

WPŁYW ŻÓŁTKA JAJA KURZEGO W POŻYWCIE NA WZROST I PRZEŻYWALNOŚĆ *PASTEURELLA MULTOCIDA* W HODOWLI PŁYNNEJ

KAZIMIERZ BUKOWSKI

Katedra Mikrobiologii Wydziału Weterynaryjnego SGGW, Warszawa
Kierownik: Prof. dr Juliusz Brill

Celem niniejszej pracy było ewentualne wskazanie drogi, która by pozwalała otrzymywać duże ilości komórek bakteryjnych w mniejszej objętości pożywki, a w związku z tym zbadanie wpływu żółtka jaja kurzego na wzrost *Pasteurella multocida*. Pozytywne wyniki tego rodzaju badań mogłyby znaleźć zastosowanie w produkcji biopreparatów, w badaniach nad strukturą antygenową oraz w badaniach nad fizjologią *P. multocida*. Czynnikiem zachęcającym do podjęcia badań w tym kierunku były prace prowadzone od dawna nad właściwościami odżywczymi żółtka jaja dla wielu drobnoustrojów.

Żółtko, pod różnymi postaciami, znalazło w wielu pożywkach zastosowanie jako czynnik pobudzający wzrost drobnoustrojów. Z prac, które bezpośrednio dotyczyły *P. multocida*, należy wymienić publikacje E. R y u (1959), w których autor podaje, że na agarze z dodatkiem homogenizatu jaja kurzego otrzymywał 20-krotnie lepszy wzrost pałeczek *P. multocida* niż na agarze zwykłym. Ponadto szczepy hodowane na podłożu z dodatkiem homogenizatu żółtka jaja kurzego dłużej utrzymują swą żywotność niż na agarze z surowicą. Szczepy te użyte do szczepionek ochronnych przeciw posocznicy krwiotocznej dawały dłuższą i lepszą odporność zwierząt niż przygotowywane na innych podłożach.

Z polskich badaczy, którzy zajmowali się wpływem żółtka jaja na wzrost drobnoustrojów, należy wymienić S z y n k i e w i c z a (1956) i S ł o m s k ą (1957—1958). Pomimo że prace były prowadzone niezależnie, różnymi metodami i z różnymi drobnoustrojami, to jednak ostateczne osiągnięte w nich wyniki potwierdzają, że żółtko jaja kurzego cechuje się znacznymi właściwościami odżywczymi dla drobnoustrojów. Dane o wartościach odżywczych żółtka jaja kurzego zachęciły autora do badań nad wpływem żółtka jaja kurzego na rozwój *P. multocida*.

Materiały i metoda badań. Pożywka podstawowa: w badaniach użyto podłoża płynnego o składzie: sacharoza 2,0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 1,0, KH_2PO_4 — 2,74, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ — 10,745, wyciąg z drożdży 100 ml; całość dopełniano bulionem zwykłym do objętości 1000 ml. Po rozpuszczeniu wszystkich składników doprowadzano pH pożywki do 7,6 i sterylizowano ją w autoklawie przy $\frac{3}{4}$ atm przez 20 min.

Wyciąg z drożdży przygotowywano według metody opisanej przez autora w nr 33 Zeszytów Problemowych Postępów Nauk Rolniczych (1961).

Wyciąg z żółtka (modyfikacja A): żółtko jaja kurzego po oddzieleniu od białka osuszano bibułą filtracyjną, a następnie wlewano do cylindra miarowego i zalewano 100 ml wody destylowanej; całość dokładnie mieszano szklaną bagietką i kroplami dodawano ług sodowy do wystąpienia przejaśnienia mieszaniny, po czym dodawano 300 ml wody destylowanej, ponownie mieszano i filtrowano przez bibułę. Przed sterylizacją pH roztworu wynosiło 7,8—8,5. Wyciąg sterylizowano pod ciśnieniem $\frac{3}{4}$ atm. przez 20 min. Roztwór po wyjałowieniu ma kolor słomkowy, jest płynny i lekko opalizuje.

Wyciąg z żółtka (modyfikacja B): żółtko jaja kurzego rozcieńczano w 400 ml wody destylowanej o pH 7,6, a po dokładnym wymieszaniu sterylizowano w autoklawie pod ciśnieniem $\frac{3}{4}$ atm podobnie jak wyciąg A. Po wyjałowieniu widoczne strąty oddzielano drogą wirowania lub przez sedymentację w chłodni. Płyn klarowny z nad osadu używano do pożywek.

Pożywka *ad usum*: do czterech części pożywki podstawowej dodawano w warunkach jałowości jedną część żółtka przygotowanego w modyfikacji A lub B i rozlewano do probówek po 5 ml. Podobnie rozlewano po 5 ml pożywkę podstawową, której używano do posiewów kontrolnych.

Posiewy. Pożywki posiewano 0,1 ml 18-godzinnej hodowli *P. m.* na pożywce podstawowej rozcieńczonej 10^{-3} . Po 18 godzinach przetrzymywania w termostacie w temperaturze $37^\circ C$ hodowlę rozcieńczano. Hodowlę na pożywce z dodatkiem żółtka w modyfikacji A lub B rozcieńczano do 10^{-8} , a hodowlę na pożywce podstawowej służącej jako kontrola do 10^{-7} .

Z kolei z podanych rozcieńczeń wysiewano po 0,1 ml na płytki agar z krwią i trzymano w termostacie w temp. $37^\circ C$ przez okres 18 godz. Liczbę wyrosłych kolonii przyjmowano za liczbę komórek w objętości 0,1 ml. Dla każdego szczepu wykonywano 3 kolejne obliczenia, a średnią z nich przyjmowano za wynik.

Wyniki. Zbadano wzrost 15 szczepów *P. multocida* na podłożu podstawowym i na 2 podłożach z dodatkiem wyciągu żółtka A lub B. Otrzymane wyniki zestawiono w tabeli 1.

Z danych w stosunku do podstawowej pożywki przedstawionych w tabeli wynika, że pożywka wzbogacona wyciągiem żółtkowym w modyfikacji A zwiększa wzrost *P. multocida* około 10-krotnie; pod uwagę wzięto

Tabela 1

Wpływ wyciągu żółtka jaja w modyfikacji A lub B na ilościowy wzrost *P. multocida*

Nr szczepu	Liczba komórek bakteryjnych w 0,1 ml 18-godzinnej hodowli		
	pożywka podstawowa z dodatkiem 20% wyciągu żółtka w modyfikacji A	pożywka podstawowa z dodatkiem 20% wyciągu żółtka w modyfikacji B	pożywka podstawowa
2/61	670	40	47
3/59	570	20	39
1a/60	490	10	65
1/60	580	—	76
7/60	770	20	57
10/60	740	50	61
13/60	800	70	71
14/60	710	60	68
40/61	760	30	63
45/61	700	—	77
46/61	820	—	70
47/61	810	—	69
48/61	840	90	63
53/61	690	—	79
60/61	630	50	82

średnią wzrostu dla 15 szczepów. Pożywka wzbogacona dodatkiem wyciągu żółtkowego w modyfikacji B nie zwiększa wzrostu *P. multocida*. Stwierdzono, że hodowla *P. multocida* na podłożu z dodatkiem wyciągu A przechowywana w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$ zachowuje żywotność do trzech miesięcy, podczas gdy na innych podłożach w tych samych warunkach — około 1 miesiąca. Pomimo że wzrost jest obfity, pH pożywki nawet po 10 dniach inkubacji nie obniża się poniżej 7,2.

Dodatek wyciągu żółtkowego w modyfikacji A do agaru zwykłego nie powodował wyraźnych różnic ilościowych we wzroście *P. multocida*, jednak kolonie były większe. Kolonie wyrosłe na zwykłym agarze i na agarze z wyciągiem B nie różniły się między sobą.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań z 15 terenowymi szczepami *P. multocida* stwierdzono przedłużenie okresu przeżywalności szczepów na podłożu z dodatkiem wyciągu żółtkowego A, co wskazuje na to, że

P. multocida znajduje na tym podłożu warunki optymalne. To samo potwierdza około dziesięciokrotne zwiększenie liczby komórek na tym podłożu w porównaniu z liczbą komórek na pożywce podstawowej. Brak jakichkolwiek różnic we wzroście *P. multocida* na pożywce z dodatkiem wyciągu B wskazuje na to, że wyciąg ten nie zawiera czynnych stymulatorów wzrostu. Nie jest wykluczone, że substancje wzrostowe przeszły do osadu podczas wirowania lub dekantacji i zostały wraz z nim oddzielone. Pożywka z dodatkiem wyciągu żółtkowego A powinna znaleźć szerokie zastosowanie praktyczne przy produkcji szczepionek i przy otrzymywaniu masy bakteryjnej do badań nad strukturą antygenową. Ewentualna zmienność *P. multocida* na tym podłożu pozostaje sprawą otwartą.

PIŚMIENNICTWO

1. Bukowski K. (1961) — Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 33, 35.
2. Ryu E. (1959) — Jap. J. Vet. Sci. 21, 97; 21, 281.
3. Słomska J. (1957) — Post. Hig. Med. Dośw. 11, 347.
4. Słomska I., Smogórowa Wł. (1957) — Post. Hig. Med. Dośw. 11, 349.
5. Słomska J. (1958) — Post. Hig. Med. Dośw. 12, 311.
6. Szyrkiewicz Z. M. (1958) — Act. Microb. Pol. 5, 81; 5 85.

К. Буковски

ВЛИЯНИЕ ЖЕЛТКА КУРИНОГО ЯЙЦА В ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ НА РОСТ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ *PASTEURELLA MULTOCIDA* В ЖИДКОЙ КУЛЬТУРЕ

Резюме

Исследовалось влияние питательных свойств желтковых экстрактов на рост и жизнеспособность различных серологических типов *Pasteurella multocida*.

В исследованиях применялась основная питательная среда со следующим составом: бульон — 900 мл; сахароза — 2,0; $MgSO \cdot 7H_2O$ — 1,0; KH_2PO_4 — 2,74; $NaHPO_4 \cdot 12H_2O$ — 10,745; дрожжевой экстракт — 100 мл. Питательная среда обогащалась путем прибавки 20% экстракта из желтка куриного яйца в модификации А или В. Экстракт из желтка А в дистиллированной воде алкализировался перед стерилизацией до прояснения; экстракт из желтков В — не алкализировался. Как экстракты, так и основная питательная среда были стерилизованы в автоклаве при $3/4$ атм. в течение 20 минут. Экстракты после стерилизации прибавлялись в питательную среду в стерильных условиях.

В питательной среде с экстрактом из желтка в модификации А констатировано в 10 раз более буйный рост, а также более длительная жизнеспособность штаммов *P. multocida*, хранимых в температуре 4°C до 3 месяцев. Применяя зато экстракт в модификации В, не обнаружено никаких различий по росту, по отношению к контролю на основной питательной среде.

Питательная среда с прибавкой в модификации А должна найти широкое применение при производстве бактериальной массы из штаммов *P. multocida*. Открытым остается вопрос возможной изменчивости *P. multocida* на описываемой питательной среде.

K. B u k o w s k i

EFFECT OF EGG YOLK ON GROWTH AND SURVIVAL OF *PASTEURELLA MULTOCIDA* IN LIQUID MEDIA

S u m m a r y

The effect was studied of nutritional properties of yolk extracts on the growth and survival of different serological types of *Pasteurella multocida*.

A basic medium of the following composition was used: Broth 900 ml, saccharose 2,0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0, KH_2PO_4 2.74, $NaHPO_4 \cdot 12H_2O$ 10.745, and yeast extract 100 ml. This medium was enriched by the addition of 20 per cent yolk extract, modification A or B. Prior to sterilization, A modification of yolk extract in distilled water was alkalized until it clarified, whereas B modification was not alkalized. Both extracts and basic medium were autoclaved at $3/4$ atm for 20 min. Extracts were sterile added to the medium after sterilization.

Ten times greater growth and prolongation (up to 3 months) of the survival time of *P. multocida* strains kept at 4°C were found in the medium supplemented with A extract. Yet using B extract no differences were observed between the growth in supplemented and basic media.

Medium supplemented with A modification of yolk extract should be applied in cases of storage of *P. multocida* or production of large masses of bacteria from *P. multocida* strains.

The question of eventual variability of *P. multocida* in this medium requires further explanation.