nie odbiegał od normy fizjologicznej.

Wyżej wymienione bakterie izolowano z treści poszczególnych odcinków przewodu pokarmowego (żołądek, j. czcze, j. biodrowe, j. ślepe, okrężnica) zwierząt, bezpośrednio po uśpieniu ich eunarkonem, skrwawieniu i otworzeniu jamy brzusznej.

Drobnoustroje z rodz. *Lactobacillus* hodowano na podłożu selektywnym podanym przez Schaedler'a i Dubos'a (21) z dodatkiem 0,3 ml Tween-80/l podłoża a enterokoki na podłożu stanowiącym modyfikację podłoża Schaedler'a i Dubos'a oraz Słanetz'a (12).

Warunki hodowli:

*Lactobacillus* 37°C — 48—72 godz. tlenowo  
*Streptococcus* gr. D 37°C — 48 godz. tlenowo

Identyfikację drobnoustrojów przeprowadzono w oparciu o uzyskany wzrost na w/w podłożach stałych, przesiewy na odpowiednie podłoża płynne, testy biochemiczne i preparaty mikroskopowe.

Próbowi biochemicznym mającym na celu ustalenie przynależności gatunkowej poddano 200 szczepów drobnoustrojów z rodz. *Lactobacillus* i 200 szczepów enterokoków.

Określanie gatunków przeprowadzono na podstawie właściwości fizjologicznych i biochemicznych. W przypadku szczepów *Lactobacillus* badano: zdolność wytwarzania katalazy, gazu w glukozie, wzrost w temp. 15°C i 45°C, rozkład eksuliny, fermentację węglowodanów — arabinozy, celobiozy, laktozy, mannitolu, rafinozy, salicyny, sacharozy, trehalozy, ksylozy, mannozy, maltozy, galaktozy, ramnozy, sorbitolu, inuliny, inositolu, adonitolu, dulcytolu (3, 10, 17, 19, 20, 25). Dla ustalenia gatunków enterokoków pomocnymi były następujące kryteria: wzrost w temp. 10°C i 45°C, wzrost przy pH=9,6, wzrost w 6,5% NaCl, wzrost w 40% żółci, wzrost przy stężeniu tellurynu potasowego 1/2500, oporność na ogrzewanie w temp. 60°C przez 30 min., hemoliza β, hydroliza skrobi, silna redukcja mleka lakmusowego, rozrzedzanie żelatyny, fermentacja węglowodanów — mannitolu, sacharozy, rafinozy, sorbitolu, arabinozy, laktozy (3, 8, 9, 25).

### Wyniki

Uzyskane wyniki zamieszczono w tab. 1 i 2. Badane szczepy *Lactobacillus* były katalazowo-ujemne. Mimo danych z literatury odnośnie

Tab. 1. Przynależność gatunkowa drobnoustrojów z rodzaju *Lactobacillus* wyizolowanych z treści przewodu pokarmowego prosiąt

Gatunek drobnoustroju	Ilość szczepów (%)
<i>L. acidophilus</i>	42
<i>L. plantarum</i>	22
<i>L. fermenti</i>	18
<i>L. brevis</i>	7
<i>L. casei v. casei</i>	7
<b>Razem</b>	<b>100</b>

do możliwości różnicowania poszczególnych gatunków drobnoustrojów z rodzaju *Lactobacillus* (6, 10, 19) i *Streptococcus* gr. D (1, 3, 13)