

2. Mleko od dostawców uspołecznionych i indywidualnych cechuje niewielki udział mikroflory kwaszącej, wśród bakterii niekwaszących dominują drobnoustroje psychrotrofowe.

3. Poprawę stanu sanitarno-higienicznego surowca mlecznego można uzyskać jedynie poprzez rygorystyczne przestrzeganie zasad higienicznych przy udoju, przechowywaniu i transporcie mleka, na drodze od producenta do odbiorcy.

Piśmiennictwo

1. Cousins C. M.: XX Int. Dairy Congr. Paris 60 ST, 1978.
2. Coghill D., Juffs H. S.: Aust. J. Dairy Technol. 12, 150, 1979.
3. Hadland G.: XX Int. Dairy Congr. Paris 61 ST, 1978.
4. Kurek C., Niemiezyk K., Górniwicz C., Stawicki W.: Mat. konf. nauk. techn. Aktualne problemy higieny mleka w woj. gdańskim, Gdańsk, 16—17.VI.1981.
5. Law B. A.: J. Dairy Res. 46, 573, 1979.
6. Millere J. B., Velliet-Poncet L.: Le lait 59, 56, 1979.
7. Pijanowski E.: Chemiczne i higieniczne problemy żywnościowe. Mleko, PAN, Ossolineum, 1974.
8. Tolle A.: Arch. Lebensmittelhyg. 30, 84, 1974.

Adres autora: mgr Krystyna Milko, ul. Falista 5B m. 26, 81-331 Gdynia.

Милько К., Бялковская М., Навроцкая К. — Микробиологический анализ молочного сырья, выпускаемого в хозяйствах обобщественного и индивидуального секторов Гданьского воеводства.

Провели микробиологические исследования 172 проб сырого молока, в том 100 проб из обобщественных хозяйств и 72 пробы из индивидуального сектора. Молоко из обобщественных хозяйств со-

держало в среднем 50,6 млн микроорганизмов в 1 см³, в том квасящие бактерии составляли 17,5%, психротрофные 18,1%, а теплоустойчивые 2,3%. В молоке от индивидуальных поставщиков обнаружены в среднем 41,0 млн микроорганизмов в 1 см³. Квасящие бактерии составляли 37,3% микрофлоры, психротрофные 19,0%, а теплоустойчивые 0,9%. В молоке обобщественного сектора титр coli составлял 0,0001—0,00001, в молочном сырье от индивидуальных поставщиков 0,001—0,0001. Наличие коагулазоположительных стафилококков в 1 см³ характеризовало 75,0% проб из обобщественных хозяйств и 61,2% проб из индивидуального сектора.

Milko K., Białkowska M., Nawrocka K. — Microbiological analysis of milk produced in large state farms and in individual ones in the Gdańsk province.

Bacteriological examinations of 100 milk samples taken from the cows state farms and 72 samples from individual cowsheds were performed. Milk of the state farms contained on an average 50.6 million of bacterial cells in 1 cm³, acidifier bacteria were in 17.5%, psychrophilic in 18.1% and thermoresistant in 2.3%. In milk from individual farms there were found: 41 million of bacterial cells in 1 cm³ including 37.3% of acidifier bacteria, 19.0% of psychrophilic ones, and 0.9% of thermoresistant germs. E. coli titer was 0.0001—0.00001 and the presence of coagulase-positive staphylococci was noticed in 75% of the samples of milk from the state farms, and in milk taken from individual farms the data were 0.001—0.0001 and 61.2%, respectively.

ZDZISŁAW GLIŃSKI, MAREK CHMIELEWSKI

Badania nad wykrywaniem pozostałości soli cholinowej N — glukozylopolifunginy w miodach

Institut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR,
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Wprowadzenie nowych antybiotyków do terapii chorób czerwia i pszczoł wymaga, poza określeniem wrażliwości czynnika etiologicznego na badany antybiotyk, ustaleniem wielkości dawki, sposobów podawania i oceny skuteczności terapeutycznej w chorych rodzinach, również oznaczenia czasu utrzymywania się ich aktywności w materiale stosowanym do podkarmiania rodzin, możliwości przechodzenia i czasu utrzymywania się antybiotyku w miodzie przeznaczonym do konsumpcji. W przypadku zanieczyszczenia miodu antybiotykami zwłaszcza o długim okresie degradacji istnieją uzasadnione obawy, że mogą one wywierać niekorzystny wpływ na organizm człowieka. Z tych względów FAO—WHO (4) postuluje konieczność określenia ewentualnego zanieczyszczenia miodów konsumpcyjnych antybiotykami i ustalenia czasu karencji tych związków. Ten postulat dotyczy antybiotyków o szerokim spektrum działania lub długim okresie degradacji, szczególnie zaś antybiotyków, któ-

re są stosowane równocześnie w leczeniu ludzi i zwierząt.

W celu wykrywania zanieczyszczeń oraz utrzymywania się antybiotyków w miodzie i w syropie leczniczym wykorzystywana jest najczęściej metoda mikrobiologiczna, rzadziej metoda chromatograficzna. Metoda mikrobiologiczna — cylinderkowo-płytkowa, płytkowa z użyciem baseników wgłębnych — umożliwia jedynie wykrycie form biologicznie czynnych antybiotyków w badanym produkcie. Często obserwowane wiązanie się antybiotyków z niektórymi składnikami produktów pochodzenia biologicznego, które prowadzi do obniżenia aktywności biologicznej antybiotyku wpływa ujemnie na czułość metody (3). W przypadku miodów należy przy tym uwzględnić hamujące działanie na szczepie testowe drobnoustrojów substancji przeciwbakteryjnych wstępujących w miodach (2, 16), zwłaszcza tzw. inhibiny (13, 25). Metody mikrobiologiczne wykorzystano m.in. do oznaczania występowania

oraz degradacji w miodzie względnie w syropie cukrowym antybiotyków z grupy tetracyklin (6, 7, 14, 17, 21), penicyliny i streptomycyny (4, 17), erytromycyny (14), amfoterycyny B i nystatyny (11).

Metody chromatograficzne, fluorometryczne i spektrofotometryczne umożliwiają wykrycie obecności zarówno biologicznie aktywnych, jak i nieaktywnych składników antybiotyku, niekiedy również produktów jego degradacji. W przypadku miodów wymagają one z reguły eliminacji niektórych ich składników przed oznaczeniem antybiotyku np. białek, barwników, węglowodanów wpływających niekorzystnie na czułość i swoistość metody.

Chromatografię cienkowarstwową wykorzystano do wykrywania obecności sulfonamidów w miodzie (14) oraz rozdzielenia i identyfikacji aktywnych biologicznie składników kompleksu polifungin (20). Metodę fluorometryczną wprowadzono do oznaczania poziomu tetracyklin w tkankach, plazmie, krwi i kościach zwierząt (18), w organizmie czerwia i pokarmie pszczół (1). W dostępnym piśmiennictwie brak jest badań nad zastosowaniem metody spektrofotometrycznej do wykrywania obecności antybiotyku w miodzie. Korczagin i wsp. (19) posługiwali się tą metodą w badaniach nad oczyszczaniem i dystrybucją nystatyny w organizmie zwierząt.

Uzyskanie pozytywnych wyników w badaniach nad stosowaniem soli cholinowej N-glukozylopolifunginy (antybiotyk tetraenowy typu nystatyny) w leczeniu grzybicy otorbielakowej czerwia pszczoły miodnej (9, 10, 11, 12) było powodem podjęcia badań nad:

— porównaniem przydatności metody mikrobiologicznej, chromatografii cienkowarstwowej i metody spektrofotometrycznej do wykrywania pozostałości soli cholinowej N-glukozylopolifunginy w miodzie,

— określeniem ewentualnego zanieczyszczenia miodów pochodzących z rodzin leczonych antybiotykiem w zależności od wielkości dawki, częstotliwości i formy stosowania antybiotyku.

Materiał i metody

W badaniach wstępnych, w których określano przydatność metody mikrobiologicznej, chromatografii cienkowarstwowej i metody spektrofotometrycznej stosowano: sól cholinową N-glukozylopolifunginy (2000 j/mg. Instytut Przemysłu Farmaceutycznego, Warszawa), miody z dodatkiem antybiotyku w ilości od 0,5 do 3,0 ug/ml, te same miody bez dodatku antybiotyku, 10% bufor fosforanowy (pH 6,5) zawierający antybiotyk w ilości od 0,5 do 30,0 ug/ml (metoda mikrobiologiczna), roztwory antybiotyku w metanolu w stężeniach od 0,1 do 30,0 ug/ml (pozostałe metody).

W metodzie mikrobiologicznej badania przeprowadzono na podłożu stałym wg Sabourauda (pH 6,5) metodą baseników wgłębnych o pojemności 0,5 ml wobec *Saccharomyces cerevisiae* (MIC dla soli cholinowej N-glukozylopolifunginy = 2,0 j/ml). Inokulum stanowiła spluczyna komórek *S. cerevisiae* z podłoża stałego w PBS o zawartości 25×10^8 komórek/ml.

Do podłoża wzrostowego o temperaturze 45°C dodawano zawiesinę *S. cerevisiae* w stosunku 3,5 ml podłoża i 1 ml zawiesiny. Baseniki wypełniano próbkami miodu rozcieńczonego wym. buforem fosforanowym i inaktywowanego w łaźni wodnej (80°C, 30 mln.) oraz buforem fosforanowym z dodatkiem odpowiednich stężeń antybiotyku. Wielkość stref zahamowania odczytywano po 24 i 48 h i inkubacji w 37°C. Zawartość biologicznie czynnego antybiotyku w badanym materiale określono na podstawie wielkości stref zahamowania wzrostu referencyjnego szczepu z krzywej standardowej sporządzonej dla buforu fosforanowego z dodatkiem antybiotyku (15). W przypadku gdy miód bez antybiotyku wywierał działanie hamujące w wynikach odejmowano wielkość jego strefy zahamowania od strefy zahamowania tej samej próbki miodu, do którego dodano antybiotyk przed rozcieńczeniem buforem fosforanowym i inaktywacją.

W badaniach chromatograficznych i spektrofotometrycznych stosowano próbki miodu w ilości 30 g zawierające od 0,5 do 30,0 ug/antybiotyku na 1 g miodu oraz bez antybiotyku, które ekstrahowano 5-krotnie alkoholem metylowym (1 h), każdorazowo w ilości 30 ml. Uzyskane ekstrakty po połączeniu wirowano ($2500 \times g$), zaś klarowny supernatant po zagęszczeniu do objętości 30 ml w suszarce próżniowej używano do dalszych badań. W badaniach stosowano ponadto roztwory soli cholinowej N-glukozylopolifunginy w metanolu w stężeniu od 0,5 do 30,0 ug/ml.

W metodzie chromatografii cienkowarstwowej stosowano układ rozwijający o składzie chloroform : metanol : woda (30 : 18 : 4), odczynnik cerowy (siarczan ceru 1,0 g, molibdenian amonu 2,5 g, 10% kwas siarkowy 100 ml), płyty szklane Merck DC Fertigplatten K selgel 60F 254. Na płyty nakraplano w odstępach 2 cm po 1, 2, 5 i 10 μ l supernatantu uzyskanego po ekstrakcji miodów oraz roztwory antybiotyku o znanym stężeniu. Po nasyczeniu komory szklanej parami układu ustawiano w niej płyty z nakrapionymi próbkami tak, aby były one zanurzone w układzie na głębokości 1 cm. Chromatogram rozwijano około 3 h (21–22°C) tj. do chwili przejścia czoła rozpuszczalnika na odległość 1 cm od górnej krawędzi płyty. Chromatogramy po wysuszeniu w temperaturze pokojowej opryskiwano odczynnikami cerowymi i wywoływano w 120°C przez 10–15 min. W badanym układzie, zalecanym przez Płóciennik i wsp. (23) najszybciej przesuwały się składowe soli cholinowej N-glukozylopolifunginy, które znacznie przewyższały szybkością składowe naturalne miodu, występujące w ekstrakcie metanolowym miodu.

Oznaczenia ilościowe zawartości antybiotyku w badanym materiale przeprowadzono w oparciu o pomiar powierzchni plam (planimetria), rozwijając równocześnie z badanymi próbkami roztwory antybiotyku o znanym stężeniu nanoszone na chromatogram w identycznych ilościach co ekstrakty próbek badanych.

W metodzie spektrofotometrycznej klarowne ekstrakty próbek poddano analizie na spektrofotometrze UV-VIS-Specord C. Zeiss wg Korczagina i wsp. (19) w celu stwierdzenia w nich obecności charakterystycznego widma tetraenowego (275–325 nm). Oznaczono ekstynkcję właściwą oraz widmo absorpcji w obszarze 275–350 nm dla roztworów soli cholinowej N-glukozylopolifunginy w metanolu, ekstraktów miodu zawierających znane stężenia antybiotyku oraz ekstraktów miodu bez antybiotyku.

Badania and możliwością zanieczyszczenia miodu przeprowadzono na miodach, które pochodziły z:

— 27 rodzin zdrowych, w których czerw na plastrach opryskano jednorazowo, dwukrotnie lub czterokrotnie w odstępach 5 dni syropem zawierającym 500 lub 1000 mg antybiotyku/250 ml,

— 27 rodzin chorych na grzybicę otorbielakową, w których antybiotyk w dawce 500 mg/250 ml stosowano w formie bezpośredniego opryskiwania chorego czerwia, dwukrotnie i czterokrotnie w odstępach 5 dni.

Próbki do badań pochodziły z plastrów magazynowych z miodem oraz z zapasów miodu z plastrów sąsiadujących z plastrami, na których był usytuowany czerwiec leczony. Miód pobierano przed leczeniem oraz po 5, 10 i 15 dniach po leczeniu. Ponadto pobierano do badań miód z pierwszego miodobrania. Do badań włączono próbki miodu z pierwszego miodobrania po leczeniu z 90 rodzin chorych, w których antybiotyk stosowano w dawce leczniczej (100 mg/250 ml) jednorazowo (30 rodzin), dwukrotnie (30 rodzin) i czterokrotnie w odstępach 5-dniowych w formie opryskiwania chorego czerwia na plastrach. Kontrolę stanowił miód z pasiek nieleczonych, do którego przed rozcieńżeniem (metoda mikrobiologiczna) lub ekstrakcją (metoda chromatograficzna) dodano sól cholinową N-glukozylopolifunginy w ilości od 2 do 20 j/g bufor fosforanowy i metanol zawierający od 2 do 20 j antybiotyku/ml.

Wyniki i omówienie

W leczeniu grzybicy otorbielakowej czerwia są stosowane: nystatyna, amfoterycyna B, rzadziej aktidion. Jakkolwiek szczepy *Ascosphaera apis* są *in vitro* wrażliwe na te preparaty, to jednakże ich stosowanie w grzybicy otorbielakowej nie daje w pełni zadowalających wyników. Ponadto cechują się one dużą toksycznością dla czerwia i pszczół, są nierozpuszczalne w wodzie, co utrudnia ich stosowanie w formie podkarmiania lub opryskiwania, posiadają długi okres degradacji w miodzie i są stosowane w leczeniu grzybic ludzi i zwierząt gospodarskich.

Sól cholinowa N-glukozylopolifunginy dobrze rozpuszczalna w wodzie wykazuje wyższą aktywność w stosunku do *A. apis* w porównaniu do amfoterycyny B i nystatyny (10), jest mało toksyczna dla czerwia i pszczół i w przeważającej liczbie przypadków przyczynia się do likwidacji choroby i jej nawrotów (9, 11). Jest ona stosowana przy tym wyłącznie w terapii grzybicy otorbielakowej, przez co spełnia od dawna wysuwany postulat o niewprowadzaniu do lecznictwa zwierząt antybiotyków stosowanych u ludzi. Niemniej jednak, ze względu na dość długi okres degradacji w miodzie, który w 34°C wynosi około 33 dni, w 18°C do 3 miesięcy (12), istnieje teoretyczna możliwość zanieczyszczenia miodu antybiotykiem stosowanym w dawkach leczniczych.

W celu wykazania, czy przy stosowanej metodzie leczenia i dawkach antybiotyku ma miejsce zanieczyszczenie miodu konsumpcyjnego antybiotykiem, podjęto badania nad doбором metody określania pozostałości soli cholinowej N-glukozylopolifunginy w miodzie. Badania wykazały dość wyraźne różnice w czułości stosowanych metod. W metodzie mikrobiologicznej wykrywano 2,0 j soli cholinowej N-glukozylopolifunginy w 1 g miodu i 1,0 j antybiotyku w 1 ml buforu fosforanowego. Ogrzewanie próbek na łaźni wodnej przed przystąpieniem do oznaczeń powodowało inaktywację substancji o działaniu przeciwbakteryjnym zawartych w miodzie, przez co wykluczało ich działanie hamujące na szczep referencyjny *S. cerevisiae* (5, 8, 13, 22, 25). Za dużą powtarzalnością metody mikrobiologicznej prze-

mawia fakt uzyskanych 100% wyników dodatnich z próbkami miodów, które zawierały 2,0 j antybiotyku/g. Jednakże w odosobnionych przypadkach podłoże hodowlane przerastało, od strony baseników z miodem, drobnoustrojami, które zanieczyszczają miód i są odporne na działanie antybiotyków polienowych. W miodach występują grzyby osmofilne oraz drobnoustroje rodzaju *Lactobacillus* i *Pseudomonas* (5). Ze względu na fakt, że zahamowanie wzrostu *S. cerevisiae* może nastąpić pod wpływem innych antybiotyków (nystatyna, amfoterycyna B), wskazane jest użycie w metodzie mikrobiologicznej jako szczepu referencyjnego mikroorganizmu o dużej wrażliwości na sól cholinową N-glukozylopolifunginy, mniej-
szej na inne antybiotyki polienowe. Chojnowski i wsp. (3) w metodzie mikrobiologicznej przy określaniu wchłaniałości polifunginy i nystatyny, ich trwałości w sokach trawien-
nych, płynach ustrojowych i homogenatach tkanek stosowali *S. cerevisiae* i *Kloeckera apiculata* o różnych wartościach MIC dla badanych antybiotyków.



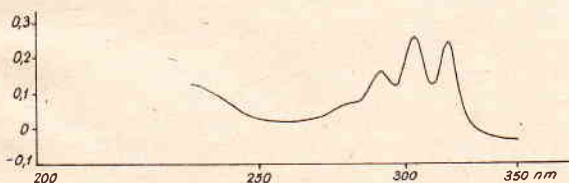
Ryc. 1. Chromatogram cienkowarstwowy na żelu krzemionkowym wywołany odczynnikiem cerowym. 1. — miód+sól cholinowa N-glukozylopolifunginy (10 j/g), 2. — miód badany, 3. sól cholinowa N-glukozylopolifunginy (4 j/ml)

Na chromatogramach w żelu krzemionkowym w badanym układzie najszybciej przesuwały się składowe soli cholinowej N-glukozylopolifunginy, które dawały 3—4 zlewające się ze sobą plamy (ryc. 1). Przewyższały one znacznie szybkością przesuwania składników miodu, które mimo stosowanej metody ekstrakcji przechodziły do ekstraktu. Ich obecność nie interferowała jednakże z antybiotykiem i dlatego ekstraktów nie oczyszczano na sicie molekularnym (14). Często obserwowane na chromatogramach „ogonowanie plam” mogło wiązać się z niejednorodnością antybiotyku, niecałkowitym jego oczyszczeniem, względnie czę-

ściową degradacją w miodzie. Stosowana w terapii i w badaniach sól cholinowa N-glukozylopolifunginy jest bowiem otrzymywana wyłącznie w skali półtechnicznej. W skład antybiotyku wchodzi trzy komponenty, o czym świadczy również obecność trzech pików w analizie spektrofotometrycznej. Metoda chromatografii cienkowarstwowej wg Płóciennik i wsp. (23) pozwala na ocenę składu jakościowego polifungin i jest pierwszą metodą, która umożliwia rozdział kompleksu tetraenów na poszczególne składniki. Wprowadzenie planimetrowania wielkości plam umożliwiło przeprowadzenie oznaczeń ilościowych.

Stosując pięciokrotną ekstrakcję miodu metanolem płamy odpowiadające soli cholinowej N-glukozylopolifunginy otrzymywano dopiero po naniesieniu na płytę 10 µl ekstraktu z miodu, który zawierał 10 j antybiotyku w 1 g. Stąd też w badaniach miodów pochodzących z rodzin leczonych nanoszono na płyty chromatograficzne 10 µl próbek ekstraktów badanych miodów. Natomiast stosując roztwór antybiotyku w metanolu wyraźne plamy uzyskiwano na chromatogramie po naniesieniu 10 µl roztworu, który zawierał 2,0 j antybiotyku w 1 ml metanolu. Metoda chromatografii umożliwia wykrycie produktów degradacji polifunginy, które występują na chromatogramach w całym kompleksie antybiotyku (20). Przy zastosowaniu metody bioautografii jest możliwe odróżnienie form biologicznie czynnych antybiotyku od frakcji nieaktywnych.

W metodzie spektrofotometrycznej charakterystyczne dla soli cholinowej N-glukozylopolifunginy widmo absorpcji przy $\lambda = 304$ nm uzyskiwano przy wyjściowym stężeniu antybiotyku w miodzie wynoszącym 10 j/g miodu (ryc. 2). Niezmiennosć widma absorpcji w nadfioletcie soli cholinowej N-glukozylopolifunginy w porównaniu do polifunginy wykazali Płóciennik i wsp. (24). Składniki miodów ciemnych zawarte w ekstraktach metanолоwych interferowały z widmem absorpcji. Dlatego w badaniach nad pozostałościami antybiotyku w miodach stosowano metodę mikrobiologiczną i chromatografię cienkowarstwową.



Ryc. 2. Widmo w UV w obszarze 275–350 nm wyciągu metanолоwego miodu o zawartości 10 j soli cholinowej N-glukozylopolifunginy/ml

Przy stosowanych dawkach leczniczych soli cholinowej N-glukozylopolifunginy w formie opryskiwania chorego czerwia na plastrach nie stwierdzono obecności antybiotyku w miodzie z pierwszego miodobrania po leczeniu,

próbek miodu z plastrów zaczerwionych usytuowanych w sąsiedztwie plastrów z leczonym czerwiem. Jedynie w miodzie z plastrów przylegających do plastrów z czerwiem opryskiwanym antybiotykiem przy zastosowaniu dziesięciokrotnie wyższej dawki od dawki leczniczej (1000 mg/250 ml) po 5 i 10 dniach po zabiegu w 10% próbek miodu wykazano obecność antybiotyku. Do zanieczyszczenia miodu doszło najprawdopodobniej w trakcie opryskiwania czerwia.

Wnioski

1. Metoda mikrobiologiczna i metoda chromatografii cienkowarstwowej mogą znaleźć zastosowanie do wykrywania soli cholinowej N-glukozylopolifunginy w miodzie.

2. W oparciu o te metody nie stwierdzono obecności soli cholinowej N-glukozylopolifunginy w miodzie z pierwszego miodobrania z rodzin, w których antybiotyk stosowano jedno-, dwu-, lub czterokrotnie w dawce 100 mg/250 ml syropu w formie opryskiwania chorego czerwia na plastrach.

Piśmiennictwo

1. Argauer R. J., Gilliam M.: J. Invertebrate Pathol. 23, 51, 1971.
2. Chambonnaud J. P.: Bull. Apicole 9, 83, 1966.
3. Chojnowski W., Zaremba A., Skwarko B.: Acta Pol. Pharm. 30, 223, 1973.
4. Dołgunova C. A., Butko M. P., Smirnova A. M.: Veterinarija 4, 11, 1970.
5. Gilliam M.: Apidologie 10, 43, 1979.
6. Gilliam M., Argauer R. J.: Amer. Bee J. 115, 230, 1975.
7. Gilliam M., Argauer R. J.: J. Invertebrate Pathol. 26, 283, 1975.
8. Girardeau J. H.: J. Econ. Entomol. 58, 878, 1965.
9. Gliński Z.: Apiacta 14, 176, 1979.
10. Gliński Z., Rzedzicki J.: Pol. Arch. Wet. 22, 297, 1980.
11. Gliński Z., Rzedzicki J.: Pol. Arch. Wet. 22, 305, 1980.
12. Gliński Z., Rzedzicki J.: Pol. Arch. Wet. 22, 315, 1980.
13. Gonnet M.: L'Apiculteur Fr. 1, 24, 1981.
14. Grandi A.: Apidologie 6, 91, 1975.
15. Grove D. C., Randall A.: Medical Encyclopedia INC, NY, 1955.
16. Izdebska K., Gubański M.: Zesz. Nauk. Uniw. Łódź 2, 21, 1962.
17. Katznelson H.: Progr. Xth Int. Congr. Entomol. 4, 105, 1958.
18. Kohn K. W.: Anal. Chem. 33, 861, 1961.
19. Korczagin W. B., Savuszkina L. N.: Antibiotiki 8, 634, 1963.
20. Kotłuszko D., Morawska H., Porowska N.: Acta Microbiol. Pol. A, 4, 21, 1972.
21. Landerkin G. B., Katznelson H.: Appl. Microbiol. 5, 152, 1957.
22. Lavie P.: CR Acad. Sci. Paris 248, 453, 1959.
23. Płóciennik Z., Haiski L., Kowszyk-Gindifer Z.: Chemia Anal. 18, 151, 1973.
24. Płóciennik Z., Kowszyk-Gindifer Z., Horodecka M., Lewczuk-Mrozek Z., Bojarska-Dahling H.: Acta Polon. Pharm. 36, 173, 1979.
25. Precousta J.: L'Ascospheerose de l'Abeille. Praca dokt. Toulouse, 1960.

Adres autora: doc. dr hab. Zdzisław Gliński, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin.

Глинский З., Хмеловский М. — Исследования по обнаруживанию остатков холиновой соли N-глюкозилполифунгина в медах.

Сравнили пригодность микробиологического метода, тонкослойной хроматографии и спектрофотометрического метода для обнаруживания остатков холиновой соли N-глюкозилполифунгина (антибиотик из группы тетраенов) в медах из лечимых семейств, в которых отмечался перикриптомикоз расплода. В микробиологическом методе ванн на питательной среде Сабуро (рН 6,5) применяли *S. cerevisiae* (MIC = 1,0 е. антибиотика/мл). Тонкослойную хроматографию провели на кремнистом геле в системе хлороформ:метанол:вода (30:18:4). Хроматограммы прояв-

ляли в 120°C 10—15 минут после опрыскивания плиток цериевым реактивом. Спектрофотометрический анализ провели на спектрофотометре UV-VIS-Specord в области 275—350 nm. На основе микробиологического метода и метода тонкослойной хроматографии не показали наличия холиновой соли N-глюкозилполифунгина в товарном меде из первого отбора меда после лечения и в запасах меда в засеянных сотах, расположенных вблизи сотов с лечимым расплодом из семейств антибиотик в которых применяли однократно, двух- или четырехкратно в дозе 100 мг (200 000) на 250 мл сахарного сиропа (50%) в виде опрыскивания большого расплода на сотах.

Gliński Z., Chmielewski M. — **Studies on the detection of choline salt of N-glucosylpolifungine residues in honey.**

The authors compared the usefulness of three methods: microbiological method, thin layer chroma-

tography and spectrophotometry for the detection of choline salt of N-glucosylpolifungine (a tetraene antibiotic of nystatin type) in honey from chalk brood infected families cured with the antibiotic. In the microbiological method (agar cup plate method) with the use of Sabouraud's agar (pH 6.5) *Saccharomyces cerevisiae* (MIC = 1.0 iu per one ml) was used as a reference strain. Thin layer chromatography was performed on silica gel in chloroform:metanol:water (30:18:4). Chromatograms were revealed at 120°C for 10—15 min after spraying with a cerium reagent. Spectrophotometric analyses was done on UV-VIS-Specord spectrophotometer at 275—350 nm. On the basis of microbiological and TCL determinations no residues of choline salt of N-glucosylpolifungine were found in honey from the first supering after treatment and honey storages in combs when the antibiotic was used one-four times at 5 days intervals at a dose of 100 mg (200 000 iu) per 250 ml of sucrose solution (50%) sprayed over sick brood on combs.

CHOROBY ZAKAŻNE I INWAZYJNE

KONRAD MALICKI, ELŻBIETA MALICKA, MARCIN WAWRZYNIEC BAŃBURA

Zastosowanie mikroskopii elektronowej w rozpoznawaniu rotawirusowych biegunek prosiąt i cieląt

Zakład Wirusologii i Zakład Patologii Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych
Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

Opracowanie szybkich metod oczyszczania i zagęszczania wirusowych zawiesin i wprowadzenie technik umożliwiających szybką identyfikację wirusa, spowodowało szersze zastosowanie mikroskopii elektronowej w wirusologicznej diagnostyce (8, 12, 36, 43). W latach siedemdziesiątych, w kompleksowych badaniach etiologii biegunek zastosowano — obok innych metod — również mikroskopię elektronową (14). W kale lub w treści jelit noworodków i osesków, chorujących z objawami gwałtownej biegunki spontanicznej lub doświadczalnej (10, 15, 16, 23, 33), lub w błonie śluzowej jelit takich zwierząt (5, 6, 26, 27, 34) wykryto nowe enteropatogenne czynniki etiologiczne wirusowej natury. A mianowicie: rotawirusy ludzi (1, 7, 14), cieląt (2, 24), prosiąt (20, 25, 29, 41) i innych gatunków ssaków i ptaków, astrowirusy ludzi (18, 22), bydła (cyt. 13) i owiec (35), parwowirusy cieląt (38) i psów (40), uzupełniając listę znanych już enteropatogennych wirusów, takich jak: koronawirusy, enterowirusy, adenowirusy, togawirus, kaliciwirus i inne.

W ostatnich latach rozwinięto w wielu krajach intensywne badania nad rotawirusami. W Polsce brak do tej pory badań nad rozpoznaniem rotawirusów u ludzi i zwierząt. Celem przedstawionych badań było:

1. Opanowanie laboratoryjnych metod niezbędnych do prowadzenia diagnostyki i rozwinięcia eksperymentalnych prac nad rotawirusowymi zakażeniami u zwierząt.

2. Przeprowadzenie wstępnych obserwacji nad występowaniem rotawirusów u zwierząt gospodarskich w naszym kraju.

Materiał i metody

Zwierzęta. Badano chore lub padłe kilkudniowe prosięta i cielęta wykazujące objawy biegunki, nadstawiane do Instytutu w celach rozpoznawczych. Prosięta pochodziły z: fermy N. M. — 15 szt. (nr P1 — P9, P15 — P20); PGR S. — 5 szt. (nr P25 — P29); PGR N. — 5 szt. (nr P30 — P34). Cielęta pochodziły z: PGR P. — 3 szt. (C1 — C3); RZD B. — 5 szt. (nr C4 — C8).

Technika pobierania materiału. Treść jelita cienkiego uśpionych lub padłych zwierząt pobierano strzykawką z igłą, wielokrotnie przepłukując jałowym buforowym roztworem fizjologicznym (PBS), podwiązane odcinki jelita cienkiego. Część materiału przekazywano do badania bakteriologicznego, a resztę przetrzymywano w zamrożeniu (temperatura — 18°C), do czasu obróbki. Odmrożone próbki o objętości 5—10 ml przygotowywano do badania w mikroskopie elektronowym.

Oczyszczanie i zagęszczanie wirusa. Postępowanie wzorowano na metodzie Englanda, Freye'a i Enrighta (10). Polegało ono na wstępnym oczyszczeniu materiału przez wirowanie z szybkością 3000 obr/min. przez 15 min., a następnie wirowaniu supernatantu w ultrawirówce VAC—601 (25 000 g przez 15 min., rotor kątowy 8X35). Supernatant wykorzystywano ponownie do końcowego ultrawirowania w VAC-601 (100 000 g przez 1 h, rotor kątowy 8X11). Po usunięciu supernatantu osad zawieszano w 0,2 ml wody podwójnie destylowanej. Dodawano równą objętość 4% roztworu soli sodowej kwasu fosforo-wolframowego (PTA-Na), o pH 6,3 i materiał nanoszono na siatki pokryte błoną formwarową i nasyłane węglem. Część materiału od prosiąt z PGR N. i od prosiąt z fermy N. M. poddawano eterowej ekstrakcji. Pole-