

Новаковский З. — Содержание минеральных веществ в костном мозгу в зависимости от возраста и вида животных

Определено уровень минеральных веществ — Ca, P, K, Na, Mg, Fe, Zn, Cu, Mn и Co в костном мозгу плечевых костей в зависимости от возраста и вида животных, а также по сравнению с мышечной тканью *m. longissimus thoracis et lumborum*.

Кости происходили от 24 туш свиней и 24 туш скота (самки), с дифференциацией на 2 группы: а) молодые особи — свиньи массой 70—80 кг, скот возрастом ок. 2 лет, б) взрослые особи — свиньи массой 120—150 кг, скот возрастом ок. 7 лет.

Количественный уровень минеральных веществ, за исключением фосфора, определялся в золе методом ASA, а уровень фосфора — весовым методом по Польской норме по отношению к массе свежей пробы. Результаты подвергнуто статистическому анализу ( $\bar{x} \pm s$ ), а влияние факторов изменчивости определено тестом t-Такея при  $\alpha \leq 0,01$ . Отмечено, что: 1) костный мозг характеризуется высшим уровнем Ca а низким K, Mg, Zn, P, Na, Cu и Co чем мышечная ткань, 2) возраст животных влияет существенно на уровень минеральных веществ; костный мозг молодых свиней по сравнению со старшими содержит больше Ca, Na, Mg, Zn и Cu, а меньше Mn и Co; костный мозг молодого скота содержит меньше P, Cu, Mn и Co, а больше Na чем костный мозг старшего скота, 3) вид животного является существенным фактором изменчивости — костный мозг свиней по сравнению с костным мозгом скота содержит больше всех исследуемых элементов, 4) костный мозг, а также мышечная ткань свиней и скота отличаются неблагоприятным кальций-фосфорным равновесием.

Nowakowski Z. — The content of mineral components in the bone-marrow in relation to age and species of animals

There was determined the level of mineral components, i. e. Ca, P, K, Na, Mg, Fe, Zn, Cu, Mn, and Co in the branchial bone-marrow in relation to age and species of animals, and in comparison to muscle tissue (*m. longissimus thoracis et lumborum*). The bones came from 24 pig and 24 bovine carcasses divided into two groups: a — young pigs of 70—80 kg, cattle aged about 2 years, b — adult animals, i. e. pigs of 120—150 kg, cattle over 7 years. The amount of mineral components (apart from P) was determined according to the ASA method and the level of P by the weight method according to Polish Regulations in relation to the fresh weight of samples. The results were analysed statistically the influence of factors of variation was assessed by T-Tukey's test ( $\alpha \leq 0.01$ ).

It was found that: 1 — The bone-marrow of pigs and cattle possessed a higher level of Ca and lower concentration of K, Mg, Zn, P, Na, Cu and Co than muscles, 2 — The age of animals influenced significantly the level of mineral components; the bone-marrow of young pigs compared with older ones contained more Ca, Na, Mg, Zn, and Cu, and less Mn and Co; the bone-marrow of young cattle had less P, Ca, Mn, and Co, and more Na than that of older cattle. 3 — The species of animals was an essential factor of variation the bone-marrow of pigs compared with that one of cattle, contained more the all minerals examined. 4 — The bone-marrow and muscles of pigs and cattle had an unfavourable Ca:P balance.

EWA OSUCHOWSKA\*) JOHN DUFRENNE, HARRY BECKERS, SERVE NOTERMANS

## Badania nad występowaniem i toksycznością bakterii z rodzaju *Aeromonas* wyizolowanych z mięsa

Sekcja Higieny Żywności Instytutu Zdrowia Publicznego i Ochrony Środowiska,  
3720 EA Bilthoven, Holandia

W ostatnich latach w piśmiennictwie światowym pojawia się coraz więcej prac omawiających znaczenie drobnoustrojów z rodzaju *Aeromonas* w zatruciach pokarmowych oraz w innych schorzeniach u ludzi (11). Głównym źródłem zakażenia tymi bakteriami wydaje się być woda oraz żywność pochodząca ze środowiska wodnego jak ryby, ostrygi i krewetki (1, 11). Ukazują się jednak doniesienia o występowaniu tych drobnoustrojów również w takich rodzajach żywności jak warzywa, mleko, wędliny, drób, wołowina i wieprzowina (6, 9, 10, 12).

Równocześnie prowadzone są badania nad właściwościami chorobotwórczymi *Aeromonas*. Wiadomo już, że drobnoustroje te wytwarzają toksyny, które można wykazać w próbach biologicznych na zwierzętach doświadczalnych (7) oraz w sztucznych hodowlach różnych linii komórkowych, w których wywierają działanie cytotoksyczne (11).

Badania nad wytwarzaniem toksyn dotyczyły głównie szczepów *Aeromonas* izo-

lowanych z kału ludzi chorych oraz z wody (1, 2, 3, 5, 13). W nielicznych tylko pracach badano toksynotwórczą zdolność omawianych bakterii wyizolowanych z żywności. Stwierdzono (6), że 100% szczepów *A. hydrophila* oraz tylko 6% szczepów *A. caviae* pochodzących z warzyw wytwarzało cytotoksyny dla linii komórkowej HeLa, a większość z nich wytwarzała również homolizyny.

W innych badaniach (10) wykazano, że 69% wyizolowanych z mięsa (drób, wołowina, wieprzowina) szczepów *Aeromonas* miało aktywność cytotoksyczną dla linii komórkowej AYL, a 64% dla linii komórkowej CHO. Wszystkie szczepy cytotoksyczne wytwarzały również homolizyny.

Dane te dają podstawę do poglądu, że żywność może być źródłem zakażeń lub/i zatruczeń pokarmowych ludzi drobnoustrojami *Aeromonas*. Ze względu jednak na małą liczbę dotychczasowych badań nad tym problemem, konieczne są dalsze szersze badania nad częstotliwością występowania tych bakterii oraz nad ich zdolnością toksynotwórczą. W tym celu pod-

\*) Praca wykonana w czasie stażu naukowego.

jęto badania własne nad ilościowym występowaniem omawianych drobnoustrojów w mięsie wołowym, wieprzowym i ryb oraz nad toksynotwórczością niektórych wyizolowanych z tego mięsa szczepów.

**Materiał i metody**

Do badań użyto 20 próbek wołowiny, 22 próbki wieprzowiny i 20 próbek różnych gatunków ryb. Mięso przeznaczone do badań, nie poddawane żadnym zabiegom kulinarnym ani technologicznym, kupowano w stanie surowym w różnych sklepach i w różnym czasie oraz wykonywano posiewy niezwłocznie po dostarczeniu prób do laboratorium. W tym celu przygotowano homogenizaty oraz kolejne rozcieńczenia według ogólnie przyjętych zasad i wysiewano 0,5 ml z poszczególnych rozcieńczeń na 2 równoległe płytki podłoża Ampicilin Dextrin Agar (ADA) (8). Posiane płytki inkubowano w temperaturze 30°C przez 24 godz. Następnie liczono charakterystyczne (duże, żółte) kolonie, a ponadto izolowano po 5 typowych kolonii z każdej płytki, w celu potwierdzenia przynależności badanych bakterii do rodzaju *Aeromonas*. W tym celu badano je na zdolność wytwarzania oksydazy, typ rozkładu węglowodanów w podłożu popłynym (test oksydacyjno-fermentacyjny), rozkładu glukozy z wytwarzaniem gazu lub bez, rozkładania eskuliny oraz na ruch. Testy te dają jednocześnie podstawę do różnicowania szczepów z rodzaju *Aeromonas* na gatunki *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*.

Badania nad toksynotwórczością wykonano na 31 wyizolowanych szczepach *Aeromonas* (18 szczepów *A. hydrophila*, 9 *A. caviae* i 4 *A. sobria*) oznaczając ewentualną obecność oraz aktywność hemolityczną enterotoksyny cytotoksycznej (Asao-toxin), obecność beta-hemolizyny, cytotoksyny dla komórek Vero (Vero cell toxin), proteaz oraz toksyny analogicznej do toksyny przecinkowca cholery (cholera-like toxin).

W celu oznaczenia obecności oraz aktywności hemolitycznej enterotoksyny cytotoksycznej (Asao-toxin) namnażano szczepy na podłożu Davisa, inkubując je 10 godz w 30°C, następnie hodowlę odwirowywano i przesączało (4). Obecność enterotoksyny cytotoksycznej wykazywano przy pomocy testu ELISA oraz badano jej zdolność do hemolizy krwinek królika przed i po zneutralizowaniu antytoksyną Asao IgG. Wynikiem dodatnim było wykazanie obecności Asao toksyny testem ELISA z równocześnie stwierdzoną zdolnością do hemolizy użytych krwinek, która nie występowała po inaktywizacji swoistą antytoksyną (anty-Asao IgG).

W celu wykazania obecności lub braku beta-hemolizyny szczepy namnażano w płynnym wyciągu mózgowo-sercowym w czasie 18 godz w temperaturze 37°C i po uzyskaniu hodowli (5) badano aktywność hemolityczną szczepów w stosunku do krwinek królika po kilkakrotnym zneutralizowaniu antytoksyną Asao IgG. Za wynik dodatni uważano stwierdzenie hemolizy, która nie ulegała zneutralizowaniu antytoksyną Asao.

Zdolność do wytwarzania cytotoksyny dla komórek Vero (Vero cell toxin) badano inkubując poszczególne szczepy w mleku przez 40 godzin w 30°C, a po odwirowaniu i przesączeniu dodawano supernatant tak przygotowanych rozcieńczonych hodowli do hodowli linii komórkowych Vero (3) — po uprzednim zneutralizowaniu przesączów antytoksyną Asao oraz po ogrzaniu ich do temperatury 56°C w czasie 20 min. Za wynik dodatni uważano te hodowle, w których stwierdzono toksyczne oddziaływanie badanych supernatantów na komórki Vero (zmiany cytopatyczne) — po zneutralizowaniu antytoksyną Asao oraz brak zmian cytopatycznych po ogrzaniu supernatantów do 56°C.

W celu stwierdzenia obecności proteaz namnażano badane szczepy na podłożu kazeinowo-tryptonowym inkubując je 45 godz. w 20°C. Aktywność proteolityczną przesączów hodowli określano dokonując dwukrotnie pomiaru ekstynkcji w czasie 0( $t_0$ ) i po 10 min. ( $t_{10}$ ). Odpowiedni wzrost wartości ekstynkcji

$$\left(\frac{t_{10}}{t_0} > 2,3\right)$$

świadczy o zdolności proteolitycznej badanego szczepu. Zdolność toksynotwórczą na obecność toksyny analogicznej do toksyny przecinkowca cholery (cholera-like toxin) badano namnażając szczepy w bulionie peptonowo-drożdżowym w czasie 18 godz. w temperaturze 35°C i po ich przygotowaniu wykonano oznaczanie serologiczne przy pomocy testu ELISA (13).

**Wyniki i omówienie**

Uzyskane wyniki przedstawiono w tab. 1 i 2. Obecność drobnoustrojów z rodzaju *Aeromonas* wykazano w 60% próbek mięsa wołowego, w 68% próbek mięsa wieprzowego oraz w 80% próbek mięsa ryb.

W obrębie rodz. *Aeromonas* najczęściej występował gatunek *A. hydrophila*, który stanowił około 76% wszystkich wyizolowanych szczepów. *A. caviae* stanowił 19%, *A. sobria* — 5%. Podobną częstotliwość poszczególnych gatunków *Aeromonas* w mięsie uzyskano w badaniach wykonanych w USA (10). W badaniach własnych stwierdzono niewielką różnicę w ilości i częstotliwości występowania omawianych bakterii w mięsie ryb oraz w mięsie pozostałych gatunków zwierząt.

Tab. 1. Występowanie *Aeromonas* sp. w mięsie wołowym, wieprzowym i ryb

Rodzaj i liczba próbek	liczba drobnoustrojów z rodzaju <i>Aeromonas</i> w 1 g						
	brak	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>
Mięso 20 wołowe	8	1 <sup>x</sup>	—	5	3	2	1
Mięso 22 wieprzowe	7	1	3	7	2	2	—
Mięso 20 ryb	4	3	4	5	2	2	—

Objaśnienie: \*) — liczba próbek o danym stopniu zakażenia.

Tab. 2. Wytwarzanie niektórych toksyn bakteryjnych przez szczepy *Aeromonas* wyizolowane z mięsa

Gatunki <i>Aeromonas</i>	liczba zbadanych szczepów	Rodzaje toksyn i enzymów				
		enterotoksyna Asao	cytotoksyna Asao	beta-hemolizyna	cytotoksyna Vero	proteaza
<i>A. hydrophila</i>	18	16 <sup>x</sup>	11	2	14	—
<i>A. caviae</i>	9	1	—	—	5	—
<i>A. sobria</i>	4	1	1	—	3	—

Objaśnienie: \*) liczba szczepów wytwarzających daną toksynę.

88,8% przebadanych szczepów *A. hydrophila* wytwarzało enterotoksynę Asao, 61% — beta-hemolizynę, a 77,7% — enzymy proteolityczne. Spośród pozostałych gatunków 1 szczep *A. caviae*, wyizolowany z mięsa ryb, wytwarzał enterotoksynę Asao, a 1 szczep *A. sobria* wyizolowany z wieprzowiny — enterotoksynę Asao oraz beta-hemolizynę. Łącznie 61,5% przebadanych szczepów *A. caviae* i *A. sobria* wykazało aktywność proteolityczną.

U dwu szczepów *A. hydrophila*, wyizolowanych z wieprzowiny i mięsa ryb stwierdzono cytotoksynę *Vero*. Szczepy te wytwarzały także enterotoksynę Asao, beta-hemolizynę i proteazy. Były to zatem drobnoustroje o szczególnie dużej aktywności toksynotwórczej i enzymatycznej.

Jeden szczep *A. hydrophila*, wyizolowany z wołowiny oraz 1 szczep *A. sobria*, wyizolowany z wieprzowiny, były cytotoksyczne dla komórek *Vero* po ogrzaniu w temperaturze 56°C w czasie 20 min. Żaden z badanych szczepów *Aeromonas* nie wytwarzał toksyny analogicznej do toksyny przecinkowca cholery. Nie stwierdzono zależności między zdolnością do wytwarzania poszczególnych toksyn, a rodzajem mięsa, z którego izolowano badane szczepy *Aeromonas*.

W badaniach własnych stwierdzono wysoki stopień skażenia mięsa drobnoustrojami z rodzaju *Aeromonas* oraz stosunkowo dużą aktywność proteolityczną wyizolowanych szczepów wszystkich trzech gatunków *Aeromonas*, co wskazuje na możliwość wywoływania psucia się żywności zanieczyszczonej tymi drobnoustrojami. Biorąc pod uwagę fakt, że liczba tych bakterii wzrasta w miarę przechowywania żywności (mleko, warzywa, mięso) w temperaturze 4°C (6, 12), wolno wyprowadzić wniosek, że omawiane drobnoustroje mogą stać się przyczyną psucia się żywności przechowywanej w chłodni.

Uzyskane wyniki własne potwierdzają wykazaną już wcześniej (6, 10) zdolność do wytwarzania enzymów cytotoksycznych przez szczepy izolowane z żywności. Podobnie jak w wymienionych pracach — najwyższą aktywność toksynotwórczą stwierdzono u *A. hydrophila* ale podobne właściwości miały również pojedyncze szczepy pozostałych gatunków *Aeromonas*. Stwierdzono wysoką korelację między wytwarzaniem cytotoksyn, a właściwościami hemolitycznymi poszczególnych szczepów. Cytotoksyny produkowane przez większość badanych szczepów były ciepłochwienne i ulegały inaktywacji w temperaturze 56°C w czasie 20 min. W dwu przypadkach jednak (1 szczep *A. hydrophila* i 1 szczep *A. sobria*) temperatura ta nie inaktywowała stwierdzonych cytotoksyn.

Otrzymane wyniki własne oraz dane z nielicznych badań wcześniejszych wskazują, że mięso może być źródłem zakażenia lub/i zatrucia ludzi drobnoustrojami *Aeromonas*.

## Piśmiennictwo

1. Abeyta C., Kaysner C.: J. Fd Protect. 49, 643, 1986.
2. Agger W. A., Mc Cormick J. D., Gurwith M. J.: J. Clinical Microbiol. 21, 969, 1985.
3. Berer M. R., Millership S. E., Tabaqchali S.: J. Med. Microbiol. 22, 333, 1986.
4. Buchanan R. L., Patumbo S. A.: J. Fd. Safety 7, 15, 1985.
5. Burke V., Graeey M., Robinson J.: J. Infect. Dis. 143, 68, 1983.
6. Callister S. M., Agger W. A.: Appl. Environ. Microbiol. 53, 249, 1987.
7. Fenhauer K., Scheibner G.: Arch. exper. Vet. med. 41, 211, 1987.
8. Havelaar A. M., During M.: an Ampicillin Dextrin Agar medium for the enumeration of *Aeromonas* species in water by membrane filtration. Materiały Instytutu Zdrowia Publicznego i Ochrony Srodowiska, Bilthoven 1985.
9. Hunter P. R., Burge S. H.: Letters Appl. Microbiol. 4, 45, 1987.
10. Okrend A. J., Rose B. E., Bennet B.: J. Fd Protect. 50, 509, 1987.
11. Osuchowska E.: Medycyna Wet. 43, 535, 1987.
12. Patumbo S. A., Meximo F., Williams A. C.: Appl. Environ. Microbiol. 50, 1027, 1985.
13. Shimada T., Sakazaki R., Morigome K.: Japan. J. Med. Sci. Biol. 37, 141, 1984.

Adres autora: Ewa Osuchowska, ul. Warszawska 68 m 10, 10-084 Olsztyn

Осуховская Э., Дюфрени Ж., Бекерс Г., Нотерманс С. — Исследования появления и токсичности бактерий из рода *Aeromonas*, изолированных из мяса

Исследования касались количественного появления микроорганизмов *Aeromonas* в мясе и токсинообразовательных свойств некоторых штаммов, изолированных из мяса.

Показали, что бактерии *Aeromonas* появились в 60% проб говядины, в 68% свинины и в 80% мяса рыб. Чаще всего появлялся вид *A. hydrophila* (76% всех штаммов). Отметим протеолитическую активность большинства изолированных штаммов всех 3 видов *Aeromonas* (у 77% *A. hydrophila* и у 61% *A. caviae* и *A. sobria* вместе).

Кроме того, отметили, что 88% штаммов *A. hydrophila* образовало энтеротоксин Asao, 61% — гемолизин бета а 2 штамма — цитотоксин *Vero*. Упомянутые токсины обнаружили также у отдельных штаммов *A. caviae* и *A. sobria*.

Цитотоксины, образуемые большинством исследуемых штаммов, были термолabile и подвергались инактивации в темп. 56°C в течение 20 мин. 2 штамма (1 *A. hydrophila* и 1 *A. sobria*) образовали в системе клеток *Vero* (в учтенных условиях) термостабильный цитотоксин. Ни один из исследуемых штаммов не образовал токсина, аналогичного токсину вибриона холеры.

Osuchowska E., Dufrenne J., Beckers H., Notermans S. — The occurrence and toxicity of *Aeromonas* sp isolated from meat

The purpose of the work was to assess the number of *Aeromonas* sp in meat and to determine their toxicity. It was found that *Aeromonas* sp occurred in 60% of meat samples taken from cattle, in 68% of pork samples and in 80% of fish meat. Most often there appeared *Aeromonas hydrophila* (76% of the strains). Proteolytic activity was found in the majority of strains isolated, i.e. in 77% of *A. hydrophila* and in 61% of *A. caviae* and *A. sobria*. Besides, 88% of *A. hydrophila* produced enterotoxin Asao, 61% — beta-haemolysins and two strains cytotoxins for *Vero* cells. The mentioned toxins were also noted among some strains of *A. caviae* and *A. sobria*. The cytotoxins were thermolabile (they were inactivated at 56°C within 20 min). However, two strains — *A. hydrophila* and *A. sobria* — produced cytotoxins which appeared to be thermostable. None of the strains generated toxins similar to *A. cholerae* toxin.