

MARCIN SZULC, ANNA STEFANIAKOWA,  
JAN TROPIŁO, BOŻENA STAŃCZAK

## Wpływ napromieniowania na właściwości lipolityczne bakterii\*

Katedra Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego, Wydział Weterynaryjny SGGW-AR,  
ul. Nowoursynowska 166, 02-975 Warszawa

Właściwości lipolityczne drobnoustrojów, a zwłaszcza bakterii stanowią bardzo istotne zagadnienie w dziedzinie higieny i technologii żywności. Właściwości lipolityczne bakterii określane były przez wielu autorów zagranicznych (1, 2, 5, 7, 8, 16) i krajowych (9, 11, 13, 20). Lipaza jest enzymem katalizującym hydrolizę tłuszczów, prowadząc do uwolnienia się kwasów tłuszczowych i glicerolu, które mogą podlegać dalszym przemianom do aldehydów i ketonów. Zjełczałe tłuszcze nie tylko posiadają obniżoną wartość odżywczą, ale również przy daleko posuniętym rozkładzie stają się szkodliwe dla ludzi i zwierząt (6, 10, 15). Stwierdzenie zależności między żywieniem zwierząt karmą zawierającą zjełczałe tłuszcze a wystąpieniem awitaminoz jest istotnym zagadnieniem w higienie żywienia (10, 15).

Należy również pamiętać, że w mięsie składowanym w warunkach chłodniczych proces rozkładu tłuszczu często poprzedza bakteryjne procesy proteolityczne. Wprawdzie straty spowodowane bakteryjnym jęlczeniem tłuszczu są mniejsze niż na skutek rozkładu gnilnego białek, lecz i one zasługują na uwagę tym bardziej, że daleko posunięty proces jęlczenia tłuszczu w mięsie może spowodować jego dyskwalifikację mimo braku zmian gnilnych. W tej sytuacji, obok przestrzegania podstawowych zasad higieny przetwórstwa spożywczego oraz równocześnie ze stosowaniem zabiegów utrwalających surowce i produkty spożywcze, na uwagę i rozpoznanie zasługują wszelkie czynniki, które mogłyby osłabić zdolność wytwarzania enzymów lipolitycznych przez bakterie, a więc ograniczyć ich właściwości lipolityczne. Jednym z takich czynników może być napromieniowanie bakterii promieniami X lub gamma, w stosunkowo małych dawkach, nie powodujących zabicia całej populacji bakteryjnej. W dostępnym piśmiennictwie nie spotkano informacji z tego zakresu.

Celami pracy są:

1. Określenie wpływu napromieniowania bakterii na właściwości lipolityczne generacji powstałych z komórek, które przetrwały działanie napromieniowania.
2. Określenie wpływu obecności białka w środowisku napromieniowania bakterii na właściwości lipolityczne powstałych generacji.
3. Określenie radiowrażliwości badanych bakterii.

### Materiał i metody

Badaniom poddano następujące szczepy bakterii pochodzące z kolekcji PZH: *Staphylococcus aureus* Nr L-1, *Pseudomonas fluorescens* Nr 143, *Bacillus subtilis* Nr 729 (formy wegetatywne).

Do doświadczeń używano:

- *S. aureus* — 24 godziną hodowlę na agarze odżywczym, inkubowaną w temp. 37°C,
- *P. fluorescens* — 24 godziną hodowlę na agarze odżywczym, inkubowaną w temp. 20°C,
- *B. subtilis* — 21 godziną hodowlę na agarze odżywczym, otrzymaną z przetrwalników inkubowanych w temp. 30°C.

Zawiesiny uzyskane po spotkaniu hodowli zbufozowanym roztworem fizjologicznym (PBS) doprowadzono do gęstości: *S. aureus* — około  $3,5 \times 10^8$  kom./cm<sup>3</sup>, *P. fluorescens* — około  $5,2 \times 10^8$  kom./cm<sup>3</sup>, *B. subtilis* — około  $4,5 \times 10^7$  kom./cm<sup>3</sup>.

Przygotowaną zawiesinę wyjściową rozcieńczano w jednakowych ilościach zbufozowanym roztworem fizjologicznym (środowisko bezbiałkowe) o zawartości 2% białka (środowisko o zawartości 1% białka). Następnie otrzymane zawiesiny wlewano do probówek o pojemności 1 cm<sup>3</sup> i oprócz zawiesiny kontrolnej poddawano napromieniowaniu odpowiednimi, wstępnie ustalonymi dawkami.

Bakterie napromieniowywano promieniami X przy następujących parametrach pracy aparatu: napięcie lampy — 200 kV, natężenie — 20 mA, moc dawki — 0,11 Gy/s (11 radów/s).

Ustalone i przyjęte we wstępnych doświadczeniach wielkości dawek napromieniowania szczepów wyniosły:

- *S. aureus*: 1, 100, 200, 300, 500 Gy.
- *P. fluorescens*: 1, 10, 100, 200 Gy,
- *B. subtilis*: 1, 10, 100, 200 Gy.

Po napromieniowaniu, zawiesiny badanych bakterii rozcieńczano w stosunku do znanego stężenia wyjściowego w takim stopniu, aby przy posiewach 0,2 cm<sup>3</sup> zawiesiny na podłoża stałe otrzymać wzrost pojedynczych kolonii, w liczbie około 20 kolo<sup>ni</sup> na płytce o średnicy 11 cm.

Każde rozcieńczenie wysiewano na dwie równoległe płytki, stosując dla badanych szczepów następujące podłoża:

- podłoże z Tween 80 dla *S. aureus*,
- podłoże z trójbutyryną dla *P. fluorescens* i *B. subtilis*.

Podłoże z Tween 80 wykonano zgodnie z przepisami podanymi przez Burbiankę i Pliszkową (4), a agar z trójbutyryną — wg normy BN-76-8050-04 (3).

Posiewy inkubowano w temp. 37°C (*S. aureus*) i (*B. subtilis*) oraz w temp. 20°C (*P. fluorescens*).

Po 48 godzinach inkubacji obliczano liczbę kolonii w celu ustalenia radiowrażliwości. Po 3 i 6 dniach określano właściwości lipolityczne na podstawie szerokości stref zmętnienia (na podłożu z Tween 80) lub rozjaśnienia (na podłożu z trójbutyryną) powstałych wokół wyrostów kolonii. Szerokość stref określano z dokładnością 0,5 mm.

We wstępnych badaniach sprawdzono również metodę „dołków agarowych” (14, 19). Ponieważ jednak nie otrzymano różnic między działaniem lipolitycznym bakterii napromieniowanych i nie napromieniowanych, strefę lipolizy oznaczano dla każdej kolonii bakteryjnej w sposób podany wyżej.

\*) Praca została wykonana w ramach programu rządowego PR-4.

Doświadczenie z każdym szczepem bakterii wykonano w 4–7 seriach (powtórzeniach), których liczba była uzależniona od powtarzalności otrzymanych wyników.

### Wyniki i omówienie

Z otrzymanych wyników indywidualnych obliczono średnie arytmetyczne dla każdej serii oddzielnie i dla wszystkich serii łącznie oraz odpowiadające im odchylenia standardowe.

Wyniki oznaczeń właściwości lipolitycznych opracowano dla odczytów wykonanych po 3 i 6 dniach inkubacji na podłożach diagnostycznych. Wyniki dla odczytu po 3 dniach wyrażono w tab. 1, w wartościach bezwzględnych (mm) wraz z odchyleniami standardowymi.

Radiowrażliwość bakterii przy stosowanych dawkach promieniowania X przedstawiono w tab. 2.

Wyniki przedstawione w tab. 1 wskazują, że jedynie przy badaniu *Bacillus subtilis* bakterie z zawiesin napromieniowanych wykazywały nieco słabsze właściwości lipolityczne od bakterii wyrosłych z zawiesin kontrolnych (nie napromieniowanych). Nie stwierdzono więc istotnego wpływu promieniowania na właściwości lipolityczne bakterii.

Porównując wyniki zestawione w tab. 1 i 2 obserwuje się, że napromieniowanie bakterii (przy tych samych dawkach promieniowania X) powoduje w większym stopniu (%) obumiera-

nie lub brak wzrostu populacji niż utratę właściwości lipolitycznych generacji powstałych w wyrosłych koloniach. Wskazuje to więc, że napromieniowane bakterie łatwiej obumierają lub przynajmniej przestają się rozwijać niż tracąc charakterystyczną cechę tworzenia enzymów lipolitycznych.

Porównanie wyników zestawionych w tab. 1 wskazuje, że strefy lipolizy powodowane przez kolonie wyrosłe z bakterii poddanych napromieniowaniu w PBS i bulionie są podobne. Można więc stwierdzić, że obecność lub brak białka w środowisku napromieniowania zawieszin nie wywiera znaczącego wpływu na właściwości lipolityczne generacji wyrosłych z bakterii napromieniowanych.

Wyniki przedstawione w tab. 2 wskazują, że wszystkie badane bakterie charakteryzują się dużą wrażliwością na promieniowanie X.

Z porównania wyników uzyskanych zwłaszcza przy dawce 100 i 200 Gy widać, że największą radiowrażliwością cechuje się szczep *P. fluorescens*, znacznie mniejszą *S. aureus* i najmniejszą *B. subtilis*. Fakt ten jest potwierdzeniem wyników badań przeprowadzonych w Katedrze (18).

Obserwacje te są również zgodne z danymi z piśmiennictwa, z których wynika, że gatunek *Pseudomonas fluorescens* należy do bakterii o największej radiowrażliwości (12).

Tab. 1. Właściwości lipolityczne bakterii napromieniowanych w środowisku bezbiałkowym i białkowym po 3 dniach inkubacji

Badane bakterie	Środowisko	Wielkość strefy lipolizy (w mm) przy bakteriach kontrolnych (nie napromieniowanych) i napromieniowanych dawkami ( $\bar{x} \pm s$ )						
		Kontrola	1 Gy	10 Gy	100 Gy	200 Gy	300 Gy	500 Gy
<i>Staphylococcus aureus</i> Nr L-1	PBS	3,18 $\pm$ 1,19	3,20 $\pm$ 0,59	nie badano	3,42 $\pm$ 0,61	3,24 $\pm$ 0,64	3,76 $\pm$ 0,65	3,82 $\pm$ 0,80
	1% białka	3,37 $\pm$ 1,53	3,87 $\pm$ 0,96	nie badano	3,37 $\pm$ 0,76	3,95 $\pm$ 0,81	4,0 $\pm$ 1,23	4,17 $\pm$ 0,96
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Nr 143	PBS	2,93 $\pm$ 0,95	2,65 $\pm$ 0,56	3,52 $\pm$ 0,60	2,97 $\pm$ 0,60	2,80 $\pm$ 1,18	nie badano	nie badano
	1% białka	3,63 $\pm$ 0,41	3,42 $\pm$ 0,51	3,95 $\pm$ 0,38	3,16 $\pm$ 0,69	3,05 $\pm$ 0,76	nie badano	nie badano
<i>Bacillus subtilis</i> Nr 729	PBS	4,41 $\pm$ 1,33	4,16 $\pm$ 1,34	4,14 $\pm$ 1,30	3,94 $\pm$ 0,72	3,80 $\pm$ 0,80	nie badano	nie badano
	1% białka	5,03 $\pm$ 1,34	3,87 $\pm$ 1,17	4,04 $\pm$ 1,0	4,40 $\pm$ 0,81	4,75 $\pm$ 1,65	nie badano	nie badano

Tab. 2. Przeżywalność bakterii pod wpływem napromieniowania (%)

Badane bakterie	Kontrola (bakterie nie napromieniowane)		Bakterie napromieniowane dawkami (w Gy)											
			1		10		100		200		300		500	
	PBS	B	PBS	B	PBS	B	PBS	B	PBS	B	PBS	B	PBS	B
<i>Staphylococcus aureus</i> Nr L-1	100	100	90,1	95,2	nie badano		29,4	38,2	8,8	11,6	1,1	5,1	0,01	0,53
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Nr 143	100	100	98,8	97,0	48,7	46,4	0,0834	8,56	0,0002	0,66	nie badano		nie badano	
<i>Bacillus subtilis</i> Nr 729	100	100	96,9	90,4	72,5	73,3	47,0	52,2	29,4	32,0	nie badano		nie badano	

Objaśnienia: PBS — zbuforowany roztwór fizjologiczny, B — środowisko o zawartości 1% białka.

Na uwagę zasługuje fakt, że już po najmniejszej stosowanej dawce (1 Gy) obserwuje się wyraźne zmniejszenie liczby bakterii. Zjawisko to obserwowano również we wcześniejszych badaniach (17, 18).

Analizując wyniki oznaczania radiowrażliwości bakterii napromieniowanych w środowisku bezbiałkowym i białkowym (tab. 2) stwierdza się, że bakterie w środowisku białkowym są bardziej odporne na działanie promieni X niż te same bakterie napromieniowane w środowisku bezbiałkowym. I w tym przypadku następuje potwierdzenie wyników badań wykonanych poprzednio w Katedrze (17, 18).

### Wnioski

1. Napromieniowanie bakterii *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* oraz form wegetatywnych *Bacillus subtilis* nie powoduje istotnych zmian we właściwościach lipolitycznych generacji wyrosłych z bakterii poddanych napromieniowaniu w środowisku białkowym i bezbiałkowym.

2. Największą radiowrażliwością z badanych szczepów charakteryzował się *Pseudomonas fluorescens*, znacznie mniejszą *Staphylococcus aureus* i formy wegetatywne *Bacillus subtilis*.

3. Obecność białka w środowisku napromieniowania bakterii (bulion) zmniejsza ich radiowrażliwość (w porównaniu z PBS).

### Piśmiennictwo

1. Alford I. A., Steinle E. E.: J. appl. Bact. 30, 488, 1967.
2. Brandl E.: Die Osterreichische Milchwirtschaft. 25, 89, 1970.
3. Branżowa norma BN-76-8050-04.
4. Burbianka M., Płiszka A.: Mikrobiologia żywności. PZWL, 1977.
5. Coretti K.: Fleischwirtschaft. 45, 21, 1965.
6. Faruga A.: Drob. 18, 10, 1970.
7. Fryer T. F., Reiter B., Laurance R. C.: J. Dairy Sci. 50, 388, 1967.
8. Fryer T. F., Laurance R. C., Reiter B.: J. Dairy Sci. 50, 477, 1967.
9. Jeliński M., Kostecki R., Służewska M.: Medycyna Wet., 32, 600, 1976.
10. Kaszubkiewicz Cz., Wartenberg L.: Medycyna Wet. 17, 166, 1961.

11. Komorowski A., Zahaczewski J.: Medycyna Wet. 30, 222, 1974.
12. Marcy R. B., Thuari N. P.: Radiation preservation of food. IAEA, Vienna, 491, 1973.
13. Ożdżyńska E., Kafel S.: Medycyna Wet. 24, 225, 1968.
14. Reuter G.: Fleischwirtschaft. 51, 67, 1971.
15. Sobiepanek M.: Drob. 14, 10, 1966.
16. Schreiber G.: Mh. Vet-Med. 25, 624, 1970.
17. Szulc M., Stefaniakowa A., Tropiło J., Stańczak B., Pęconek J., Mierzevska H., Bielecka J.: Medycyna Wet. 33, 584, 1978.
18. Szulc M., Stefaniakowa A., Stańczak B., Pęconek J.: Medycyna Wet. 36, 540, 1980.
19. Uradziński J.: Wpływ ogrzewania na wybrane przejawy życiowe bakterii istotnych w higienie mięsa. Praca dokt. ART Olsztyn, 1978.
20. Zahaczewski J., Komorowski A.: Medycyna Wet. 28, 632, 1972.

Adres autora: prof. dr hab. Marcin Szulc, ul. Bielańska 3 m. 25, 00-036 Warszawa

Шульц М., Стефаникова А., Тропило Я., Станчак Б. — Влияние облучения на липолитические свойства бактерий

Исследованиями подвергли следующие бактерии: *S. aureus*, *P. fluorescens* и *B. subtilis*. Бактерии, подвешенные в белковой (1% белка) и безбелковой среде, облучали лучами X, применяя однократно дозы 1—500 Gy. Для определения липолитических свойств исследования выполнили на среде с Tween 80 и агаре с 3-бутирином. На основе полученных результатов констатировали, что 1-кратное облучение бактерий *S. aureus*, *P. fluorescens*, а также вегетативных форм *B. subtilis* не вызывает существенных изменений в липолитических свойствах генераций, выросших из бактерий, подвергнутых облучению в белковой и безбелковой средах.

Szulc M., Stefaniakowa A., Tropiło J., Stańczak B. — The influence of irradiation on lipolytic properties of bacteria

There were investigated the following bacteria: *S. aureus*, *P. fluorescens* and *B. subtilis*. The bacteria suspended in a protein medium (1.0% of protein) and in a medium without proteins were exposed to x-rays using single doses from 1 to 500 Gy. Lipolytic activity of bacteria was determined on the medium containing Tween 80 and on an agar with arbutin. It was found that a single exposition of *S. aureus*, *P. fluorescens* and vegetative forms of *B. subtilis* does not influence lipolytic activity of new generations of bacteria obtained from those exposed to irradiation in media with or without addition of proteins.

**WARDROPE D. D., MAC LEOD N. S. M.:** Ognisko listeriozowego zapalenia mózgu i opon mózgowych u młodych jagniąt. (Outbreak of listeria meningoccephalitis in young lambs). Vet. Rec. 113, 213—214, 1983 (10).

Listerioza wystąpiła u jagniąt w wieku 5 tygodni w stadzie liczącym 200 maciorek i 240 jagniąt. W okresie 10 dni padło 10 jagniąt wśród objawów osłabienia, niechęci do jada i nieznacznego stopnia porażenia kończyn tylnych. Na około 12 godzin przed śmiercią wystąpił kręczy szyi i silne ślinienie. Jagnięta padały po około 3,5 dniach po wystąpieniu objawów klinicznych. W obserwowanym stadzie nie występowały uprzednio ani przedwczesne porody, ronienia lub listerioza mózgu. Z mózgu trzech jagniąt wyizolowano w czystej kulturze *Listeria monocytogenes*. Wyosobnione szczepy były wrażliwe na chloramfenikol, streptomycynę, tetracyklinę, neomycynę, furazolidon, trimetoprim i penicylinę.

**ROLAND N. C., CRAIG T. M.:** Fenbendazol w leczeniu zakażeń psów wywołanych przez *Heterobilharzia americana*. (Fenbendazole for the treatment of *Heterobilharzia americana* infection in dogs). J. Am. vet. med. Ass. 182, 172, 1983 (2).

Badania nad leczeniem zakażeń wywołanych przez *Heterobilharzia americana* przeprowadzono na 2 psach zarażonych doświadczalnie przed dwoma laty około 450 cercariami pasożyta. Badanie kału przed przystąpieniem do leczenia wykazało obecność jaj *H. americana*. Leczeniu poddano jednego psa, który otrzymywał codziennie przez okres 10 dni fenbendazole w dawce 40 mg/kg masy ciała. Psy uśpiono 17 dnia i badano w kierunku występowania dojrzałych postaci *H. americana* w żyłach kręzkowych i w krążeniu wrotnym. U psa nie leczonego stwierdzono 154 samce i 96 samic *H. americana*, natomiast u psa leczonego nie stwierdzono pasożytów.