

Шульц М., Стефанякова А., Станьчак В., Пенцонек Я. — Влияние облучения бактерий на их протеолитические свойства.

Исследовали активные протеолитические штаммы бактерий: *Pr. vulgaris*, *Ps. aeruginosa*, *Ps. fluorescens*, *Bac. subtilis* (споры). Взвеси бактерий и спор облучали в безбелковой и белковой среде лучами. X. Величины доз облучения составляли 1—100 Gy, а в случае спор *Bac. subtilis* 50—1000 Gy. В результате проведенных исследований отметили, что: 1) облучение *Pr. vulgaris*, *Ps. aeruginosa*, *Ps. fluorescens* вызывает незначительное понижение протеолитических свойств генераций, возникших из облученных бактерий, 2) облучение спор *Bac. subtilis* не оказывает существенного влияния на протеолитическую активность бактерий, выросших из облученных спор, 3) степень омертвления популяций бактерий при тех же самых дозах облучения выше степени понижения их протеолитических свойств, 4) наличие белка в среде облучения бактерий не имеет существенного влияния на протеолитические свойства возникших генераций.

Szulc M., Stefaniakowa A., Stańczak B., Pęconek J. — The influence of radiation on bacterial cells and their proteolytic properties.

The suspensions of bacterial cells and their spores were exposed to radiation with X rays in the environment with and without protein. The doses of radiation ranged from 1 to 100 Gy and in case of spores of *B. subtilis* from 50 to 1000 Gy. It was found that radiation of *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens* and *Ps. aeruginosa* caused an inconsiderable decrease of proteolytic properties of the generation originated from radiated bacteria. Radiation of *B. subtilis* spores did not influence the proteolytic activity of bacterial cells derived from the exposed spores. The degree of wasting away of bacteria exposed to the same radiation was higher than the rate of proteolytic properties decrease. The presence of protein in the surroundings had no influence on proteolytic characteristics of new generations.

MARCIN SZULC, ANNA PLISZKA, JANINA PĘCONEK

Wpływ napromieniowania gronkowców promieniami X na wytwarzanie enterotoksyny i ciepłoopornej dezoksyrybonukleazy

Z Katedry Higieny Produktów Zwierzęcych Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR w Warszawie

Z przeprowadzonych dotychczas badań wynika, że enterotoksyna gronkowcowa jest bardzo oporna na działanie promieni jonizujących. W doświadczeniach Reada i Bradshawa (10) dla zmniejszenia ilości aktywnej enterotoksyny B, rozpuszczonej w buforze weronalowym, z 31 µg/ml do poniżej 7 µg/ml trzeba było dawki 5 Mradów. Aby uzyskać taki sam stopień unieczynnienia enterotoksyny zawartej w mleku dawka promieniowania musiała być zwiększona do 20 Mradów.

W piśmiennictwie brak jest natomiast danych, które dotyczyłyby wpływu napromieniowania na późniejsze wytwarzanie enterotoksyny przez gronkowce, które przeżyły zastosowane dawki promieniowania. Omawiane badania miały więc charakter pierwszych badań orientacyjnych. Uwzględniono w nich wpływ napromieniowania na wytwarzanie przez gronkowce ciepłoopornej dezoksyrybonukleazy. Enzym ten w zasadzie (istnieją bowiem nieliczne wyjątki) jest produkowany tylko przez gronkowce koagulazododatnie (*Staphylococcus aureus*), a warunki jego wytwarzania i trwałości są, zgodnie z badaniami wielu autorów (3, 7, 8, 9, 13), bardzo zbliżone do warunków wytwarzania i trwałości enterotoksyny gronkowcowej. Z tych względów w ostatnich latach proponuje się, zwłaszcza w rutynowych badaniach żywności, zastępowanie oznaczeń enterotoksyny przez oznaczanie ciepłoopornej dezoksyrybonukleazy (12). Oznaczanie bowiem tego enzymu jest znacznie prostsze i nie wymaga kosztownego zestawu surowic i standardowych enterotoksyn.

W przedstawionej pracy uzupełnienie oznaczeń enterotoksyny przez oznaczenia ciepłoopornej dezoksyrybonukleazy wydawało się interesujące, choćby dla stwierdzenia czy nie zachodzą jakieś istotne różnice w efekcie napromieniowania na wytwarzanie enterotoksyny i DN-azy. Ponadto enzym ten można było oznaczać w próbkach napromieniowanych już po stosunkowo krótkim okresie inkubacji, gdy oznaczanie uchwytanych ilości enterotoksyny wymagało dłuższego namnażania. Toteż na przykładzie DN-azy łatwiej można było uchwycić przejściowe zmiany metabolizmu powstające w wyniku napromieniowania.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono z dwoma szczepami gronkowców *Staphylococcus aureus* nr 262, wytwarzającym enterotoksynę B i *Staphylococcus aureus* nr 100, wytwarzającym enterotoksynę A. Te standardowe szczepy oraz enterotoksyny A i B oraz homologiczne surowice antyenterotoksyczne otrzymano dzięki uprzejmości Dr M. S. Bergdolla (Food Research Institute, Univ. of Wisconsin, Madison, USA).

Napromieniowanie przeprowadzono w 2 środowiskach, a mianowicie:

— w środowisku o małej (ok. 0,2%) zawartości białka, rozcieńczając 18-godzinne hodowle gronkowców fizjologicznym roztworem soli (PBS) w stosunku 1:4 (hodowle bulionowe),

— w środowisku białkowym, rozcieńczając hodowle bulionem, również w stosunku 1:4 (zawartość białka ok. 1%).

Do napromieniowania próbek używano aparat rentgenowski o następujących parametrach pracy: napięcie lamp — 200 kV, natężenie — 20 mA, filtracja promieni — 1 mm Al, moc dawki — 11 radów/s tj. 0,11 Gy/s. Stosowano dawki: 1, 10, 50, 200 i 400 Gy.

Radiowrażliwość obu badanych szczepów gronkowców enterotoksycznych (standardowych) oznaczano metodą płytkową.

Dla porównania oznaczano tą samą metodą przeżywalność 4 innych szczepów gronkowców: *Staphylococcus aureus* nr 5934, *Staphylococcus aureus* nr 1a, *Staphylococcus aureus* Smith nr 232/305 i *Staphylococcus aureus* nr 10. Szczepy 1 — 3 otrzymano z PZH w Warszawie, a szczep 4 został wyizolowany z tkanki mięśniowej w Katedrze Higieny Produktów Zwierzęcych. Z każdym z tych szczepów przeprowadzono po 2 serie badań.

Enterotoksynę oznaczano metodą mikroprecypitacji szkiełkowej w żelu wg Crowle (2), w supernatantach z 3-dniowych hodowli gronkowców na celofanie. Próbkę kontrolną i poddane napromienieniu przesiewano na skosy agarowe i po 24-godzinnej inkubacji w temp. 37°C kolonie ze skosu przenoszono na płytki agarowe z półpłynnym podłożem agarowym, pokrytym celofanem, zgodnie z metodyką podaną przez Burbiankę i wsp. (5).

Z supernatantów hodowli przygotowano szereg kolejnych rozcieńczeń podwójnych i oznaczano graniczne rozcieńczenia dające jeszcze linię precypitacji z homologiczną surowicą antyenterotoksyczną. Poziom ciepłopornej DN-azy oznaczano metodą szkiełkową wg FDA i Lachica (4, 6). Określano wytwarzanie tego enzymu:

- bezpośrednio w próbkach poddanych napromienianiu, po ich przetrzymaniu 24 h w temp. 37°C,
- po przesianiu na nowe podłoże bulionowe i inkubacji 24 h,
- w supernatantach 3-dniowej hodowli na celofanie, równoległe do oznaczeń enterotoksyny.

Wyniki i omówienie

Już nawet bardzo małe dawki promieniowania wywierały dostrzegalny wpływ na przeżywalność wszystkich badanych szczepów gronkowców. W miarę wzrostu dawek efekty stawały się coraz większe. Stwierdzono ochronny wpływ białka w środowisku na napromieniane szczepy gron-

mimo początkowego mniejszego *inoculum*, liczebność gronkowców wyrównywała się i ilość wytworzonej enterotoksyny była podobna w próbkach kontrolnych i poddanych napromienianiu. Występujące różnice mieszczą się w granicach błędu metodycznego. W tab. 1 przedstawiono wyniki doświadczeń przeprowadzonych ze szczepem nr 262. Podobne wyniki uzyskano w doświadczeniach ze szczepem nr 100.

Wytwarzanie przez badane szczepy ciepłopornej DN-azy było w pewnym stopniu uzależnione od środowiska, w którym je napromieniwano. Napromienianie w środowisku białkowym (bulion) nie miało wpływu na późniejsze wytwarzanie tego enzymu, natomiast napromienianie w środowisku o niskiej zawartości białka (PBS) powodowało przejściowe zahamowanie wytwarzania dezoksyrybonukleazy.

Na podstawie otrzymanych wyników nie można stwierdzić określonego, trwalszego wpływu napromieniania gronkowców promieniami X na wytwarzanie enterotoksyny i ciepłopornej dezoksyrybonukleazy przez populacje namnożone z bakterii napromienianych.

Zahamowanie wytwarzania dezoksyrybonukleazy po napromienianiu gronkowców w środowisku o bardzo małej zawartości białka (PBS) było tylko przejściowe. Być może, takie przejściowe zaburzenia metabolizmu mogą dotyczyć również wytwarzania enterotoksyny, ale zastosowana metoda wykrywania nie pozwoliła na ich uchwycenie.

Nie można także wykluczyć możliwości ewentualnego powstawania pojedynczych mutantów o zmniejszonej lub zwiększonej produkcji enterotoksyn. Stwierdzenie występowania takich mu-

Tab. 1. Poziom enterotoksyny B w supernatantach z 3-dniowej hodowli gronkowców na celofanie (szczep 262)

Seria	Środowisko napromieniania: PBS						Środowisko napromieniania: bulion							
	Największe rozcieńczenie supernatantu, w którym stwierdzono obecność enterotoksyny													
	Dawka promieniowania w Gy													
	0	1	10	50	100	200	400	0	1	10	50	100	200	400
I	1/128	—*	1/128	1/128	1/128	1/128	—	1/128	—	1/128	1/128	1/128	1/128	—
II	1/64	—	1/64	1/64	1/64	1/32	—	1/64	—	1/64	1/64	1/64	1/64	—
III	1/64	—	—	—	1/64	1/64	1/64	1/64	—	—	—	1/64	1/128	1/128
IV	1/64	—	—	—	1/64	1/64	1/64	1/64	—	—	—	1/64	1/64	1/64
V	1/64	—	—	—	1/64	1/64	1/64	1/64	—	—	—	1/128	1/64	1/128
VI	1/256	—	—	—	1/256	1/256	1/256	1/256	—	—	—	1/128	1/256	1/256
VII	1/256	—	—	—	1/256	1/256	1/256	1/256	—	—	—	1/256	1/256	1/256
VIII	1/256	—	—	—	1/256	1/256	1/64	1/256	—	—	—	1/256	1/256	1/256
IX	1/64	1/64	1/64	1/64	—	—	—	1/64	1/64	1/64	1/64	—	—	—
X	1/64	1/64	1/64	1/64	—	—	—	1/64	1/64	1/64	1/64	—	—	—

Objaśnienie: *) nie określano (—).

kowców. Uzyskane wyniki są zbliżone do otrzymanych w poprzednich badaniach własnych (11). Nawet najwyższe dawki promieniowania, obniżające liczbę żywych komórek o 3—4 rzędy wielkości (3—4 D), nie miały wpływu na wytwarzanie enterotoksyny przez gronkowce, które przeżyły napromienianie. Po hodowli na celofanie,

tantów wymagałoby jednak dodatkowych i znacznie szczegółowszych badań.

W piśmiennictwie nie napotkano informacji o wpływie napromieniania gronkowców na wytwarzanie enterotoksyny. Spotkano tylko jedną pracę, dotyczącą enterotoksycznego szczepu *Clostridium perfringens*, w której obok wpływu

promieniowania gamma na przeżywalność tych bakterii badano również wpływ na późniejsze wytwarzanie enterotoksyny. Podobnie jak w przedstawionych badaniach, autor (1) nie stwierdził żadnego wpływu promieniowania na wytwarzanie enterotoksyny przez badany szczep.

Wnioski

1. Wszystkie poddane badaniom szczepy *Staphylococcus aureus* (3 szczepy muzealne i 3 szczepy wyizolowane z żywności) charakteryzowały się podobną radiowrażliwością w stosunku do promieni X.

Srednia dawka D_{10} wynosiła dla badanych szczepów: po napromieniowaniu w PBS ok. 110 Gy i w bulionie ok. 140 Gy.

2. Około 1% zawartość białka w środowisku napromieniowania bakterii podnosiła radiooporność gronkowców.

3. Dawki promieniowania X wielkości 1—400 Gy nie wywierały dostrzegalnego wpływu na wytwarzanie enterotoksyny (A lub B) przez populacje namnożone z bakterii, które przetrwały napromieniowanie.

4. Napromieniowanie gronkowców dawkami 1—400 Gy promieniowania X w środowisku o bardzo małej zawartości białka (ok. 0,2%) powodowało zahamowanie wytwarzania ciepłopornej dezoksyrybonukleazy przy namnożeniu gronkowców w tym samym, ubogim w białko podłożu. Cecha ta zanikała po przeszczepieniu bakterii do bulionu.

Piśmiennictwo

1. Barnhardt H. M. Ur.: Effect of low dose irradiation on enterotoxin positive strains of Clostridium perfringens type A. Praca doktorska, Nebraska Univ., Lincoln 1976, ref.: INIS Atom index, 1977, 8, 3400, Nr 315233.
2. Crowle A. J.: J. Lab. Clin. Med. 52, 784, 1958.
3. Erickson A., Deibel R. H.: Appl. Microbiol. 25, 332, 1973.
4. FDA: Bacteriological Analytical Manual for Foods 11, 5, 1976.
5. Jeljaszewicz J.: Staphylococci and staphylococcal infections, Karger, Basel 1973, s. 529.
6. Lachica R. V. F., Hoepflich P. D., Frantl C. E.: Appl. Microbiol. 24, 920, 1972.
7. Lachica R. V. F., Weiss K. F., Deibel R. H.: Appl. Microbiol. 18, 126, 1969.
8. Niskanen A., Korainen L.: J. Food Prot. 40, 543, 1977.

9. Rayman M. K., Park C. F., Phillipott J., Todd E. C. D.: Appl. Microbiol. 29, 451, 1975.
10. Read R. B. Jr., Bradshaw J. G.: Appl. Microbiol. 15, 603, 1967.
11. Szulc M., Stefaniakowa A., Tropiło J., Stańczyk B., Pęcunek J., Mierzevska H., Bielecka J.: Medycyna Wet. 33, 584, 1979.
12. Tatini S. K.: Zentbl. Bakt. Abt. 1. Ref. 242, 137, 1975.
13. Windyga B.: Roczniki PZH 19, 20, 1979.

Adres autora: prof. dr Marcin Szulc, ul. Bielańska 3 m. 25, 00-086 Warszawa.

Шульц М., Плишка А., Пенцонек Я. — Влияние облучения стафилококков лучами X на образование энтеротоксина и теплоустойчивой дезоксирибонуклеазы.

Облучали 6 штаммов *Staphylococcus aureus* лучами X в дозах 1—400 Gy, в белковой и безбелковой среде. Определяли образование энтеротоксина и теплоустойчивой дезоксирибонуклеазы энтероксическими штаммами 262 и 100. Все исследуемые штаммы стафилококков характеризовались похожей радиочувствительностью относительно лучей X. Около 1% содержание белка в среде облучения бактерий повышало радиоустойчивость бактерий. Дозы облучения X порядка 1—400 Gy не оказывали заметного влияния на образование энтеротоксина А или В популяциями, размноженными из бактерий переживших облучение. Облучение стафилококков вышеупомянутыми дозами лучей X в среде с очень малым содержанием белка вызывало временное заторможение образования теплоустойчивой дезоксирибонуклеазы.

Szulc M., Pliszka A., Pęcunek J. — The influence of radiation on the enterotoxin and thermoresistant deoxyribonuclease production by *Staphylococcus sp.*

Six strains of *Staph. aureus* present in the environment with and without protein were exposed to radiation with X rays using the doses from 1 to 400 Gy. The production of enterotoxin and thermoresistant deoxyribonuclease by enterotoxic strains No 262 and 100 were determined. All the strains under study characterized by similar radiosensitivity to X rays. About 1 per cent of protein in the environment exposed to radiation increased the resistance of *Staphylococcus* strains. The doses of radiation from 1 to 400 Gy did not influence the enterotoxin A and B production by bacteria multiplied from those which had survived the radiation. The radiation of the strains present in the environment without protein brought about a temporary inhibition of thermoresistant deoxyribonuclease production.

PRITCHARD D. H., RAHALEY R. S., NAPHTINE D. T.: Zapalenie tchawicy u owiec po doustnym stosowaniu mieszanki mineralnej. (Tracheitis in sheep after oral administration of a mineral supplement). Aust. vet. J. 55, 342—244, 1979 (7).

W żywieniu owiec w Australii są stosowane pasze z dodatkiem soli mineralnych. Jeden kg mieszanki mineralnej zawiera 178 g siarczanu miedzi, 60 g siarczanu kobaltu i 744 g siarczanu cynku. W stadach owiec po zastosowaniu żywienia mieszankami mineralnymi łącznie z lewamizolem wystąpiły zachorowania wśród objawów zaburzeń oddechowych. Część zwierząt padła w okresie 2 miesięcy, przy czym pierwsze upadki wystąpiły w okresie 1—3 dni po podaniu mieszanki. Na czoło zmian sekcyjnych wysuwało się zmartwiające zapalenie tchawicy sięgające do chrząstek. Identyczne zmiany wywoływano sztucznie po dotchawicowym podaniu mieszanki mineralnej i lewamizolu.

G.

ROBINSON W. F., HUXTABLE C. R. R., PASS D. A., HOWELL J. M. C.: Kliniczne i elektrokardiograficzne dane w przypadkach podejrzenia wirusowego zapalenia mięśnia serca u szceniąt. (Clinical and electrocardiographical findings in suspected viral myocarditis of pups). Aust. vet. J. 55, 351—355, 1979 (8).

Szcenięta które przeżyły wirusowe zapalenie mięśnia serca poddano badaniom elektrokardiograficznym i obserwacjom klinicznym. Spośród 11 badanych zwierząt 5 padło lub zostało poddane eutanazji w okresie 11 dni obserwacji i badań. Na czoło zmian elektrokardiograficznych u szceniąt które padły wysuwało się spłaszczenie załamka R (poniżej 0,4 m w odprowadzeniu II), wzniesienie załamka S-T, załamanie QRS oraz paroksyzmalna tachykardia. Badania pośmiertne wykazały wielogniskowe podostre zapalenie mięśnia serca. U 6 szceniąt ze spłaszczonym załamkiem R wystąpiła po 4 tygodniach ostra duszność. Na sekcjach stwierdzono rozległe zwłóknienie lewej komory.

G.