

Kamyszek F. — **The house-fly (*Musca domestica*) as a carrier of fungi.**

795 flies on artificial media infected with the fungus *Trichophyton acuminatum* (Sabouraud) were investigated. On the basis of the investigations, the following conclusion were drawn:

1. There are possibilities for the passive carrying by flies of pathogenic fungi (*Trichophyton acuminatum* Sabouraud) into artificial media suited to their growth.

2. The number of carrier-flies (vectors) is directly proportional to the length of their stay on media infected with these fungi.

Kamyszek F. — **La mouche domestique (*Musca domestica*) comme vecteur de mycètes.**

Les recherches embrassèrent 795 mouches, entretenues sur des milieux artificiels infectés par *Trichophyton acuminatum* (Sabouraud). L'auteur tire les conclusions suivantes de investigations:

1. Les mouches peuvent être des vecteurs passifs

specjalnie do tej techniki przygotowany żel krzemionkowy, tlenek glinu, ziemia okrzemkowa lub sproszkowana celuloza, w odpowiednio dobranych układach. Technikę tę cechuje, w odróżnieniu od chromatografii bibułowej, krótszy czas rozwijania, lepsze efekty rozdzielania, mniejsza ilość badanego materiału, większa czułość, stosowanie stosunkowo silnie działających wywoływaczy, np. stężonego kwasu siarkowego, solnego i innych. Dla dokładnej analizy badanej substancji, a zatem i aminokwasów wymagane jest — podobnie jak w chromatografii bibułowej — stosowanie rozdzielaczy dwukierunkowych. Często zachodzi potrzeba kilkakrotnego rozwijania w tym samym układzie. Ponadto płyny biologiczne, przed przeprowadzeniem rozdzielania chromatograficznego, muszą być pozbawione soli. Wszystkie te czynności pochłaniają dużo czasu. Dlatego też, podobnie jak wprowadzono to w chromatografii bibułowej, czynione są próby przeprowadzania rozdzielania metodą elektrochromatografii cienkowarstwowej, która usuwa między innymi z badanego materiału sole mineralne. Elektroforezę na warstwach pokrytych adsorbentami stosowano do rozdzielania substancji w płynach biologicznych w nielicznych badaniach z dobrymi wynikami. Elektrochromatografie natomiast w badaniach płynów biologicznych zaczęto wprowadzać od niedawna (1).

2. Le nombre des vecteurs est directement proportionnel à la période de temps, passée par les mouches sur les milieux infectés par le mycète.

Kamyszek F. — **Hausfliege als Überträger der Pilze.**

Die Untersuchungen betreffen 795 Hausfliegen auf künstlichen mit *Trichophyton acuminatum* (Sabouraud) infizierten Nährboden.

Auf Grund der Untersuchungen können nachstehende Folgerungen gezogen werden:

1. Es besteht die Möglichkeit einer passiven Übertragung durch Fliegen der krankhaften Pilze (*Trichophyton acuminatum* Sabouraud) auf entsprechende ihrer Entwicklung passende künstliche Nährböden.

2. Die Menge der übertragenden Fliegen ist direkt proportional zum Zeitraum ihres Verweilens auf mit diesem Pilz infizierten Nährböden.

PRAKTYKA LABORATORYJNA

HENRYK KRACZKOWSKI

Zastosowanie elektrochromatografii cienkowarstwowej do identyfikacji aminokwasów. I. Oznaczanie wolnych aminokwasów osocza krwi

Z Katedry Chemii Fizjologicznej Wydziału Wet. WSR w Lublinie
Kierownik: prof. dr JOZEF SKULMOWSKI

Poznanie składu aminokwasowego rozwiązuje wiele zagadnień w badaniach biochemicznych i w klinikach, pozwala bowiem dokładnie poznać zachodzące przemiany wewnątrzustrojowe i w dużej mierze ułatwia diagnozę. Badania nad składem aminokwasowym, tak we krwi, jak i w moczu prowadzi się wieloma metodami. Jedną z nich jest chromatografia bibułowa. Pozwala ona na rozdzielanie, identyfikację i niekiedy ilościowe oznaczenie aminokwasów. Dla usprawnienia i udoskonalenia oznaczeń stosuje się także elektrochromatografię bibułową, to jest połączenie elektroforezy średnionapięciowej z chromatografią jednokierunkową. Polega ona na dwuetapowym rozdzielaniu badanych substancji. Najpierw rozdziela się aminokwasy elektroforetycznie, otrzymując oddzielone grupy aminokwasów kwaśnych, obojętnych i zasadowych, a w drugim etapie uzyskane grupy poddaje się rozdzielaniu chromatograficznemu i otrzymuje, w zależności od stosowanego układu, pojedyncze aminokwasy. Wyniki rozdzielania na bibule zależne są od stosowanych buforów przy elektroforezie i od układów dla chromatografii.

Od kilku lat do rozdzielania substancji stosuje się nową metodę chromatograficzną, przeprowadzaną na płytkach szklanych pokrytych warstwą proszku czyli adsorbenta, zwaną chromatografią cienkowarstwową. Metoda ta opracowana przed 25 laty przez Izmailowa (2) i używana przez Meinharda i Halla (4) oraz Kirchnera, Millera i Kellera, (3) do rozdzielania terpenów, przez długie lata była zapomniana. Dopiero w 1958 r. E. Stahl (5, 6) dokładnie opracował zasady, przeprowadził standaryzację i wskazał na możliwości szerokiego zastosowania tej metody. Obecnie coraz częściej używa się jej do wykrywania jonów nieorganicznych oraz do rozdzielania wielu substancji organicznych. Znalazła zatem zastosowanie w chemii, biochemii, farmacji, medycynie i oddaje wielkie usługi w badaniach składu leków i w toksykologii. Rozdział w tej metodzie przeprowadza się na warstwach adsorbenta, którym może być

specjalnie do tej techniki przygotowany żel krzemionkowy, tlenek glinu, ziemia okrzemkowa lub sproszkowana celuloza, w odpowiednio dobranych układach. Technikę tę cechuje, w odróżnieniu od chromatografii bibułowej, krótszy czas rozwijania, lepsze efekty rozdzielania, mniejsza ilość badanego materiału, większa czułość, stosowanie stosunkowo silnie działających wywoływaczy, np. stężonego kwasu siarkowego, solnego i innych. Dla dokładnej analizy badanej substancji, a zatem i aminokwasów wymagane jest — podobnie jak w chromatografii bibułowej — stosowanie rozdzielaczy dwukierunkowych. Często zachodzi potrzeba kilkakrotnego rozwijania w tym samym układzie. Ponadto płyny biologiczne, przed przeprowadzeniem rozdzielania chromatograficznego, muszą być pozbawione soli. Wszystkie te czynności pochłaniają dużo czasu. Dlatego też, podobnie jak wprowadzono to w chromatografii bibułowej, czynione są próby przeprowadzania rozdzielania metodą elektrochromatografii cienkowarstwowej, która usuwa między innymi z badanego materiału sole mineralne. Elektroforezę na warstwach pokrytych adsorbentami stosowano do rozdzielania substancji w płynach biologicznych w nielicznych badaniach z dobrymi wynikami. Elektrochromatografie natomiast w badaniach płynów biologicznych zaczęto wprowadzać od niedawna (1).

Celem niniejszej pracy była próba zastosowania elektrochromatografii cienkowarstwowej do rozdzielania a następnie identyfikacji wolnych aminokwasów w osoczu krwi.

Badania własne Materiał i metody

Do badań brano osocze krwi kur, a rozdział przeprowadzano na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym i sproszkowaną celulozą, w odpowiednio dobranych buforach i układach rozdzielających.

Do próbówki z heparyną pobierano od kury krew w ilości 3 ml, wirowano przez 15 minut przy 3000

obr./min, a oddzielone osocze odpipetowano. W uzyskanym osoczu strącano białko 15% kwasem trójchlorooctowym (3 ml), które następnie odwirowano. Płyn znad osadu zlano, wytrząsnięto kilkakrotnie z podwójnymi ilościami bezwodnego eteru w celu usunięcia kwasu trójchlorooctowego, a warstwy eterowo-kwasowe dokładnie odpipetowano. Po usunięciu kwasu trójchlorooctowego, reakcja badanego roztworu wynosiła około $\text{pH} = 5$. Otrzymany płyn odparowano w próżni, na łaźni wodnej w temperaturze 50° . Suchą pozostałość rozpuszczano w 0,2 ml wody redestylowanej i nakraplano na płytce szklanej, z których jedne powleczone były żelazem krzemionkowym, a drugie sproszkowaną celulozą.

Do pokrywania płytek użyto żelu krzemionkowego z gipsem (preparat Mercka). Do 40 gramów żelu dodano 80 ml wody redestylowanej i wytrząsano przez 60 sekund w erlenmajerce ze szlifowanym korkiem. Otrzymaną zawiesinę rozprowadzano na płytkach ze szkła kryształowego, o wymiarach 30×17 cm, uzyskując warstwę o grubości 0,45 mm. Płytki ogrzewano w temperaturze 105° przez 15 minut (aktywacja).

Inne płytki o tych samych wymiarach pokrywano sproszkowaną celulozą MN 300 bez gipsu (f-my Macherey Nagel). Do 30 gramów celulozy dodano 180 ml wody redestylowanej, homogenizowano przez 90 sekund, a następnie pokryto płytki warstwą o grubości 0,55 mm. Płytki poddano aktywacji przez ogrzewanie w temperaturze 105° przez 20 minut. Adsorbenty rozprowadzano na płytkach za pomocą powlekaacza z regulacją grubości warstwy f-my Desaga.

Do rozdzielania elektroforetycznych używano buforu pirydynowego o $\text{pH} = 4,0$, sporządzonego z 7,5 ml pirydyny, 25 ml kwasu octowego lodowatego i 1217,5 ml wody redestylowanej. Do rozwinięcia chromatogramów stosowano układ: n-butanol-kwas octowy lodowaty-woda w stosunku 4:1:1. Chromatogramy rozwijano trzykrotnie.

Rozdział elektroforetyczny przeprowadzono w komorach własnej konstrukcji, chłodzonych wodą bieżącą, posiadających dwa podwójne naczynia z buforem i elektrodami węglowymi. Zasilano prądem stałym z prostownika o napięciu roboczym do 1000 volt i natężeniu do 500 mA. Płytki do elektroforezy przygotowano tak, by unikać przepływu buforu przez całą warstwę adsorbenta, a więc przez te, na której przeprowadza się rozdział chromatograficzny. Bufor wpływa bowiem niekorzystnie na ten rozdział. W tym celu płytkę pokrytą adsorbentem rozdzielono rylcem na trzy pola A, B i C. Powierzchnie brzeżne miały szerokość 5 cm i na nich przeprowadzono elektroforezę. Płytkę ustawiano poziomo, pole B przykrywano płytka szklaną, a pola A i C spryskiwano buforem. Płytkę w ten sposób równomiernie nawilżoną wkładano do komory elektroforetycznej. Na obydwu końcach pola A i C płytki nakładano zwilżone buforem paski bibuły Whatman nr 3 o szerokości 4,8 cm. Paski bibuły stykały się z warstwą adsorbenta na długości 1 cm. Wolne końce pasków bibuły zanurzono w wanienkach z buforem pirydynowym i włączano prąd o napięciu 300 volt na 15 minut, po czym наносzono na miejsca X i Y, znajdujące się w odległości 8 cm od anody, po 15 ml badanego roztworu.

Płytkę z adsorbentem nakrywano na wysokości około 8 cm płytka szklaną, komore szczelnie zamknięto i włączano prąd o napięciu 300 volt przez 15 minut, a następnie zwiększano napięcie do 750 volt, przy natężeniu wnoszącym około 26 mA. Elektroforezę przeprowadzano przez 45 minut. Po jej zakończeniu płytkę suszono w suszarce z wyciągiem w temperaturze 60° przez 60 minut, w celu usunięcia śladów buforu. Pole C płytki spryskiwano 0,2% roztworem ninhydryny w acetonie. Pole to uważano za kontrolne dla sprawdzenia prawidłowej ilości naniesionego materiału badanego i należytej drogi

rozdziálu elektroforetycznego. Po powtórny wy-suszeniu płytki, na miejsce rozdzielające pola A od B (na linii L—M), наносzono suchy żel krzemionkowy lub celulozę, by utrzymać kontakt między warstwami adsorbenta. Płytkę wstawiano do komory chromatograficznej, częścią A zanurzano w układzie butanolowym i trzykrotnie rozwijano. Czas rozwijania na drodze 10—15 cm od linii startu wynosił około 5—6 godzin. Po rozdziale płytkę suszono do usunięcia składników układu butanolowego. Plamy aminokwasów wywoływano zmodyfikowanym odczynnikiem ninhydrynowym, który otrzymuje się przez zmieszanie 50,0 ml 0,2% roztworu ninhydryny w alkoholu absolutnym, 10 ml kwasu octowego lodowatego i 2 ml 2-4-6-kolidyny. Po spryskaniu wywoływaczem, obserwowano w temperaturze pokojowej pojawianie się barwnych plam, rejestrowano barwy występujących aminokwasów oraz zakreślano, na powierzchni płytki nie pokrytej adsorbentem, „jądra” pojawiających się plam. W dalszym ciągu płytkę ogrzewano w suszarce w temperaturze 80° aż do zupełnego wystąpienia barw. Plamy aminokwasów stabilizowano odczynnikiem miedziowym, przygotowanym przez zmieszanie 1 ml nasyconego $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ z 0,2 ml 10% HNO_3 i 4 ml wody destylowanej oraz dopełnienie do 100,0 ml alkoholem metylowym.

Wyniki badań

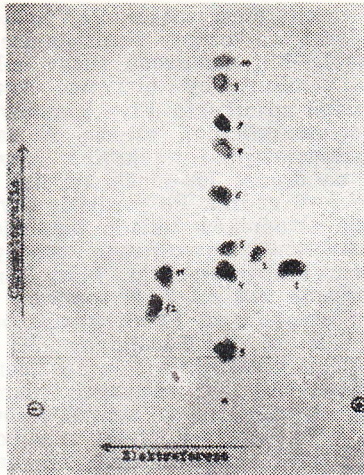
Badania przeprowadzono na dwu rodzajach adsorbentów: żelu krzemionkowym i sproszkowanej celulozie.

Fot. 1 przedstawia chromatogram otrzymany na żelu krzemionkowym. Na nim zidentyfikowano następujące aminokwasy: kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, cystynę, serynę + glicynę (wspólna plama), fenyloalaninę, leucynę z izoleucyną, prolinę, tyrozynę, metioninę + walinę (wspólna plama), argininę i histydynę wraz z lizyną i ornityną. Aminokwasy zasadowe rozdzieliły się w dwu plamach. Rozdzielone aminokwasy tworzyły plamy zwarte, ostro ograniczone.



Fot. 1. Elektrochromatogram na żelu krzemionkowym 1 — kwas asparaginowy, 2 — kwas glutaminowy, 3 — cystyna, 4 — seryna + glicyna, 5 — treonina, 6 — prolina, 7 — tyrozyna, 8 — metionina + walina, 9 — fenyloalanina, 10 — leucyna + izoleucyna, 11 — arginina + histydyna, 12 — lizyna + ornityna

Fot. 2 przedstawia chromatogram uzyskany na sproszkowanej celulozie. Rozdział aminokwasów jest zbliżony do rozdziálu na żelu



Fot. 2. Elektrochromatogram na sproszkowanej celulozie

krzemionkowym, jednak plamy są raczej rozlane i wykazują zacieki tzw. „ogony”.

Z przeprowadzonych badań wynika, że do rozdziału aminokwasów w osoczu krwi, w zastosowanym buforze i użytym układzie rozdzielającym, nadaje się bardziej żel krzemionkowy z gipsem, niż sproszkowana celuloza.

Próby rozdziału aminokwasów metodą elektrochromatografii cienkowarstwowej, na powszechnie w tej technice stosowanych warstwach o grubości 0,3 mm, nie dawały dobrych rezultatów. Dlatego też w niniejszych badaniach zastosowano warstwy o grubości od 0,45 do 0,55 mm. Przeprowadzenie w wyżej opisany sposób rozdziału aminokwasów w osoczu krwi na warstwach żelu krzemionkowego wymaga sześciokrotnie krótszego czasu od podobnego w technice bibułowej, nie wymaga przeprowadzania kłopotliwej procedury odsalania i ułatwia bardziej dokładne oznaczenie wyraźniej odgraniczonych aminokwasów, niż to ma miejsce na bibule.

Próby rozdzielania aminokwasów w buforze o pH = 2,0, dającym na bibule lepszy rozdział aminokwasów obojętnych oraz w innych układach jest w toku opracowywania.

Piśmiennictwo

1. Honegger C. G.: *Helv. Chim. Acta* 44, 173, 1961.
2. Izmailov N. A., Shraiber M. S.: *Farmatsija* 3, 1, 1938.
3. Kirchner J. C., Miller J. M., Keller J.: *Analyt. Chem.* 23, 420, 1961.
4. Meinhard J. E., Hall N. F.: *Analyt. Chem.*, 21, 185, 1949.
5. Stahl E.: *Chemiker Ztg.*, 82, 323, 1958.
6. Stahl E.: *Dünnschichtchromatographie*, Springer-Verlag, Berlin — Göttingen-Heidelberg, 1962.

ZAGADNIENIA SPOŁECZNO-ZAWODOWE

TADEUSZ BORY-MIĄCZYŃSKI

Kraków

Rozwój zakładów chorób ryb w Polsce*)

U źródeł powstania zorganizowanego zwalczania chorób ryb w Polsce leżą prace rozpoczęte przez prof. Spiczakowa w Zakładzie Ichtiobiologii i Rybactwa UJ w Krakowie. Wkrótce po przybyciu swym do Polski (w 1925 r.) zainteresował się on szczególnie działem chorób ryb, a również wpływem na gospodarkę rybną zanieczyszczeń wód wywołanych przez rozwijający się przemysł. Z chorób ryb opracował zasady zwalczania schorzenia skrzeli wywołanego przez przywrę *Daktylogyrus*, której rozwój w warunkach zagęszczenia ryb na tarliskach i 1. przesadkach stawiał wiele gospodarstw przed koniecznością sprowadzania obsady z zewnątrz, wobec wyniszczenia obsady własnej. Przede wszystkim jednak zainteresował się on coraz silniej rozprzestrzeniającą się chorobą ryb, posocznicą karpia. W jego poszukiwaniach nad właściwymi metodami diagnozowania tej choroby brałem udział od r. 1930. Po stwierdzeniu przez niego, że choroba przerzucała się wskutek nie kontrolowanych przrzutów ryb zarażonych na odległe gospodarstwa, zaczął on dążyć do ujęcia w karby tego handlu obsadą drogą zorganizowania kontroli badawczo-rozpoznawczej, tak nad materiałem obsadowym, jak również nad warunkami higienicznymi w gospodarstwach produkujących obsadę. To stało się podstawą do zaliczenia posocznicy karpia do chorób podlegających obowiązkowi zgłaszania. Odnośne Rozporządzenie Ministerstwa Rolnictwa i Ref. Rol. ukazało się z datą 27.VII.1937 (Dz. U. R. P. nr 57). Zaznaczyć należy, że duże trudności towarzy-

szyły powstaniu tego rozporządzenia, gdyż wiele osób, a zwłaszcza prof. Spiczakow, który brał czynny udział w jego redagowaniu, zdawało sobie doskonale sprawę z tego, że do chorób ryb, jako zwierząt żyjących w innym środowisku, należy podejść zupełnie odmiennie niż do zwalczania chorób zwierząt żyjących w środowisku powietrznym. Z tymi trudnościami wynikającymi z podciągnięcia posocznicy karpia pod schemat chorób zwierząt ciepłokrwistych trzeba się jednak było pogodzić. Dopiero wtedy, po ustawowym uchwyceniu spraw posocznicy, można było myśleć o tworzeniu placówek badawczo-rozpoznawczych dla jej diagnozowania i zwalczania. Niemniej jednak trudności pozostały i okazała się konieczność złagodzenia przepisów, gdyż ściśle przestrzeganie ustawy musiałyby doprowadzić do okresowej likwidacji produkcji obsady w coraz to dalszych gospodarstwach i tym samym do znacznego zmniejszenia się produkcji ryb w całym państwie. W wyniku tej potrzeby zostały dokonane pewne korekty przez wydanie Rozporządzenia Ministra Rolnictwa nr 109 z dn. 18.VI.1954. Nie rozwiązało to jednak wszystkich trudności. Okazało się, że posocznica karpia nie jest chorobą zbyt trudną do zwalczania w gospodarstwach mogących stworzyć należyte warunki pod względem sanitarnym, a również przestrzegających przy produkcji ryb pewnych metod, jak wykluczenie jakichkolwiek okresów głodowania osłabiających ryby, zastosowanie podkarmiania ryb przed i po zimowaniu, uchwycenie właściwego momentu odłowu ryb, tym więcej zaś, że obecnie ma się do pomocy możliwość zastosowania u ryb o gorszym stanie zdrowotności antybiotyków. Prócz tego stwierdza się, że przebudowa

*) Referat wygłoszony na Zjeździe Towarzystwa Naukowego oraz Zrzeszenia Lekarzy Weterynaryjnych w dniu 18.VI.1965 r. w Gołyszcu.