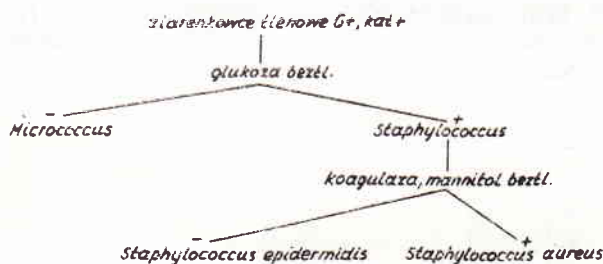


EDWARD ARTECKI, TERESA MACIAK

## Różnicowanie gronkowców i mikrokoków wyizolowanych z mleka krów

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Warszawie

Drobnoustroje tlenowe z rodziny *Micrococcaceae* zaliczane są obecnie do dwóch rodzajów: *Staphylococcus* i *Micrococcus*. Różnicowanie między nimi oraz podział rodzaju *Staphylococcus* na gatunki zostało ujednolicone w 1965 r. przez Podkomitet Taksonomii Gronkowców i Mikrokoków, który opracował standardową metodę klasyfikacji (29). Opiera się ona na zdolnościach beztlenowej fermentacji glukozy i mannitolu oraz wytwarzaniu koagulazy (ryc. 1).



Ryc. 1. Klasyfikacja ziarenkowców tlenowych G+, kat+ wg Podkomitetu Taksonomii Gronkowców i Mikrokoków 1965 r.

Spośród wielu metod klasyfikacji wewnątrzgatunkowej gronkowce i mikrokokki pochodzenia zwierzęcego oznaczane są najczęściej metodą Baird-Parkera (4, 5).

Różnicowanie drobnoustrojów z rodziny *Micrococcaceae* przez badaczy zajmujących się problemem *mastitis* u krów opiera się zazwyczaj na sztywnym podziale klinicznym na szczepy patogenne i niepatogenne. Najczęstszymi kryteriami tego podziału są właściwości hemolityczne i w związku z tym określa się szczepy jako „gronkowce hemolityczne” i „gronkowce niehemolityczne” (14, 22, 27), względnie zdolność wytwarzania koagulazy — „gronkowce koagulazo dodatnie” i „gronkowce koagulazo ujemne” (12, 15, 30). Niektórzy badacze szczepy patogenne określają jako „gronkowce” a niepatogenne „mikrokokki” (23); inni natomiast używają nomenklatury „mikrokokki patogenne” i „mikrokokki niepatogenne” (25). W przypadku stosowania kryterium właściwości hemolitycznych do drobnoustrojów patogennych zaliczane są zazwyczaj także szczepy z gatunku *Staphylococcus epidermidis* wywołujące słabą hemolizę. Przy stosowaniu natomiast w różnicowaniu jedynie testu na koagulazę są one zaliczane razem z mikrokokami do niepatogennych.

Reasumując, powyższe podziały nie pozwalają na właściwe różnicowanie tych bardzo często stwierdzanych w mleku drobnoustrojów, co ma istotne znaczenie w związku z różną ich rolą w etiopatologii *mastitis*. Zmniejsza to również porównywalność wyników badań przeprowadzanych przez różnych badaczy.

Główną przyczyną zapaleń gruczołu mlecznego jest *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus epidermidis* wywołuje na ogół zapalenia o przebiegu podklinicznym a znaczenie jego wzrasta zwłaszcza po wyeliminowaniu ze stada *Staphylococcus aureus* (6, 8). Drobnoustrojem z rodzaju *Micrococcus* nie przepisuje się większego znaczenia w zapaleniach wymienia. Uważane są one powszechnie za normalną mikroflorę wymienia, a wywoływane przez nie podrażnienie gruczołu mlecznego jest zazwyczaj niewielkie i szybko przemijające (15, 35).

*Staphylococcus aureus* jako czynnik przyczynowy *mastitis* budzi zainteresowanie badaczy, zwłaszcza higienistów, w związku z potencjalną możliwością wytwarzania przez te drobnoustroje enterotoksyny. Wykazano jednak, że tylko niewielka liczba szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych z wymienia objętego procesem zapalnym cechuje się właściwościami enterotoksycznymi (11, 32, 33), aczkolwiek istnieją doniesienia i o częstszym występowaniu tej cechy (28).

Celem pracy było przeprowadzenie szczegółowej klasyfikacji gronkowców i mikrokoków wyizolowanych z mleka krów oraz określenie właściwości enterotoksycznych szczepów *Staphylococcus aureus*.

### Materiał i metody

Materiał do badań stanowiło 118 szczepów ziarenkowców Gram-dodatnich, wytwarzających katalazę, wyizolowanych z próbek mleka o normalnej i zwiększonej (> 500.000/ml) liczbie komórek. Badane próby dostarczane były przez weterynaryjne laboratoria diagnostyczne z terenu d. woj. warszawskiego. Identyfikacji szczepów dokonywano wg metodyki Baird-Parkera oraz zaleceń Podkomitetu Taksonomii Gronkowców i Mikrokoków.

Wykonywano następujące testy: rozkład glukozy i mannitolu w warunkach tlenowych i beztlenowych, laktozy, maltozy i arabinozy — w warunkach tlenowych oraz wytwarzania koagulazy, fosfatazy i acetoiny. Ponadto określano właściwości hemolityczne oraz zdolność wytwarzania enterotoksyny przez szczepy *Staphylococcus aureus*.

Podłoże podstawowe oraz określanie zdolności wytwarzania katalazy, koagulazy i rozkładu cukrów wy-

konywano wg zaleceń Podkomitetu Taksonomii (29). Wytwarzanie fosfatazy i acetoiny badano wg Jouberta (21) a hemolizyn — na podłożu agarowym z dodatkiem 7% trzykrotnie przemytych krwinek baranich (31). Zdolności enterotoksyczne wszystkich wyizolowanych szczepów *Staphylococcus aureus* określano metodą precypitacji w żelu agarowym przy użyciu surowic antyenterotoksycznych A, B, C. Sześć szczepów badano przy użyciu surowicy antyenterotoksycznej D, natomiast pozostałych 13 szczepów badano metodą biologiczną na kotach (9, 10)\*. Liczbę komórek w mleku określano metodą elektroniczną przy użyciu licznika cząstek Celloscope 101 (1).

### Wyniki

Wyniki badań zamieszczono w tab. 1 i ryc. 2.

Spośród 118 badanych szczepów na podstawie właściwości biochemicznych 19 (16,1%) określono jako *Staphylococcus aureus*, 25 (21,19%) jako *Staphylococcus epidermidis* a 74 (62,71%) zaliczono do rodzaju *Micrococcus*.

Tab. 1. Wyniki klasyfikacji gronkowców i mikrokoków wyizolowanych z mleka krów

Rodzaj	Szczepy	
	p-grupa	liczba
<i>Staphylococcus aureus</i>		19
I		19
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		25
II		2
III		11
IV		-
V		4
VI		6
niezidentyfikowane		2
<i>Micrococcus</i>		74
I		2
II		-
III		1
IV		3
V		8
VI		7
VII		24
VIII		21
niezidentyfikowane		8
<b>Razem</b>		<b>118</b>
		<b>100,0</b>

W obrębie *Staphylococcus epidermidis* przeważała liczebnie podgrupa III i VI, wśród *Micrococcus* natomiast podgrupa VII i VIII. Dwa szczepy *Staphylococcus epidermidis* oraz 8 *Micrococcus* nie udało się zaszeręgować do żadnej ze znanych podgrup. Stanowi to 8,47% badanych szczepów.

Prawie wszystkie szczepy *Staphylococcus aureus* (94,74%) oraz większość szczepów *Staphylococcus epidermidis* (72%) stwierdzono w mleku o zwiększonej liczbie komórek. Drobnoustroje z rodzaju *Micrococcus* występowały częściej w mleku o normalnej liczbie komórek (64,86%).

Wszystkie szczepy *Staphylococcus aureus* wytwarzały hemolizę  $\beta$  względnie  $\alpha$ - $\beta$ ; większość (70%) szczepów *Staphylococcus epidermidis* — wąską, około 1 mm strefę hemolizy. Szczepy z gatunku *Micrococcus* były niehemolityczne.

Zaden z wyizolowanych szczepów *Staphylococcus aureus* nie wytwarzał enterotoksyny.

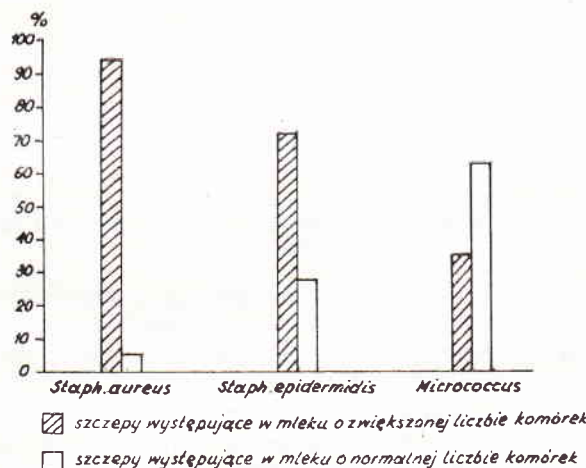
### Omówienie wyników

Uzyskane wyniki badań potwierdzają dużą przydatność metodyki opracowanej przez Pod-

\*) Badania wykonano w Zakładzie Badania Żywności i Przedmiotów Użytku Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie. Autorzy wyrażają podziękowanie p. dr Marii Burbance.

komitet Taksonomii Gronkowców i Mikrokoków do klasyfikacji rodzajowej tlenowych drobnoustrojów w obrębie rodziny *Micrococcaceae*. Metodyka ta pozwoliła także na różnicowanie wszystkich wyizolowanych szczepów gronkowców na gatunki *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*. Takie same wyniki otrzymano za pomocą metody Baird-Parkera. Zgodne to jest z wynikami uzyskanymi przez innych autorów (18, 20). Nie potwierdzono zastrzeżeń odnośnie mniejszej wartości testu beztlenowej fermentacji mannitolu do diagnostyki różnicowej gronkowców pochodzenia zwierzęcego (19). Według autorów wartość tej próby nie budzi zastrzeżeń pod warunkiem ścisłego przestrzegania wymogów obowiązujących przy jej wykonywaniu.

Zastosowanie do klasyfikacji wewnątrzgatunkowej metodyki Baird-Parkera pozwoliło na szczegółowe sklasyfikowanie (podgrupy) około 90% szczepów. Podobne wyniki uzyskano w innych badaniach (8, 16, 31). W związku z tym wydają się być słuszne sugestie (19) wprowadzenia pewnych uzupełnień do tej metodyki.



Ryc. 2. Gronkowce i mikrokokki wyizolowane z mleka krów o normalnej i zwiększonej liczbie komórek (%)

Wyniki badań potwierdzają fakt dużej patogenności *Staphylococcus aureus*, czego odzwierciedleniem jest wyizolowanie 94,74% szczepów tego drobnoustroju z mleka pochodzącego od krów z procesem zapalnym wymienia (13, 17, 24, 25, 32). Także znaczny odsetek (74%) szczepów *Staphylococcus epidermidis* izolowany był z mleka zawierającego zwiększoną liczbę komórek. Natomiast drobnoustroje z rodzaju *Micrococcus* zwykle (64,86%) stwierdzano w mleku o normalnej liczbie komórek. Z rodzaju *Staphylococcus epidermidis* najczęściej stwierdzano jako przyczynę procesów zapalnych wymienia szczepy z podgrupy III i VI, co zgodne jest z danymi innych autorów (7, 31).

Wytwarzanie hemolizy  $\beta$  względnie  $\alpha$ - $\beta$  przez wszystkie izolowane ze stanów zapalnych wymienia szczepy *Staphylococcus aureus* po-

twierdzą również wcześniejsze doniesienia (24, 26, 31). Większość szczepów *Staphylococcus epidermidis* wytwarzało wąską strefę hemolizy. Natomiast szczepy z gatunku *Micrococcus* są z reguły niehemolityczne.

Zdaniem autorów właściwości hemolityczne mogą być podstawą rutynowej diagnostyki tlenowych drobnoustrojów z rodziny *Micrococcaceae* pod warunkiem stosowania właściwego podłoża tzn. odpowiedniego agaru odżywczego i odpowiedniej krwi baranej. Odnośnie pierwszego składnika obserwowano zróżnicowanie wyrazistości hemolizy na różnych podłożach dostępnych w kraju (3). Krew natomiast, zwłaszcza od zwierząt starszych może zawierać antyhemolizyny, w związku z czym konieczna jest kontrola gotowego podłoża przy użyciu szczepów wzorcowych, względnie używanie przemytych trzykrotnie krwinek. Przy odczytach posiewów mleka na podłożach z krwią należy także mieć na uwadze możliwość występowania hemolizy pod wpływem samego mleka lub pseudohemolizy dookoła kolonii niektórych szczepów mikrokoków, w miejscach, w których jest grubsza warstwa mleka na podłożu (2).

Nie stwierdzono wytwarzania enterotoksyny przez badane szczepy *Staphylococcus aureus* potwierdza sporadyczne występowanie enterotoksycznych szczepów wywołujących zapalenie wymienia u krów (11, 32, 33, 34). W badaniach przeprowadzonych na większym materiale pochodzącym także od krów z terenu d. woj. warszawskiego również nie stwierdzono występowania szczepów enterotoksycznych (10). W związku z powyższym wydaje się być słuszną opinią, że obecność w mleku szczepów *Staphylococcus aureus* wywołujących zapalenie wymienia u krów stanowi małe zagrożenie dla konsumentów mleka i przetworów mlecznych.

### Wnioski

1. Potwierdzono dużą przydatność metodyki zalecanej przez Podkomitet Taksonomii Gronkowców i Mikrokoków do klasyfikacji tlenowych drobnoustrojów z rodziny *Micrococcaceae* wyizolowanych z mleka krów.

2. Znaczną wartość w diagnostyce rutynowej gronkowców i mikrokoków posiadają właściwości hemolityczne pod warunkiem stosowania właściwego podłoża.

3. Badane szczepy *Staphylococcus aureus* nie wytwarzały enterotoksyny.

### Piśmiennictwo

1. A Monograph on Bovine Mastitis — Part I, Annual Bulletin 1971, International Dairy Federation, Brussel.
2. Ardecki E.: dane nieopublikowane.
3. Ardecki E., Zaleska-Schönthaler N.: Wpływ rodzaju podłoża na wynik CAMP — testu (w przygotowaniu do druku).
4. Baird-Parker A. C.: J. gen. Microbiol. 30, 409, 1963.
5. Baird-Parker A. C.: J. gen. Microbiol. 38, 363, 1965.
6. Blackburn P. S.: Br. vet. J. 125, 504, 1969.
7. Brown R. W.: Cornell Vet. 63, 630, 1973.
8. Brown R. W., Sandvik O., Scherer O. R. K., Rose D. L.: J. gen. Microbiol. 47, 273, 1967.
9. Burbianka M.: Roczniki PZH 20, 55, 1969.

10. Burbianka M.: Prz. epid. 25, 229, 1971.
11. Casman E. P., Bennet R. W., Dorsey A. E., Issa J. A.: J. Bact. 94, 875, 1967.
12. Edwards S. J., Jones G. W.: J. Dairy Res. 33, 261, 1966.
13. Elliot R. E. W.: New Zealand vet. J. 19, 95, 1971.
14. Elliot R. E. W., Jones A. S.: New Zealand vet. J. 19, 165, 1971.
15. Fluharty D. M.: Proceedings of the Seventy — First Annual Meeting, United States Livestock Sanitary Assn. 450, 1967.
16. Forbes D.: J. appl. Bact. 31, 426, 1968.
17. Glawischnig E., Mahn Emami, Neumeister E.: Wien. tierärztl. Mschr. 55, 792, 1968.
18. Hájek V., Marsálek E.: Zbl. Bakt. ParasitKde I. 209, 154, 1969.
19. Hájek V., Marsálek E.: Zbl. Bakt. ParasitKde I. 217, 176, 1971.
20. Heeschen W., Reichmuth J., Tolle A., Zeidler H.: Zbl. Bakt. ParasitKde I. 213, 333, 1970.
21. Joubert L., Buissiere J.: Soc. Sci. Vet. et Med. comparee Lion. 70, 317, 1968.
22. Kowalczyk S., Zaboklicki K.: Problemy użytkowania mlecznych krów. Warszawa — Poznań, 1972.
23. Mastitis in Western Australian Dairy Cattle. The Mastitis Committee Department of Agriculture Western Australia, 1967.
24. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Mastitis, National Mastitis Council, Washington, 1967.
25. Miller D. D.: Leucocyte Counts as an Index of Pathogenic Micrococci in Milk. New Mexico State University, Agricultural Experiment Station, Research Report 150, 1969.
26. Munch-Peterson E., Gardner M. R.: Austr. vet. J. 41, 5, 1965.
27. Neumeister E.: Wien. tierärztl. Mschr. 57, 1, 1970.
28. Ostaszewski A. G., Obraczow W. P.: Wietierinaria 9, Kijów, 1966.
29. Subcommittee on Taxonomy of Staphylococci and Micrococci. Int. Bull. bactNomencl. Taxon. 15, 109, 1965.
30. Tarkiewicz S.: Badania nad gronkowcami izolowanymi z gruczołu mlecznego krów klinicznie zdrowych. Problemy użytkowania mlecznych krów, Warszawa — Poznań, 1972.
31. Terplan G., Gedek W.: Arch. Lebensmitelhyg. 16, 203, 1965.
32. Terplan G., Zaadhof K. J.: Dt. tierärztl. Wschr. 76, 217, 1969.
33. Untermann F.: Arch. Hyg. Bakt. 153, 421, 1969.
34. Untermann F., Husch D., Lupke H.: Milchwissenschaft 11, 28, 1973.
35. Ward G. E., Schulz L. H.: J. Dairy Sci. 55, 1428, 1972.

Adres autora: lek. wet. Edward Ardecki, Lechicka 21, 02-156 Warszawa.

Артечки Э., Мацяк Т. — Дифференцирование стафилококков и микрококков изолированных из молока коров.

Исследовали 118 штаммов бактерий из фамилии *Micrococcaceae* выделенных из молока коров. Классификацию провели по методу Baird-Parker с учетом указаний Подкомитета для Таксономии Стафилококков и Микрококков. Энтеротоксические способности изолированных штаммов *Staphylococcus aureus* определяли методом преципитации в агаровом геле и биопробой на коцах. Количество соматических клеток установили электронически.

Из 118 исследованных штаммов 19 (16,1%) отнесли к виду *Staphylococcus aureus*, 25 (21,19%) к виду *Staphylococcus epidermidis*, 74 (62,71%) к роду *Micrococcus*. В пределах вида *Staph. epidermidis* преобладали количественно штаммы групп III и VI, а среди штаммов *Micrococcus* группы VII и VIII. Десяти штаммов (8,47%) *Staph. epidermidis* и *Micrococcus* не удалось причислить к какой либо известной группе. Почти все штаммы *Staph. aureus* (94,74%) и большинство штаммов *Staph. epidermidis* (72,0%) были выделены из молока с повышенным содержанием соматических клеток, в противоположность штаммам рода *Micrococcus* которые выступали чаще в молоке с нормальным содержанием клеток (64,86%). Ни один их изолированных штаммов *Staph. aureus* не выделял энтеротоксина.

Ardecki E., Maciak T. — Differentiation of Staphylococci and Micrococci isolated from bovine milk.

There were studied 118 strains of *Micrococcaceae* family isolated from bovine milk. The classification of the strains were based on Baird-Parker's and the Recommendations of the Subcommittee for the Staphylococci and Streptococci Taxonomy. Enterotoxinogenic properties of the isolated strains of *Staph. aureus* were determined by means of agar gel pre-

cipitation test and biologically on kittens. The number of cellular elements in milk was estimated electronically. 19 out of 118 strains under study (16,1%) was determined as *Staph. aureus*, 25 (21.19%) as *Staph. epidermidis*, 74 (62.71%) as *Micrococcus*. Within the strains of *Staph. epidermidis* mainly were found of group III and VI, and within *Micrococcus* — VII and VIII. There were not possible to classify serologically

10 strains (8.47%) of *Staph. epidermidis* and 8.47% strains of *Micrococcus*. Almost all of the strains of *Staph. aureus* (94.74%) and most of *Staph. epidermidis* (72.0%) were isolated from milk with an increased number of cellular elements. *Micrococci* were isolated more often from milk with normal value of cellular elements (64.86%). The isolated strains of *Staph. aureus* were not enterotoxinogenic.

LEONARD WIDERA  
Gdynia

## Poziom tlenku trójmetyloaminy i lotnych zasad amonowych jako wskaźniki sanitarne surowców rybnych

Pośmiertne procesy biochemiczne zachodzące u ryb, głównie na tle przemian mikrobiologicznych, prowadzą do wystąpienia niepożądanych wskaźników, charakterystycznych dla niewłaściwej jakości sanitarnej artykułów rybnych. Szereg tych wskaźników wykorzystuje się, poprzez ich ilościowe oznaczanie do określenia stopnia świeżości ryb przeznaczonych do dalszego przechowywania, przetwórstwa i obrotu. W wielu krajach metody badań zmian ilościowych niektórych związków chemicznych znajdują szerokie zastosowanie (2, 4, 9, 10). W Polsce poza nielicznymi ośrodkami, metody te nie są praktycznie wykorzystywane (5, 7, 8, 12, 13). Fakt ten wynika m.in. z hedonicznego charakteru obowiązujących norm polskich jak i braku odpowiedniego zaplecza laboratoryjnego, dla potrzeb służb kontrolnych w przemyśle rybnym.

Spśród szerokiej grupy wskaźników chemicznych, duże znaczenie przypisuje się badaniom zawartości tlenku trójmetyloaminy (TMAO) i lotnych zasad amonowych (LZA) (1, 2, 3, 6, 9, 11, 12). Lotne zasady amonowe są to niebiałkowe związki azotowe występujące w mięśniach ryb jako substraty i produkty przemian biochemicznych (4, 5, 6, 8). Odgrywają one szczególną rolę w kształtowaniu się *post mortem* cech organoleptycznych tkanki mięśniowej, głównie w zakresie smaku, zapachu i tekstury (2, 4, 6, 9, 10, 11, 14). Do grupy tzw. lotnych zasad amonowych zalicza się trójmetyloaminę (TMA), dwumetyloaminę (DMA), monometyloaminę (MMA), oraz amoniak (2, 4, 7, 12, 14).

Specyficznym związkiem chemicznym jest natomiast tlenek trójmetyloaminy (TMAO) występujący głównie u ryb morskich (1, 2, 9, 11). Związek ten przyżyciowo odgrywa u tych ryb poważną rolę w utrzymywaniu stałej osmolarności krwi (9, 11). Badania Kutschery i Ackermana wykazały, że TMAO powstaje na drodze

metylowania i oksydacji rozłożonych białek (9). U niektórych gatunków ryb słodkowodnych stwierdzono także występowanie TMAO, lecz w ilościach wyraźnie niższych aniżeli u ryb morskich. Przeciętnie u ryb słodkowodnych zawartość TMAO w tkance mięśniowej, w zależności od gatunków, waha się w zakresie od 4,5 mg%N do 91,5 mg%N, wobec 150 mg%N do 330 mg%N u ryb morskich kostnoszkieletowych i 1080 mg%N do 1462 mg%N u ryb morskich spodoustych (raje, rekiny) (11). Ryby przemieszczające się z wód słodkich do morskich cechują się dużą zmiennością poziomu TMAO. U węgorzy bytujących w wodach słodkich zawartość TMAO wynosiła 4,5 mg%N a w momencie przejścia do środowiska morskiego poziom ten wzrastał do 60 mg%N w tkance mięśniowej (9, 11). Wynika więc z tego fakt, że poziom TMAO u ryb związany jest ze specyficzną budową układu moczowego poszczególnych gatunków, stopniem zasolenia wody a także procesami regulującymi osmolarność krwi.

W czasie przechowywania złowionych ryb, wskutek działalności enzymów tkankowych i przemian mikrobiologicznych TMAO ulega redukcji do trójmetyloaminy (TMA) (1, 2, 5, 8, 9, 10). Intensywność postępowania procesów degradacji TMAO do TMA uwarunkowana jest długością czasokresu przechowywania, temperaturą otoczenia i wielkością stopnia bakteryjnego zakażenia (4, 5, 6). Proces ten przebiega znacznie wyraźniej u ryb świeżych lodowanych aniżeli u ryb mrożonych tuż po złowieniu (9, 10, 11). U ryb mrożonych długość okresu wyczekiwania przed zamrożeniem rzutuje wyraźnie na poziom TMA (16). Toteż badania zmian ilościowych TMAO i TMA w surowcach rybnych mogą być pomocne w celu określenia przydatności konsumpcyjnej i technologicznej (8, 9, 10, 11, 13). Propozycje takie wysuwane są przez Międzynarodową Komisję Kodeksu