

Piśmiennictwo

1. Ahvonen P., Thal E., Vasenius H.: Contr. Microbiol. Immunol. 2, 135, 1973.
2. Aldová E., Cerný J., Chmela J.: Zbl. Bakt. Hyg. I. Orig. A. 239, 202, 1977.
3. Aldová E., Cerna J., Janečková M., Pegrinková J.: Čes. Hyg. 20, 395, 1975.
4. Aldová E., Lim D.: Zbl. Bakt. Hyg. I. Orig. A. 226, 491, 1974.
5. Alonso J. M., Bercovier H., Servan J., Bourdin M., Mollaret H. H.: Méd. Mal. Infect. 6, 134, 1976.
6. Barre N., Louzis C., Treignier M., Alonso J. M., Bercovier H., Mollaret H. H.: Méd. Mal. Infect. 6, 520, 1976.
7. Bercovier H.: Méd. Mal. Infect. 6, 6, 1976.
8. Bornstein N., Flandrois J. P., Moulin A., Brun Y., Transy M. J., Fleurette J.: Méd. Mal. Infect. 3, 173, 1977.
9. Botzler R. G., Watzler T. F., Cowan A. B.: Bull. Wildl. Dis. Ass. 4, 110, 1968.
10. Chester B., Stitzky G., Bottone E. J.: J. clin. Microbiol. 6, 461, 1977.
11. Esseveld H., Goudzwaard C.: Contr. Microbiol. Immunol. 2, 99, 1973.
12. Harvey S., Greenwood J. R., Pickett M. J., Mah R. A.: Appl. Environm. Microbiol. 32, 352, 1976.
13. Hausner O., Hausnerová S., Tondl F.: Čsiská Epidem. Mikrobiol. Immunol. 22, 73, 1973.
14. Kapperud G.: Acta path. microbiol. scand. 83 B, 129, 1977.
15. Krogstad O.: Acta vet. scand. 15, 597, 1974.
16. Krogstad O., Teige J., Lassen J.: Acta vet. scand. 13, 594, 1972.
17. Królak M., Kurek Cz.: Medycyna Wet. 30, 395, 1974.
18. Kurek Cz., Królak M.: Medycyna Wet. 30, 323, 1974.
19. Lassen J.: Scand. J. infect. Dis. 4, 125, 1972.
20. Loiseau-Morelleau M. L., Laforest H.: Méd. Mal. Infect. 5, 160, 1976.
21. Mollaret H. H.: Méd. Mal. Infect. 6, 442, 1976.
22. Nicolle P., Mollaret H., Brault J.: Contr. Microbiol. Immunol. 2, 54, 1973.
23. Pedersen K. B., Winblad S.: Acta path. microbiol. scand. 87 B, 137, 1979.
24. Pokorný J.: Čslka Hyg. 19, 9, 1974.
25. Rabson A. R., Koornhof H. G.: Contr. Microbiol. Immunol. 2, 102, 1973.
26. Rakovský J., Paučková V., Aldová E.: Contr. Microbiol. Immunol. 2, 93, 1973.
27. Szita J., Svidro A.: Acta microbiol. hung. 23, 191, 1976.
28. Timofieva L. A., Miriniva L. P., Golovačeva V. J., Busedova N. M.: Ž. Mikrobiol. Epidem. Immunobiol. 11, 144, 1977.
29. Toma S., Deidrick V. R.: J. clin. Microbiol. 2, 478, 1975.
30. Van Oye E., Maes L.: Méd. Mal. Infect. 1, 463, 1971.
31. Waufers G.: Contr. Microbiol. Immunol. 2, 38, 1973.
32. Winblad S.: Contr. Microbiol. Immunol. 2, 129, 1973.
33. Zarembo M.: Pol. Tyg. lek. 47, 1849, 1979.
34. Zarembo M.: Med. dośw. 31, 21, 1979.
35. Zarembo M.: Kompleksowe badania nad *Yersinia enterocolitica* i występowanie jersiniozy w Polsce w latach 1972—1978. Praca hab. Białystok, 1979.
36. Zarembo M., Kubasik J., Piotrowski J., Grań-Kaluźna A.: Prz. epid. 2, 179, 1980.
37. Zen-Yoji H., Sakai S., Maruyama T., Yanagawa Y.: Jap. J. Microbiol. 18, 103, 1974.

Adres autora: dr hab. Maria Zarembo, ul. Wołodyjowskiego 6b m. 1, 15-287 Białystok.

ZYGMUNT CYGAN, IRENA BARCZ

Występowanie elastolitycznej mikroflory tlenowej w „kulawce” owiec

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Lublinie

Podstawowe kryterium względnej chorobowości beztlenowców *B. nodosus* — uznanych za główny czynnik etiologiczny w „kulawce” owiec (KO) — polega na ocenie aktywności tych bakterii wobec elastyny (11). Stwierdzono bowiem prostą korelację pomiędzy intensywnością wywołanej elastolizy a inwazyjnością szczepu. Szczepy bardziej proteolityczne występowały zwykle przy ciężkiej formie schorzenia (5). Poza tym, spośród innych bakterii wykazano, że właściwości elastolityczne cechują również — występujące przy „kulawce” owiec — mikroaerofilne szczepy *C. pyogenes* (3). Jednocześnie okazało się, że maczugowce te posiadają zdolność do wywołania zmian zapalno-nekrotycznych w racicach zakażonych owiec (9). Zatem nasuwa się przypuszczenie, że kryterium elastolizy może posiadać szersze znaczenie, tj. służyć wstępnej ocenie roli różnej mikroflory stwierdzanej w KO. Podkreślić przy tym należy, że pod tym względem bakterie tlenowe nie były dotychczas sprawdzane.

W związku z powyższym jako cel niniejszych badań własnych przyjęto zbadanie na aktywność elastolityczną tlenowej mikroflory, występującej w „kulawce” owiec, oraz przeprowadzenie wstępnej identyfikacji tych bakterii.

Materiał i metody

Szczepy wzorcowe. W celach porównawczych stosowano szczepy łaseczek *B. cereus*, *B. brevis*, *B. mycoides* oraz pałeczek *P. aeruginosa* i *P. fluorescens* (Zakład Mikrobiologii Ogólnej, UMCS), a także szczepy *B. subtilis*, *B. circulans* i *B. megaterium* (Zakład Mikrobiologii Wet., AR w Lublinie).

Badane próbki. Użyto chorobowo zmienione wycinki tkanki, pobrane z sąsiedztwa skóry i rogu racicowego, od 9 owiec z 2 różnych owczarni tj. A (owce 1—5) oraz B (owce 6—9). Proces chorobowy powodował u tych zwierząt zmiany zapalno-martwicze w skórze szpary międzyracicowej oraz objawy kulawizny.

Posiewy i izolacja. Próbkę badanych materiałów posiewano na 2 podłoża agarowe tj. z dodatkiem 10% krwi owczej oraz 15% surowicy końskiej. Izolacja polegała na wycięciu wraz z agarem pojedynczych kolonii i przeniesieniu ich do bulionu z 10% surowicy końskiej. Czas inkubacji w 37°C wynosił 2—3 dni.

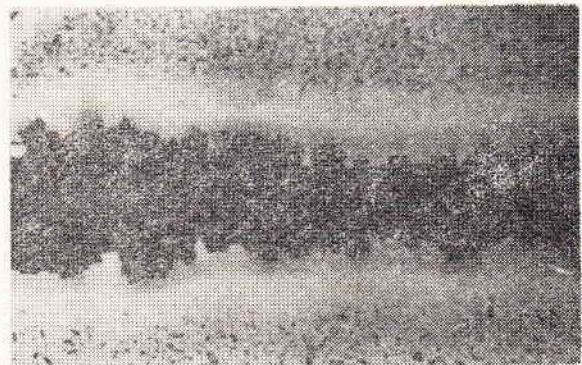
Identyfikacja. Sprawdzano morfologię komórki i kolonii, barwienie się metodą Grama, ciepłoporność wytwarzanych endospor, a także badano właściwości fermentacyjne wobec niektórych cukrów i alkoholi, wytwarzanie indolu oraz wzrost w podłożu z mlekiem.

Aktywność elastolityczna. Trawienie elastyny badano metodą podaną przez Murphy (8) i stosowaną przez Stewarta (11) oraz Dicka i wsp. (4). Koncentracja elastyny (Koch — Light Lab., Anglia) związanej z czerwieniem Kongo w podłożu agarowym z dodatkiem 15% surowicy końskiej wynosiła 0,3%. Pożywkę zasiewano dużą dawką hodowli płynnej stosując liniowy posiew. Czas inkubacji w 37°C wynosił 14 dni.

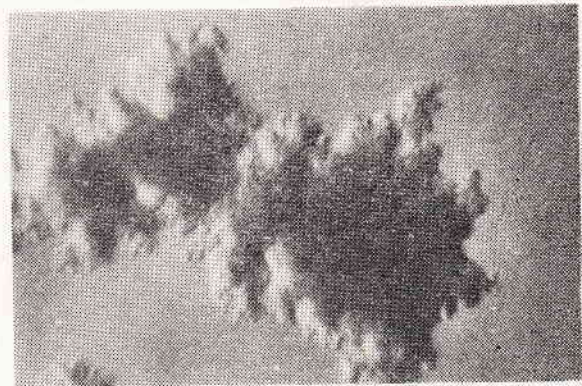
Wyniki

Badane wycinki skóry i rogu racicowego zawierały jako stałą mikroflorę tlenową — laseczki z rodzaju *Bacillus*, ziarniaki *Staph. epidermidis* oraz pałeczki *Proteus sp.* i *E. coli*. Rzadziej występowały gronkowce *Staph. pyogenes* (3 owce) oraz bliżej niezidentyfikowane paciorkowce z rodzaju *Streptococcus* (4 owce).

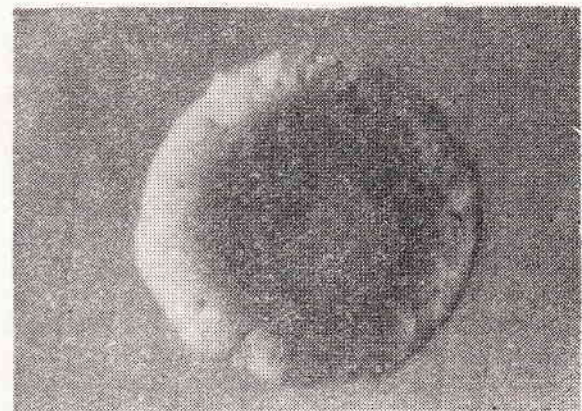
Powyższe bakterie tj. ogółem 27 szczepów *Bacillus*, 9 *Staph. epidermidis*, 9 *E. coli*, 9 *Proteus*, 4 *Streptococcus* i 3 *Staph. pyogenes* — przebadano w zakresie aktywności elastolitycznej. Poza tym w celach kontrolnych sprawdzono właściwości elastolityczne także 6 szczepów wzorcowych z rodzaju *Bacillus* (gatunki: *subtilis*, *megaterium*, *cereus*, *brevis*, *mycoides* i *fluorescens*). Rezultaty tych badań przedstawia tab. 1. Wynika z niej, że działanie elastolityczne wykazywały wszystkie wyosobnione szczepy laseczek z rodzaju *Bacillus*, a spośród szczepów wzorcowych podobnie zachowywały się pałeczki *Pseudomonas aeruginosa* i



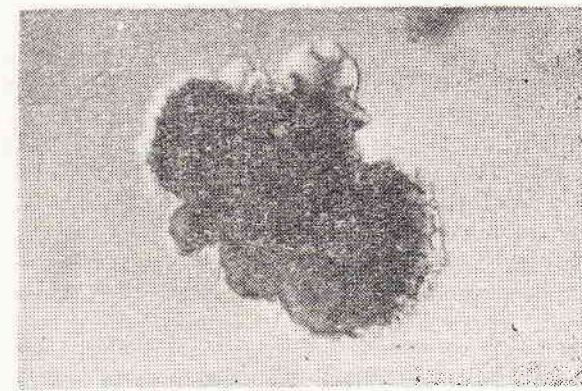
Ryc. 1. Efekt wywołanej elastolizy przez laseczki *Bacillus* (szczep z tzw. grupy A)



Ryc. 2. Morfologia kolonii szczepu *Bacillus* tzw. grupy A



Ryc. 3. Morfologia kolonii szczepu *Bacillus* tzw. grupy B



Ryc. 4. Morfologia kolonii szczepu *Bacillus* tzw. grupy C

Tab. 1. Aktywność elastolityczna badanej mikroflory tlenowej

| Gatunek i rodzaj bakterii | Liczba szczepów | Stopień elastolizy | | |
|--------------------------------------|-----------------|--------------------|---|---|
| | | ++ | + | - |
| Szczepy wyosobnione: | | | | |
| <i>Bacillus sp. (grupa A)</i> | 9 | 9 | | |
| <i>Bacillus sp. (grupa B)</i> | 9 | 9 | | |
| <i>Bacillus sp. (grupa C)</i> | 9 | 9 | | |
| <i>Staph. pyogenes</i> | 3 | | | 3 |
| <i>Staph. epidermidis</i> | 9 | | | 9 |
| <i>Streptococcus sp. (alfa hem.)</i> | 4 | | | 4 |
| <i>E. coli</i> | 9 | | | 9 |
| <i>Proteus sp.</i> | 9 | | | 9 |
| Szczepy wzorcowe: | | | | |
| <i>B. subtilis</i> | 1 | | | 1 |
| <i>B. megaterium</i> | 1 | | | 1 |
| <i>B. cereus</i> | 1 | | | 1 |
| <i>B. circulans</i> | 1 | | | 1 |
| <i>B. brevis</i> | 1 | | | 1 |
| <i>B. mycoides</i> | 1 | | | 1 |
| <i>P. aeruginosa</i> | | 1 | | |
| <i>P. fluorescens</i> | | | 1 | |

Objaśnienie: oznaczenia cyfrowe = liczba szczepów.

Pseudomonas fluorescens. Na uwagę zasługuje brak tego typu aktywności u wzorcowych szczepów *Bacillus*. Efekt elastolityczny przedstawiał całkowite przejaśnienie podłoża spowodowane strawieniem cząstek elastyny w sąsiedztwie wyrosłych kolonii (ryc. 1).

Wspólną cechą elastolitycznych laseczek *Bacillus* był wzrost w bulionie w postaci kożucha i osadu na dnie probówki, szybkie trawienie kazeiny mleka, jak również wytwarzanie endospor nie deformujących sporangium i przeżywających ogrzewanie w 100°C w ciągu 15 minut, a ponadto hemolizowanie krwi owczej oraz nieprodukowanie indolu. Natomiast istniejące różnice we właściwościach morfologiczno-fermentacyjnych szczepów stanowiły podstawę do wyróżnienia 3 odrębnych grup (A, B, C).

Szczepy grupy A przedstawiały długie laseczki Gram-dodatnie, które na podłożu agarowym z surowicą końską tworzyły kolonie średnicy 5—8 mm, szare, matowe o nieregularnym brzegu (ryc. 2). Interesującą właściwością tych bakterii było produkowanie gazu podczas fermentowania glukozy, sacharozy, ksylozy, manitu, skrobi i fruktozy (brak rozbudowy sorbozy, ramnozy i arabinozy).

Laseczki z grupy B stanowiły średniej długości komórki, a ich kolonie posiadały wielkość 4—5 mm, były na ogół płaskie, w środku nieco zapadnięte o względnie równym brzegu (ryc. 3). Powierzchnia kolonii, w miarę przedłużania się inkubacji, stawała się nierówna. Bakterie te stale fermentowały glukozę, fruktozę i manit, zmiennie zachowywały się w stosunku do sacharozy, arabinozy i skrobi, a nie wykorzystywały ramnozy, sorbozy oraz ksylozy.

Szczepy grupy C tworzyły długie laseczki i charakterystyczne, wżerające się w podłoże kolonie z nitkowatym brzegiem, suche, średnicy 3—4 mm (ryc. 4). Od bakterii z grupy B różniły się fermentowaniem ksylozy oraz nie-rozkładaniem fruktozy.

Dyskusja

Dotychczasowe prace, przeprowadzone w kontekście etiopatogenezy „kulawki” owiec, dowodziły, że aktywność elastolityczną posiadają wyłącznie beztlenowe pałeczki *B. nodosus* (5, 11, 12) oraz mikroaerofilne maczugowce *C. pyogenes* (3). W niniejszych badaniach własnych wykazano po raz pierwszy stałą obecność w tym schorzeniu laseczek z rodzaju *Bacillus* trawiących elastynę. Według dostępnego piśmiennictwa — powyższa właściwość — nie była jeszcze opisana u laseczek tlenowych. Wspomnieć też należy, że żaden z posiadanych szczepów wzorcowych rodzaju *Bacillus*, pomimo zachowanych właściwości proteolitycznych wobec kazeiny mleka, nie trawił elastyny. Zatem stwierdzone w „kulawce” owiec bakterie mogą tworzyć zupełnie nieznaną populację tych szczepów.

Przeprowadzone badania wykazały, że obydwie szczepy wzorcowe *P. aeruginosa* i *P. fluorescens* rozpuszczały elastynę. Wynik ten potwierdza dane innych autorów o aktywności elastolitycznej pałeczek *Pseudomonas* (6, 7). Zdaniem Carricka i Berka (2) oraz Snella i wsp. (10) zdolność produkowania elastazy przez bakterie *Pseudomonas* koreluje z ich wirulencją.

Jak dotąd nie badano pochodzenia elastolitycznych szczepów rodzaju *Bacillus*. Być może, że ich rozerwuarem jest ziemia, bowiem normalnie stanowi ona główną niszę ekologiczną dla laseczek tlenowych (1). Nie można jednak wykluczyć, że wchodzi one w skład autonomicznej mikroflory kałowej lub skórnej.

Wyosobnione szczepy laseczek z rodzaju *Bacillus* posiadały zróżnicowane właściwości biochemiczne. Jednak zastosowane metody diagnostyczne nie pozwoliły na bliższą ich identyfikację. Wyróżnione 3 grupy bakteryjne wydają się przedstawiać odrębne gatunki. Podkreślić przy tym należy, że szczepy grupy A wyróżniały się zdolnością produkowania gazu, co zbliżało je do laseczek *B. macerans* i *B. polymyxa* (1).

Znaczenie wykazanych w „kulawce” owiec elastolitycznych laseczek *Bacillus* nie jest znane. Powszechność ich występowania w tym schorzeniu może sugerować ich wpływ na proces destrukcji włókien elastycznych tworzywa racic. Taką specyficzną aktywność proteolityczną opisano dotychczas tylko u beztlenowców *B. nodosus* tj. uznanych czynników etiologicznych „kulawki” owiec (5, 11, 12).

Piśmiennictwo

1. Buchanan R. E., Gibbons N. E.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Baltimore 1975.
2. Carrick L., Berk R.: Biochim. biophys. Acta 391, 422, 1975.
3. Cygan Z., Wierciński J., Rubaj B., Barcz I.: Właściwości „maczugowców” *C. pyogenes* i *P. aenes* oraz ich występowanie w infekcjach racic owiec. Medycyna Wet. — w druku.
4. Dick G. F., Ashe B. M., Rodgers F. G., Diercks R. C., Goltz R. W.: Acta Dermatovener, Stockholm 56, 279, 1976.
5. Egerton J. R., Parsonson I. M.: Aust. vet. J. 45, 345, 1969.
6. Morihara K., Tsuzuki H.: Infect. Immun. 15, 679, 1977.
7. Mull J. D., Callahan W. S.: J. Bact. 85, 1178, 1963.
8. Murphy R. A.: J. Dental. Res. 53, 832, 1974.
9. Rubaj B., Cygan Z., Barcz I., Sikorski T.: Próba oceny roli chorobotwórczej szczepów *C. pyogenes* i *P. aenes* w „kulawkach” owiec. Medycyna Wet. — w druku.
10. Snell K., Holder I. A., Leppla S. A., Saelinger C. B.: Infect. Immun. 19, 839, 1978.
11. Stewart D. J.: Res. vet. Sci. 27, 99, 1979.
12. Thomas J. H.: Aust. J. agric. Res. 13, 725, 1962.

Adres autora: doc. dr hab. Zygmunt Cygan, ul. Żelazowej Woli 6 m. 13, 20-854 Lublin.

Цыган З., Барч И. — Появление эластолитической кислородной микрофлоры в пиосептицемии овец.

Исследовали на присутствие эластолитической кислородной микрофлоры вырезки кожи и копытного рога от 9 овец, показывающих симптомы пиосептицемии. Из изолированных 61 бактериального штамма упомянутое свойство показывало 27 штаммов палочек из рода *Bacillus*, классифицированных в 3 отдельных группах А, В, С. Следует подчеркнуть, что ни один из 6 образцовых штаммов палочек *Bacillus* (виды: *mycoides*, *brevis*, *cereus*, *subtilis*, *circulans* и *magaterium*), примененных для контроля, не переваривал эластина. В работе приведены основные свойства изолированных эластолитических штаммов и продискутирована их роль в контексте этиопатогенеза пиосептицемии овец.

Cygan Z., Barcz I. — Occurrence of elastolytic aerobic microflora in lameness of sheep.

The samples of the skin and hoof horn of 9 sheeps with the signs of lameness were taken towards elastolytic microflora examinations. Out of 61 strains isolated 27 showed that feature; they were classified into A, B and C group. No standard strain, i.e. *B. mycoides*, *B. brevis*, *B. subtilis*, *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. cereus* — used as controls, did not degrade elastin. Fundamental characteristics of the strains were given and their role in the etiopathogenesis of lameness of sheep was discussed.