

Адамчик Э., Хмелёвский В. — Применение микроволн в дополнительных послепойных исследованиях.

Применили микроволны в дополнительных послепойных органолептических исследованиях свиней. Пробы мяса крипторхов и поздних кастратов подвергали термической обработке в камере микроволновой кухни:

— в опытах с жарением 1—2 мин.,

— в опытах в варении 3—4 мин.

Констатировали, что микроволны ведут к более быстрому и более интенсивному освобождению анализируемых проб от чуждых запахов.

Adamczyk E., Chmielowski W. — The application of microwaves in post-slaughtered examinations.

Microwaves were used for additional organoleptic examinations in pigs. The samples of meat from animals with cryptorchism and late-castrated pigs were heated in a microwave-cooker for: a) 1—2 minutes to fry the samples, b) 3—4 minutes to cook them. It was found that microwaves caused the rapid and intensive emanation of strange odours from the samples under study.

EWA WITTLIN

Aktualne kierunki badań gronkowców enterotoksycznych

Z Samodzielnej Pracowni Mikrobiologii i Biochemii Produktów Zwierzęcych
Instytutu Weterynarii w Puławach z siedzibą w Warszawie

Zatrucia pokarmowe o etiologii gronkowcowej należą w wielu krajach do najczęściej występujących intoksykacji. W Polsce wg statystyk z lat 1971—1973 zatrucia gronkowcowe zajmowały drugą pozycję, po zatruciach wywołanych przez pałeczki *Salmonella*.

Czynnikiem będącym bezpośrednio przyczyną wywołania zatruc gronkowcowych jest enterotoksyna wytwarzana w żywności przez niektóre szczepy gronkowców, zwłaszcza *S. aureus*. Obecność enterotoksyny w środkach spożywczych nie wpływa na ich właściwości organoleptyczne. Średnia dawka toksyczna enterotoksyny dla człowieka, wywołująca objawy wymiotne, wynosi około 10—15 µg co równa się około 0,2 µg na jeden kilogram ciężaru ciała (1). Wielkość dawki toksycznej zależy jest od wrażliwości poszczególnych osób i od typu enterotoksyny. Do chwili obecnej poznano i wyizolowano 7 enterotoksyn gronkowcowych. Oznaczono je literami alfabety: A, B, C₁, C₂, D, E, F. Według Ray'a i Bergdoll'a (21) dla enterotoksyny A dawka toksyczna wynosi 0,1 µg/kg ciężaru ciała, dla enterotoksyny B 25 µg. Enterotoksyna A wytwarzana jest najczęściej przez szczepy izolowane z przypadków zatruc pokarmowych, enterotoksyna B natomiast przez szczepy powodujące *enterocolitis pseudomembranacea*. Szczepy wytwarzające enterotoksyny C₁, C₂ wyizolowano z przypadków klinicznych, z produktów żywnościowych mrożonych, z przypadków zatruc pokarmowych, a także od ludzi nosicieli. Gronkowce produkujące enterotoksynę D wyodrębniono z przypadków zapalenia wymienia u krów, z przypadków klinicznych, z produktów żywnościowych. Podobnie gronkowce produkujące enterotoksynę E. Enterotoksyna F jest dotychczas najmniej poznana. Jeden szczep gronkowcowy może równocześnie wytwarzać kilka enterotoksyn. Z przypadków zatruc pokarmowych niejednokrotnie izolowano szczepy produkujące równocześnie toksynę A i D, rzadziej B i C, czy A, B, C.

Wzrost gronkowców oraz produkcja enterotoksyny zależna jest między innymi od skład-

ników podłoża. W warunkach laboratoryjnych enterotoksyna lepiej jest wytwarzana w podłożach półpłynnych i w atmosferze zawierającej 25—30% CO₂ niż w warunkach hodowli tlenowej na podłożach płynnych. Surgalla (25) stwierdził, że enterotoksyna może być jeszcze wytwarzana w podłożu zawierającym tylko dwa aminokwasy — cystynę i argininę oraz glukozę w ilości powyżej 0,2%. Na podłożach ubogich w aminokwasy wytwarzanie enterotoksyny jest słabsze.

S. aureus posiada zdolność wzrostu w zakresie temperatur 6,7—45°C. Wytwarzanie enterotoksyn zahamowane jest w temperaturze poniżej 10°C. Optymalna temperatura dla wytwarzania enterotoksyny wynosi 35°—37°C, a optymalne początkowe pH 7,2—7,6. *S. aureus* może rosnąć w granicach pH 4,5—9,5.

Hurst i wsp. (9) badali wpływ zawartości glukozy i poziomu pH na wzrost i produkcję enterotoksyny B przez *S. aureus* szczep S₆ po zadziałaniu ciepłem w buforze fosforanu sodu lub potasu. Komórki uszkodzone przez ogrzewanie w 52°C przez 15 minut w buforze fosforanu sodu („komórki Na”) lub fosforanu potasu („komórki K”) namnażano w podłożu zawierającym 0,01% i 1% glukozy. Kontrolę stanowiły hodowle nieogrzone, które przy 0 i 0,1% glukozy powodowały obniżenie pH, czego nie wykazywały komórki ogrzewane. Synteza enterotoksyny B przez „komórki Na” w obecności 1% glukozy była zahamowana do około 80%, przez „komórki K” do około 99%, a w hodowlach kontrolnych do około 90%. Morse i wsp. (16) wykazali natomiast, że enterotoksyna B nie jest w ogóle wytwarzana w obecności 1% glukozy w podłożu.

Tatini i wsp. (26) zbadali wpływ preparatów białkowych dodawanych do środków spożywczych, a mianowicie: białka sojowego (Promine D i SP), koncentratu białka rybnego (FPC), drożdży piwnych lub drożdży grzyba drożdżowego na wzrost *S. aureus* Z88 i produkcję enterotoksyny A, D. W doświadczeniu stosowano płynne podłoża, zawierające ekwiwalent wynoszący 1,8% każdego białka. *S. aureus* rósł szybciej i wytwarzał enterotoksynę na podłożu drożdżowym niż sojowym lub konceneracie białka rybnego. Enterotoksynę A wykrywano w hodowli na podłożu z dodatkiem preparatu drożdżowego po 6 godzinach, a obie toksyny A i D po 12 godzinach inkubacji. W FPC enterotoksyna A była wykrywana po 24 godzinach inkubacji i po 50 krotnym zagęszczeniu supernatantu. Ani toksyna A, ani toksyna D nie były wykryte w podłożu SP po 24 godzinach i 48 godzinach inkubacji nawet po 100-krotnym zagęszczeniu supernatantu.

Istotny wpływ na wzrost gronkowców i wytwarzanie enterotoksyny ma aktywność wody (a_w) środowiska. Dla *S. aureus* minimalny poziom a_w , przy którym następuje zahamowanie wzrostu wynosi 0,85 w warunkach tlenowych i 0,90 w warunkach beztlenowych. Hill (29) na podstawie wykonanych badań ustalił najniższy poziom a_w 0,83 (np. pieczona wołowina). Wg Scott'a (23) wartość ta wynosi 0,86. W papce z krewetek oraz uwodnionym cieście z ziemniaków zbadano zdolność wzrostu i produkcję enterotoksyny przez *S. aureus* szczep 243 C wytwarzający enterotoksynę B oraz szczep 196 E wytwarzający enterotoksynę A (28). W papce z krewetek przy a_w 0,89 wzrost szczepu 196 E był zahamowany, szczep C 243 росł słabo. Oba szczepy rosły począwszy od poziomu a_w 0,91. Szczep 196 E wytwarzał wykrywalne ilości enterotoksyny w papce z krewetek przy a_w 0,95, a szczep 243 przy a_w 0,93. Poziom a_w warunkuje ciepłoporność gronkowców (8). Maksymalną przeżywalność w temperaturze 55°C stwierdzono przy a_w 0,997. Obniżenie oporności około dziesięciokrotne następowało już przy a_w 0,98. Najwyższą przeżywalność *S. aureus* stwierdzano przy niższych poziomach aktywności wody w środowisku z glicerolem (a_w 0,965), z NaCl (a_w 0,92) lub cukrzą (a_w 0,90).

Cechą charakterystyczną *S. aureus*, wykorzystywaną przy izolowaniu szczepów jest zdolność wzrostu przy wysokich stężeniach NaCl, nawet do 15%. Stężenie 3% NaCl obniża już jednak ilość wytwarzanej enterotoksyny, a stężenie 10% w bardzo znacznym stopniu hamuje wytwarzanie enterotoksyny i częściowo hamuje wzrost (12). Stwierdzono zależność między kwasowością oraz stężeniem NaCl w podłożu a wytwarzaniem enterotoksyny. W bulionie o pH 6,9 enterotoksyna B jest jeszcze wytwarzana przy stężeniu NaCl 10% natomiast przy początkowym pH 5,1 enterotoksynę B wykrywano tylko w obecności 4% NaCl. Azotan i azotyn sodowy w stężeniach dopuszczalnych w żywności nie mają wpływu na wzrost gronkowców i produkcję enterotoksyny (12).

Enterotoksyna gronkowcowa charakteryzuje się bardzo znaczną opornością na działanie enzymów proteolitycznych (trypsyny, chymotrypsyny, reniny, papainy), staje się wrażliwa na ich działanie dopiero po utlenieniu.

Effekt działania wysokiej temperatury na enterotoksynę zależy od środowiska. Na przykład w mleku temperatura pasteryzacji nie gwarantuje zniszczenia zawartej enterotoksyny. Ogrzewanie w środowisku mięsa przyspiesza inaktywację (19). W temperaturze 121°C enterotoksyna ulega zniszczeniu po 8 minutach ogrzewania. Enterotoksyna wykazuje mniejszą wrażliwość na ogrzewanie przy pH 6,4 niż 4,5 lub 7,5. Zaobserwowano, że enterotoksyna B inaktywowana w znacznym stopniu przez ogrzewanie w temperaturze 70–80°C odzyskuje częściową aktywność po ponownym ogrzewaniu przez 6 minut w temperaturze 100°C (10).

W produktach żywnościowych poddanych obróbce cieplnej enterotoksyna wytwarzana jest silniej niż w surowych. Spowodowane jest to prawdopodobnie m. in. brakiem innych drobnoustrojów. Stwierdzono, że drobnoustroje: *Proteus mirabilis*, *Salmonella enteritidis*, *Serratia marcescens*, *Salmonella plymuthica* hamują wytwarzanie enterotoksyny bez wpływu na wzrost gronkowców. Autorzy ci stwierdzili korzystny wpływ *Bacillus cereus* na wzrost gron-

kowców i stymulujący na wytwarzanie enterotoksyny A. Wynik ten nie znalazł potwierdzenia w pracy Maleszewskiego i Windygi (13).

W mleku badano antagonizm zachodzący między paciorkowcami mlekowymi i *S. aureus* (7). Wykazano, że hamowanie gronkowców przez paciorkowce mlekowe nie jest właściwe niskiemu pH. Nadtlenek, antybiotyki produkowane przez niektóre szczepy paciorkowców wpływają na zahamowanie wzrostu *S. aureus*.

Badania wzrostu i wytwarzania enterotoksyny przez *S. aureus* szczep S w połączonej hodowli z *Pseudomonas aeruginosa* wykazały, że po 24 godzinnej inkubacji 99,9% populacji gronkowców straciło tolerancję na NaCl w stężeniu 7,5%. Wytwarzanie enterotoksyny było zmniejszone (4).

W badaniach mających na celu wykrycie gronkowców chorobotwórczych w żywności stosuje się posiewy ilościowe do selektywnego podłoża Giolitti-Cantoni i na podłoże Baird-Parkera. Rzadziej stosowane jest podłoże Cartera i Chapmana. Żadne z wymienionych podłoży nie wykazuje 100% wykrywalności (18).

W Wielkiej Brytanii przeprowadzono badania 11 selektywnych podłoży pod względem ich przydatności w wykrywaniu gronkowców chorobotwórczych. Żadne z podłoży nie było wystarczająco selektywne dla koagulazododatnich gronkowców. Dla ostatecznego potwierdzenia podejrzane gronkowce muszą być zawsze testowane na wytwarzanie koagulazy (20).

W rutynowym badaniu żywności podział na gronkowce chorobotwórcze i niechorobotwórcze oparty jest głównie na zdolności wytwarzania koagulazy towarzyszącej najczęściej wytwarzaniu enterotoksyny. Przyjmuje się że około 50% koagulazododatnich gronkowców jest równocześnie enterotoksycznych (1). Casman i wsp. (3) wykazali, że w przesączach hodowli gronkowców izolowanych z zatrut żywnością w 92,6% obecna była enterotoksyna, a wg Simkovicowej i Gilbert'a w 92% (24).

Próby na koagulazę wykonuje się przy użyciu plazmy króliczej. Próby zastąpienia plazmy króliczej świńską nie dały zadowalających wyników (17). Devoyod i wsp. (5) zastosowali podłoże (PPSA), pozwalające na bezpośrednie stwierdzenie obecności gronkowców koagulazododatnich. Skład podłoża oparty jest na agarze Baird-Parkera pozbawionym żółtka jaja, natomiast wzbogaconym plazmą krwi świńskiej. Kolonie koagulazododatnich szczepów *S. aureus* na tym podłożu po inkubacji w 37°C w ciągu 24–48 godzin otoczone są strefą wytrąconego włókna.

Właściwością często towarzyszącą wytwarzaniu enterotoksyny przez gronkowce jest wytwarzanie lipazy i fosfatazy. Produkcja lipazy przez *S. aureus* może ulegać zmianom zależnie od warunków. Środowisko o temperaturze 37°C i pH 7,5 jest optymalne dla wytwarzania tego enzymu. Wg Mates'a i Sadukiewicza (15) syntetyczne podłoże optymalne dla produkcji enzymu powinno zawierać 2% peptonu. Tween dodany do podłoża obniża ilość syntetyzowanej lipazy. Węglowodany takie jak glukoza i glicerol, hamują produkcję lipazy. Natomiast salicyna, inulina, rafinoza, substancje, które nie są metabolizowane przez bakterie nie hamują ani nie pobudzają syntezy enzymu. Taurocholan sodu dodawany do podłoża nie wpływa na wzrost bakterii, ale zmniejsza ilość produkowanej lipazy. Zbadano

zdolność wytwarzania lipazy przez koagulazododatnie szczepy *S. aureus* oraz szybkość rozkładu czterech kwasów tłuszczowych: kwasu laurynowego, kwasu palmitynowego, kwasu stearynowego, kwasu oleinowego, (11). Wśród zdecydowanej większości badanych szczepów 82,3% wytwarzało lipazę, ale tylko 18,9% szczepów hydrolizowało estry ww. kwasów tłuszczowych, 72,4% trzy estry, 8,7% jeden. Lipaza wytwarzana przez gronkowce charakteryzowała się większą aktywnością w stosunku do estrów kwasu palmitynowego i stearynowego niż laurynowego i oleinowego. Szybkość lipolizy wynosiła w przybliżeniu 24–36 godzin.

Szczepy *S. aureus*, zwłaszcza enterotoksyczne, produkują zewnątrzkomórkową nukleazę (dezoksyrybonukleazę) (27). Jest ona ciepłooporna oraz może być szybko oznaczana przy zastosowaniu taniej i prostej metody. Przeprowadzone badania wskazują na użyteczność próby na dezoksyrybonukleazę jako metody służącej do określania gronkowców potencjalnie enterotoksycznych.

Wiele szczepów gronkowców jest nosicielami swoistych bakteriofagów. Dotychczas stwierdzono 22 fagi, które są podzielone na podstawie wspólnego działania na 5 grup. Szczepy izolowane z przypadków zatruc pokarmowych w większości należą do III i IV grupy. Ostatnio oprócz wzoru fagowego do identyfikacji gronkowców zastosowano oznaczanie wzoru lizogenego szczepu.

Pierwsze próby bezpośredniego określania enterotoksyczności szczepów *S. aureus* opierały na badaniach biologicznych na wrażliwych zwierzętach, jakimi są koty i małpy. Uzyskanie enterotoksyny w postaci czystych preparatów oraz przygotowanie swoistych surowic pozwala zastąpić próby biologiczne metodami serologicznymi, a mianowicie metodą immunodiffuzji w żelu agarowym (metoda Oudin'a) dla oznaczania rozpuszczonych antygenów, metodą immunofluorescencji, metodą płytkową Outchertlony, czy jej modyfikacją — metodą precipitacji szkiełkowej. Bardziej udoskonaloną metodą wykrywania enterotoksyny jest jej bezpośrednie oznaczanie w wyciągach z żywności. Obecność składników organicznych (produkowanych przez gronkowce) w badanej żywności obniża znacznie wykrywalność enterotoksyny metodami serologicznymi. Aktualnie większość metod przygotowania wyciągów w żywności do badania serologicznego enterotoksyny opiera się na metodzie chromatografii.

Casman i Benett (2) opracowali metodę przygotowania zagęszczonych wyciągów z żywności przez zastosowanie chromatografii na kolumnie z karboksymetylocelulozą. Reiser i wsp. (22) zaproponowali metodę wykrywania enterotoksyny w żywności obejmującą kolejno: kilkakrotne wirowanie wodnego supernatantu przy odpowiednio zmienianym pH, ekstrakcji enterotoksyny z wodnego supernatantu przy pomocy wymiennika jonowego — żywicy, a następnie oddzielenie enterotoksyny za pomocą dwuzasadowego fosforanu sodu. Tak otrzymana enterotoksyna wykrywana jest serologicznie. Genigeorgis i Krus zastosowali dla wykrycia enterotoksyny B metodę chromatografii, której zasadą jest izolacja enterotoksyny w oparciu o jej właściwości biologiczne. W metodzie tej 400 ml wyciągu ze 100 g żywności poddane było działaniu określonej antyenterotoksyny związanej

ze specjalnie przygotowaną matrycą. Podczas 2 godzinnej reakcji w temperaturze pokojowej immunoglobulina B przeciwciała zostaje związana z CNBr aktywnej Sepharose 4B. Kompleks Sepharose-przeciwciała w temperaturze 4°C jest w stanie związać od 0,1 do 30 g enterotoksyny B z 400 ml wyciągu z żywności. Z kompleksu Sepharose-przeciwciała-toksyna przemytego roztworem soli fizjologicznej, roztworem glicyny i buforu następuje odłączenie toksyny, która wykrywana jest serologicznie. Autorzy ww. pracy kontynuują badania nad równoczesnym przyłączeniem 5 przeciwciał (A, B, C, D, E) do Sepharose, co umożliwiło by równoczesne wykrywanie kilku toksyn.

Przeprowadzane próby zastosowania metod serologicznych do bezpośredniego wykrywania enterotoksyny w wyciągach z żywności nie dały dotychczas zadowalających wyników. Próby zastosowania odczynu zahamowania hemaglutynacji ze względu na występowanie odczynów nieswoistych również nie dały zadowalających wyników, natomiast z powodzeniem stosowana jest metoda odwróconej biernej hemaglutynacji.

Stosowanie metod serologicznych ograniczone jest przede wszystkim trudnościami w uzyskaniu swoistych surowic, a także oczyszczonych enterotoksyn. Metody stosowane dotychczas w badaniach rutynowych do określenia enterotoksyczności gronkowców oparte są na około 50% prawdopodobieństwie, co wskazuje na konieczność podejmowania dalszych badań w tym zakresie.

Piśmiennictwo

1. Baird-Parker A. C.: J. appl. Bact. 34, 181, 1971.
2. Casmann E. P., Benett R. W.: Appl. Microbiol. 13, 181, 1965.
3. Casmann E. P., Benett R. W., Dorsey A. E., Issa J. A.: J. Bact. 94, 1875, 1967.
4. Collins-Thompson D. L., Avis B., Hurst A.: Can. J. Microbiol. 19, 1197, 1973.
5. Devoyod J. J., Millet L., Mocquot G.: Can. J. Microbiol. 22, 1603, 1976.
6. Genigeorgis C., Krus J. K.: Appl. Environm. Microbiol. 31, 274, 1976.
7. Gilland S. E., Speck M. L.: Appl. Microbiol. 28, 1090, 1974.
8. Horner K. J., Angnostopoulos G. D.: J. appl. Bact. 38, 9, 1975.
9. Hurst A., Collins-Thompson D. L., Kruse H.: Can. J. Microbiol. 19, 823, 1973.
10. Jamlang E. M., Barrlett M. L., Snyder H. E.: Appl. Microbiol. 22, 1034, 1971.
11. Komorowski A., Damm A., Ramisz A.: XVIII Zjazd PTM. Lublin 1975.
12. Mc Lean R. A., Lilly H. D., Alford J. A.: J. Bact. 95, 1207, 1968.
13. Maleszewski J., Windyga B.: Roczniki PZH 517, 1975.
14. Miścha E.: J. Bact. 92, 277, 1966.
15. Mates A., Sadukiewicz D.: J. appl. Bact. 36, 219, 1973.
16. Morse S. A., Muir R., Dobrogrosz W. J.: J. Bact. 98, 4, 1969.
17. Payne D. N., Wood J.: J. appl. Bact. 37, 319, 1974.
18. Piszka A., Meinhardt S., Smykal B. i wsp.: Roczniki PZH 533, 1970.
19. Piszka R.: Roczniki PZH 49, 1967.
20. Report from Working Party the Public Health Labor Service: J. appl. Bact. 35, 673, 1972.
21. Ray H. D., Bergdoll M. S.: J. Bact. 98, 833, 1969.
22. Reiser R., Conway D., Bergdoll M. S.: Appl. Microbiol. 27, 83, 1974.
23. Scott W. J.: Aust. J. Biol. Sci. 6, 549, 1953.
24. Simkovicova M., Gilbert R. J.: J. med. Microbiol. 4, 19, 1971.
25. Surgalla M. J.: J. Infect. Dis. 81, 97, 1947.
26. Tatini S. R., Setin S. A., Soo M. M.: J. Fd. Sci. 41, 133, 1976.
27. Tatini S. R., Soo M. M., Cords B. R., Bonnett R. W.: J. Fd. Sci. 40, 352, 1975.
28. Troller D. J. A., Stinson Jr.: J. Fd. Sci. 40, 802, 1975.
29. Unpublished data cited in Tatini S. R.: J. Milk Fd. Technol. 36, 559, 1973.

Adres autora: lek. wet. Ewa Wittlin, ul. Parkowa 13/17 m. 146, 00-759 Warszawa.