

Strach S., Bohosiewicz M. — **Untersuchungen über Toxizität des Unkrauttilgungspräparats „Pielik“ bei Schweinen.**

Im Laufe von 40 Tagen wurde 16 Ferkeln das Futter mit Zusatz von 15—100 mg Präparats „Pielik“ (2,4 — D) pro 1 kg Gewicht verabreicht. Sowohl in der Versuchszeit wie auch in der Kontrollperiode ist kein Abweichen vom normalen Benehmen der Tiere wahrgenommen worden. Die Zahl der Erythro- und Leukocyten, das Niveau von Hb und die innere Körpertemperatur haben im Laufe und nach Abschluss der Untersuchungen keine wesentlichen Differenzen im Vergleich zu den Ausgangswerten erwiesen. Die Gewichtszunahme gestaltete sich in den Versuchsgruppen höher als in der Kontrollgruppe.

FELIKS NAGÓRSKI

Warszawa

Teoretyczne podstawy metod klinicznego badania białek surowicy krwi (refraktometria, elektroforeza)

Oznaczanie ilości białka w surowicy jest połączone z licznymi trudnościami, które związane są z tym, że białka na ogół nie oznaczają się wprost, lecz jedynie pewne jego składniki, lub charakterystyczne właściwości fizyczne (zawartość azotu, wiązania peptydowe, ciężar właściwy, refrakcja światła, lepkość itd.). Każda z tych metod posiada dobre strony i braki. Nie będą tu one jednak omawiane, ponieważ białko całkowite w rutynowych badaniach klinicznych oznaczają się najczęściej metodą refraktometryczną i tej to metodzie poświęcono głównie uwagę.

Podstawą refraktometrii jest zdolność niejednolitego załamania się promieni świetlnych w różnych środowiskach. Promienie świetlne przechodząc przez różne środowiska, zmieniają swój kierunek i załamują się. Stosunek sinusa kąta padania do sinusa kąta załamania nosi nazwę współczynnika refrakcji, który dla danej substancji zależy od długości fali światła. Im dłuższa fala jest krótsza, tym silniej zostaje załamany promień światła i tym większy jest współczynnik załamania. Współczynnik załamania zmienia się w zależności od temperatury i dla różnych substancji waha się w granicach 1,3 do 1,8, przy tym wysoki współczynnik zdarza się rzadko.

Współczynnik załamania surowicy jest sumą współczynników załamania poszczególnych składników. Przy oznaczaniu współczynnika załamania surowicy dodaje się do współczynnika załamania wody destylowanej $n_D = 1,33320$ wartości poszczególnych składników podanych przez Reissa:

dla 1% białka	0,00195
dla 1% NaCl	0,00160
dla 1% KCl	0,00134
dla 1% mocznika	0,00145
dla 1% cukru gron.	0,00142

Współczynnik refrakcji surowicy normalnej jest zatem sumą wartości dwóch grup składników: krystaloidów i białka. Krystaloidy przy jednakowym stężeniu posiadają prawie taki sam wpływ na współczynnik załamania, jak białko. Jednak krystaloidy znajdują się w surowicy w o wiele większym rozcieńczeniu, aniżeli białko (NaCl w stężeniu 0,65%, glukoza 0,10%, białko natomiast w 6—8%). Dlatego współczynnik refrakcji surowicy zależy głównie od wahań stężenia białka.

Znaczna ilość lipoproteidów w surowicy może wpływać na dokładność oznaczania zawartości białka i nie zawsze pokrywają się one w tych przypadkach z danymi otrzymanymi metodą Kjeidahl. Metoda posiada jednak tę dobrą stronę, że jest prosta w użyciu i do badań wystarczy tylko jedna kropla surowicy. Według Siebemanna (1937) cyt. wg Kirka, metoda refraktometryczna, przy zachowaniu pewnych ostrożności, może być stosowana do oznaczania białka surowicy,

Das mit 200 mg Präparat pro 1 kg Gewicht versetzte Futter wurde von Tieren innerhalb 5 Tage aufgenommen, das mit 400—800 mg pro 1 kg Gewicht im Laufe von 1—3 Tagen verzehrt, dagegen das normale Futter nahmen die Tiere gierig auf. Futtergeruch mit Zusatz von beträchtlichen Gaben „Pielik“ ist derart durchdringend und abstossend, dass die Ferkel keine Lust zeigen es aufzunehmen.

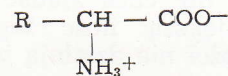
Eine langdauernde Verabreichung des Präparats in Dosen bis 100 mg pro 1 kg Gewicht sowie eine einmalige Verabreichung desselben in höheren Gaben ruft keine Vergiftungserscheinungen hervor. Tatsächlich das in normalen Umständen verabreichte Präparat „Pielik“ hat keine tödliche Intoxikation bei Ferkeln zur Folge.

wicy, na równi z innymi metodami. Szczególnie ważnym warunkiem przy oznaczaniu współczynnika załamania jest utrzymanie stałej temperatury (17,5°C). Ilości białka otrzymuje się z tablic Reissa.

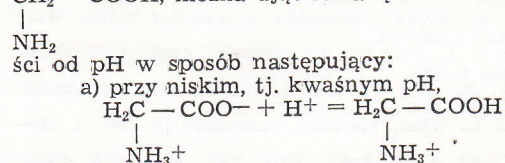
Rozdział białek surowicy za pomocą elektroforezy.

Pod terminem elektroforeza rozumiemy zjawisko wędrowania naładowanych cząsteczek koloidów w polu elektrycznym, przy czym cząsteczki naładowane ujemnie wędrują do anody, a naładowane dodatnio do katody.

Rozdział białek w polu elektrycznym prądu stałego jest dzięki temu możliwy, że białka posiadają naturę amfolitu, i że własności buforowe białek opierają się na budowie tzw. dipolu, którego wzór przedstawia się następująco:

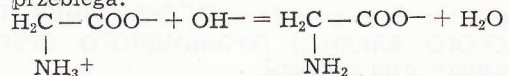


W roztworze zatem występują dwie postacie dysocjacji: dysocjacja grupy karboksylowej ($\text{R} - \text{COO}^-$), jak i dysocjacja zasadowa grupy aminowej ($\text{R} - \text{NH}_3^+$). Ładunek cząsteczki białkowej zależy od ilości grup kwaśnych i zasadowych, jakie znajdują się w cząsteczce białkowej oraz od stężenia jonów wodorowych środowiska (pH). Biorąc dla przykładu najbardziej prosty aminokwas glicynę, którego wzór jest $\text{CH}_2 - \text{COOH}$, można ująć zmianę ładunku w zależności od pH w sposób następujący:



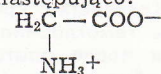
Glicyna w grupie aminowej posiada ładunek dodatni i jako kation wędruje do katody.

b) przy pH wysokim, tj. zasadowym reakcja przebiega:



gdzie grupa karboksylowa posiada ładunek ujemny i glicyna jako anion wędruje do anody.

c) przy pH obojętnym grupa aminowa i karboksylowa ulega dysocjacji i wtedy reakcja przebiega następująco:



Ładunek dodatni i ujemny wzajemnie się wtedy zobojętniają i glicyna przy tym pH posiada ładunek — 0.

Kiedy cząsteczki białka w polu elektrycznym nie przejawiają ruchu, to takie pH, przy którym w ten sposób białko się zachowuje, nazywa się punktem izoelektrycznym. Punkt taki jest swoisty dla każdego białka. Podobnie jak glicyna zachowuje się większość białek, szczególnie zaś białka surowicy krwi. Dla białek osocza określono następujące wartości punktu izoelektrycznego:

Albumina	pH 4,64
α -globuliny	pH 4,80
β -globuliny	pH 5,20
Fibrynogen	pH 5,40
γ -globuliny	pH 6,40

Badanie elektroforetyczne białek surowicy przeprowadza się z reguły w środowisku zasadowym i wszystkie białka w tych warunkach wędrują do anody. Szybkość wędrowki cząsteczek białkowych jest jednak różna, zależna od ładunku cząsteczki i od siły pola elektrycznego. Z tych podstawowych założeń wynikają główne możliwości zastosowania elektroforezy, jako metody analitycznej do badań krwi. Możliwości te idą w kilku kierunkach: 1) określenia punktu izoelektrycznego białek, 2) rozdzielu mieszaniny białek przeprowadzonego głównie w badaniach biochemicznych i klinicznych, 3) uzyskiwanie frakcji białkowych dla celów preparatywnych.

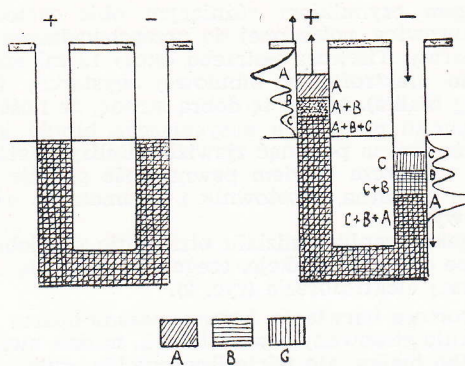
Za pomocą elektroforezy białka są rozdzielone na podstawie ich własności fizycznych, tj. ładunku elektrycznego cząsteczki białkowej. Własność ta nie charakteryzuje jednak cząsteczki białkowej pod każdym względem i frakcje białkowe o jednakowej szybkości w polu elektrycznym nie mogą być uważane za identyczne ciała białkowe. Mogą się one różnić niejednakowym stopniem strącalności, czy też dyfuzji, albo wreszcie posiadać mogą różne właściwości immunobiologiczne. Dlatego też przy badaniu białka za pomocą elektroforezy należy zdawać sobie sprawę, że nie posiadamy w tej metodzie środka do dokładnej analizy chemicznej.

a) Elektroforeza „wolna” wg Tiseliusa

Pionierskie prace Hardy'ego i Michaelisa (cyt. wg Tiseliusa) dotyczące wędrowki białek w polu elektrycznym, ich charakterystyczna zależność od pH środowiska, wskazywały na ważność tego zjawiska dla oceny białek i enzymów, Tiselius kontynuując prace Swedberga i jego szkoły podjął w latach 1925—1930 badanie białek za pomocą metody fizykochemicznej — elektroforezy. Głównym celem tych pionierskich prac były próby charakterystyki białek pod względem jakościowym, tj. oznaczenia górnej granicy pH, w której białka nie podlegały zmianom (punkt izoelektryczny). Te pierwsze poczynania były wstępnym krokiem do podejmowania prób w kierunku ich podziału. Dla przeprowadzenia tych badań Tiselius skonstruował przyrząd w postaci rurki szklanej, wygiętej w kształcie litery U.

Dolna połowa U — rurki (lewa) jest wypełniona mieszaniną białek surowicy składającej się z 3 składników A, B, C. Górna połowa zawiera roztwór buforowy.

Początkowo wszystkie frakcje A, B i C są wymieszane równomiernie. Wędrowka cząsteczek białkowych w roztworze alkalicznym pH buforu odbywa się w kierunku anody. Pod wpływem działania pola elektrycznego frakcje A, B i C wędrują z różną szybkością ku górze do buforu (ramię wstępujące), w ramieniu katodowym natomiast w kierunku przeciwnym od buforu ku dołowi (ramię zstępujące). Frakcja A wędruje najszybciej, a frakcja C najwolniej. W końcu próby występują w obu ramionach U — rurki dwa odwrócone szeregi warstw. Podział na frakcje odbywa się jednocześnie w ramieniu katodowym i anodowym. Dla prawidłowego przebiegu rozdzielu przy pomocy wolnej elektroforezy, badanie przeprowadza się w temperaturze 4°C, w której woda posiada optymalne zagęszczenie, bowiem zmiany temperatury mogą powodować prądy konwekcyjne.

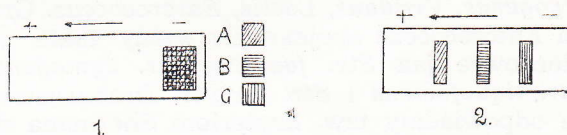


Ryc. 1. Schematyczne przedstawienie przebiegu „wolnej” elektroforezy (wg Riva)

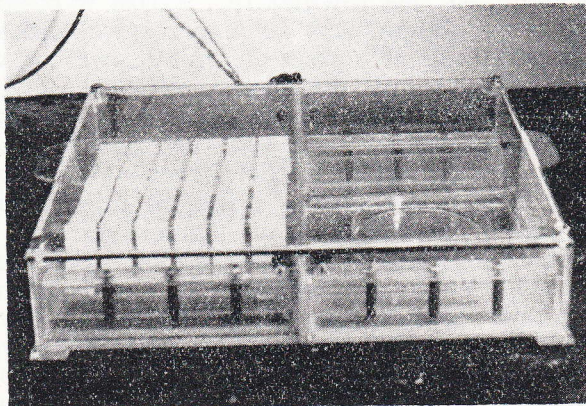
Ujemną stroną wolnej elektroforezy są trudności zachowania wyraźnej granicy między frakcjami. Do bardziej „czystych” frakcji należą te frakcje, które wędrują najszybciej. W pozostałych frakcjach granice się zacierają. Przyczyną niepełnego rozdzielu poszczególnych frakcji w wolnej elektroforezie jest i ten fakt, że granice między warstwami ustalają się m. in. dzięki działaniu siły ciężkości. Dzięki temu białka warstw dolnych łatwiej między siebie przenikają i granice między nimi tracą na wyrazistości. Rejestracja wyników rozdzielu odbywa się na drodze optycznej, przez naniesienie granic poszczególnych frakcji na papier światłoczuły.

b) Elektroforeza bibułowa

W 1944 r. Consden i współpracownicy (cyt. wg Riva) opisali sposób wykorzystania bibuły filtracyjnej do elektroforezy bibułowej, która stała się najczęściej stosowaną metodą analizy białek. Bibuła filtracyjna przepojona roztworem buforowym stanowi system porowatych przestrzeni porynych, w których każda z nich może być rozpatrywana jako oddzielny zbiornik. Przez taki układ drogą elektroforezy wędruje mieszanina białek. Rurka w kształcie litery U w elektroforezie wolnej została zastąpiona przez pasek bibuły. Poszczególne frakcje po zakończeniu rozdzielu nie graniczą ze sobą bezpośrednio, ale są rozmieszczone wzdłuż paska w różnej od siebie odległości.



Ryc. 2. Schematyczne przedstawienie zasady elektroforezy bibułowej: 1. przed próbą, 2. po próbie poszczególnie frakcje są zupełnie od siebie oddzielone (porównać z elektroforezą wolną).



Ryc. 3. Komora wilgotna do elektroforezy bibułowej z pleksiglasu. Ścianka działowa pozwala na użytkowanie każdej połowy niezależnie od siebie. (Konstrukcja własna).

Drugim czynnikiem różniącym obie metody jest ilość surowicy, potrzebnej do przeprowadzania badań. Do aparatu Tiseliusa potrzeba około 12 ml surowicy, gdy do elektroforezy bibułowej wystarczy 0,01 ml (0,6 mg białka). Ma to tę dobrą stronę, że ilość białka w stosunku do buforu nasycającego bibułę jest tak mała, że można pominąć zjawisko dializy. Metoda jest tania, wystarcza bowiem pewna ilość pasków bibuły, komora wilgotna, prostownik i fotometr do oznaczeń ilościowych.

Po zakończeniu rozdziału otrzymuje się dobrze oddzielone od siebie frakcje, czego nie udaje się uzyskać w wolnej elektroforezie (ryc. 2).

Za pomocą barwienia, którego zasada oparta jest na barwieniu stosowanym w histologii, można uwidocznić nie tylko białka, ale także lipoproteidy, glikoproteidy, a nawet fosfolipidy i prześledzić z jakimi frakcjami one wędrują. Elektroforeza bibułowa pozwala poza

tym lokalizować pierwiastki znakowane, związane z poszczególnymi frakcjami bibułowymi. Metoda ta jest obecnie szeroko stosowana zarówno w badaniach chemicznych, jak i klinicznych i pozwala wyjaśnić szereg problemów tak złożonych substancji jakimi są białka.

Piśmiennictwo

1. Nagórski F.: Dynamika białek syworołki krwi krupnego skota w ontogenezie s uczetom niekotozych fizjologiczeskich faktorow. Dysertacja Moskwa, 1962.
2. Neirat G., Beili K.: Białki. Izdatielstwo inostrannoj literatury. Moskwa, 1958.
3. Riva G.: Das Serumweißbild, 1957.
4. Tiselius A.: Electrophoresis, past, present and future. Clinica chimica acta 3, 1, 1-9, 1958.
5. Zinowiew A. A.: Chimia zyrow. Moskwa, 1952.
6. Kirk N.: Chemiczeskoje opredielenije białkow. Izdatielstwo inostrannoj literatury. Moskwa, 1949.

Adres autora: doc. dr Feliks Nagórski, Warszawa, Grochowska 272.

HIGIENA I TECHNOLOGIA ŚRODKÓW SPOŻYWCZYCH

STANISŁAW KAFEL, JOHN C. AYRES

Enterokoki oraz ich znaczenie z punktu widzenia higieny produktów zwierzęcych

Z Zakładu Badania Produktów Zwierzęcych Instytutu Weterynarii w Puławach

Kierownik: doc. dr ZBIGNIEW GAUGUSCH,

oraz Food Processing Laboratory, Iowa State University, Ames — Iowa — U.S.A.

Kierownik: prof. dr JOHN C. AYRES

Określenie enterokoki używane jest niekiedy błędnie jako równoznaczne z pojęciem paciorkowce kałowe lub paciorkowce grupy D. W roku 1937 Sherman (38) usystematyzował drobnoustroje należące do rodzaju *Streptococcus* na podstawie ich własności fizjologicznych i podzielił je na 4 grupy: *Pyogenes*, *Viridans*, *Lactis*, *Enterococcus*. Grupa *Enterococcus* obejmowała wtedy takie paciorkowce jak *Str. faecalis*, *Str. zymogenes*, *Str. liquefaciens* i *Str. durans*. Drobnoustroje te odpowiadały tzw. kryteriom Shermana dla grupy *Enterococcus* (40) co oznacza, że posiadały one następujące właściwości fizjologiczne: wzrost w obecności 6,5% NaCl, wzrost w temp. 45° jak również 10°, wzrost w bulionie z dodatkiem 40% żółci, przeżywalność w temperaturze 60° przez 30 minut, wzrost w środowisku o pH 9,6 oraz przynależność do grupy D Lancefield. Dalsze badania wykazały, że *Str. zymogenes* i *Str. liquefaciens* są bardzo blisko spokrewnione ze *Str. faecalis* i że te trzy typy paciorkowców różnią się między sobą tylko właściwościami hemolitycznymi i proteolitycznymi. Wszystkie opisane powyżej paciorkowce zostały uwzględnione w ostatnim wydaniu systematyki bakteriologicznej Bergey'a (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1957), w której grupa enterokoków obejmuje następujące typy: *Str. faecalis*, *Str. faecalis var. liquefaciens*, *Str. faecalis var. zymogenes* oraz *Str. durans*. Okazało się na-

stępnie (17), że również *Str. faecium* z grupy D paciorkowców odpowiada kryterium Shermana i może on być włączony do grupy enterokoków. Sherman (40) i Niven (26) stwierdzili następnie na podstawie właściwości serologicznych, że również *Str. bovis* posiada antygen odpowiadający grupie D Lancefield. Podobnie badania Smith i Shattock (37) wykazały obecność antygeny D u *Str. equinus*. Jednak zarówno *Str. bovis* jak i *Str. equinus* nie odpowiadają niektórym kryteriom Shermana i dlatego nie mogą być włączone do grupy *Enterococcus*. Historyczne określenie *Enterococcus* Shermana utrzymuje się do dzisiaj w piśmiennictwie i zgodnie z kryteriami przyjętymi przez tego autora należą tu: *Str. faecalis*, *Str. faecalis var. liquefaciens*, *Str. faecalis var. zymogenes*, *Str. durans* i *Str. faecium*.

Pojęcie paciorkowce kałowe z punktu widzenia taksonomii jest bardzo trudne do sprecyzowania. Można by przyjąć, że wszystkie drobnoustroje z rodzaju *Streptococcus*, których naturalnym siedliskiem jest przewód pokarmowy ludzi i zwierząt ciepłokrwistych lub często spotykane w przewodzie pokarmowym, są paciorkowcami kałowymi i wówczas praktycznie paciorkowce prawie wszystkich grup mieściłyby się pod tym pojęciem. Dziś przyjmuje się jednak (22,35), że mianem paciorkowce kałowe objąć można tylko te paciorkowce spotykane w przewodzie pokarmowym, które posiadają antygen D Lancefield,